Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Charles University
Faculty of Science

Fyziologie živočichů
Animal Physiology

Autoreferát disertační práce
Summary of the doctoral thesis

PROTEINOVÝ PROFIL, METABOLICKÉ ENZYMY A TRANSMEMBRÁNOVÁ SIGNALIZACE V MYOKARDU SPONTÁNNĚ HYPERTENZNÍHO POTKANA KMENE SHR-TG19

PROTEIN PROFILING, METABOLIC ENZYMES AND TRANSMEMBRANE SIGNALING IN THE HEART OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE SHR-TG19 RAT

Mgr. Dmitry Manakov

Praha, 2018

Doktorské studijní programy v biomedicíně
Doctoral study programme in biomedicine

Univerzita Karlova
a Akademie věd České republiky

Charles University
and Czech Academy of Sciences

Program: Fyziologie živočichů
Programme: Animal Physiology

Předseda oborové rady/Committee Chairman:
Doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Školicí pracoviště:
Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie

Workplace:
Charles University, Faculty of Science, Department of Physiology

Autor/Author: Mgr. Dmitry Manakov

Školitel/Supervisor: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

The full text of the thesis is available in the relevant libraries of the Faculty of Science of Charles University

Abstrakt

Kardiovaskulární nemoci jsou nejčastější příčinou smrti jak na celém světě, tak v České republice. Hlavní faktory přispívající k rozvoji srdečních onemocnění, kromě věku a pohlaví, jsou obezita, vysoký krevní tlak a vysoká hladina cholesterolu a triglyceridů v krvi. Spontánně hypertenzní potkan (SHR) byl vyvinut a používán k vyhledávání genetických determinant těchto projevů. Tento běžně používaný potkaní model rozvíjí hypertenzi, dyslipidemii a inzulínovou rezistenci díky abnormálnímu genu translokázy mastných kyselin Cd36. Předchozí studie ukázaly, že transgenní oprava Cd36 u kmene SHR-Tg19 zlepšuje činnost beta-adrenergního systému v srdci, mírně zvyšuje srdeční hmotnost a vede ke zvýšení náchylnosti k arytmiím.

Tato práce měla dva hlavní cíle:

1) Zjistit, zda a jak transgenní náhrada Cd36 v SHR ovlivňuje proteinové složení, mitochondriální funkci a aktivitu vybraných metabolických enzymů srdce.

2) Studovat expresi a distribuci vybraných složek beta-adrenergního signálního systému v lipidových raftech izolovaných pomocí solubilizace membrán detergentem TX-100.

Rozhodli jsme se porovnat dva běžně používané proteomické přístupů, 2D elektroforézu spojenou s MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií a tzv. label-free LC-MS. Výsledky neukázaly překryv mezi odlišně exprimovanými proteiny identifikovanými těmito dvěma metodami. Porovnávali jsme vzorky z obou komor a zjistili, že obě metody identifikovaly více změn v pravých než v levých komorách SHR-Tg19. Tyto změny se týkají několika enzymů energetického metabolismu a strukturních a regulačních proteinů cytoskeletu. Změny v levých komorách byly pozorovány u metabolických enzymů a také u proteinových produktů pseudogenů, podobných některým OXPHOS enzymům, což může poukazovat na jejich možnou regulační roli.

Malát dehydrogenáza je enzymem, který podle MALDI-TOF MS měl 6 krát nižší expresi v LV u SHR-Tg19. Tento enzym měl také významně nižší aktivitu ve vzorcích cytoplazmy a v mitochondriích izolovaných z levých komor SHR-Tg19. Aktivita cytoplazmatické hexokinázy byla také nižší v z levých komorách SHR-Tg19. Rovněž jsme zjistili sníženou hladinu exprese podjednotky sukcinát dehydrogenázy SdhB (součást komplexu II) a 70 kDa peroxisomálního membránového proteinu v levých komorách SHR-Tg19. Ačkoli respirometrická měření neodhalila významné rozdíly mezi kmeny, získané výsledky demonstrovaly vyšší míru respirace u mitochondrií izolovaných z levých než z pravých komor.

Nakonec jsme převzali a rozpracovali zjednodušený postup pro izolaci lipidových raftů ze srdeční tkáně. Použitelnost této metodologie byla testována pomocí proteomického přístupů. Získané výsledky ukázaly, že tato metoda vedla k úspěšné separaci typických raftových a neraftových proteinů. Použili jsme tuto metodu pro analýzu distribuce několika klíčových komponent beta-adrenergního signálního systému v levé komoře srdeční u obou potkaních kmenů. Raftová lokalizace G beta podjednotky byla významně snížena u SHR-Tg19, což by mohlo být spojeno se zvýšením signalizace cAMP. Celková exprese konexinu 43 byla vyšší v levých komorách SHR-Tg19, což je možnou příčinou zvýšené arytmogeneze pozorované u těchto zvířat. Také jsme nalezli zvýšenou expresi ERK1 a fosforylací RhoA, jejichž funkce může být spojena s hypertrofickými projevy v srdci u starších SHR-Tg19. Konexin 43, ERK1 a RhoA jsou považovány za efektory signalizační sítě cAMP, což poukazuje na její široky vliv na funkci srdce.

Abstract

Cardiovascular diseases account for the majority of deaths both worldwide and in the Czech Republic. Main factors contributing heart disease development, aside age and sex, are obesity, high blood pressure and high blood cholesterol and triglyceride levels. Spontaneously hypertensive rat (SHR) was developed and used for search of genetic determinants of these traits. This commonly used rat model develops hypertension, dyslipidemia, and insulin resistance naturally which is caused by aberrant Cd36 fatty acid translocase gene. Previous studies have shown that rescue of Cd36 performed in the transgenic SHR-Tg19 strain enhances cardiac beta-adrenergic system, slightly increases heart mass and leads to higher susceptibility to arrhythmias.

The present thesis had two main aims:

1) To investigate whether and how a transgenic rescue of Cd36 in SHR affects protein composition, mitochondrial function and activity of selected metabolic enzymes of the heart.

2) To study the expression and distribution of selected components of beta-adrenergic signaling system in lipid raft isolated form membranes using the TX-100 detergent.

We set to compare two commonly used proteomic approaches, 2D electrophoresis with MALDI-TOF mass spectrometry and label-free LC-MS. The results did not reveal any overlap between differently expressed proteins identified by these two methods. We also compared samples from both ventricles and found that both MALDI and LC-MS identified more changes in the RV of SHR-Tg19 than in the LV. These changes included several energy metabolism enzymes and cytoskeletal, structural and regulatory proteins. Changes in the LV included metabolic enzymes and, interestingly, translated products of pseudogenes similar to some OXPHOS enzymes, implicating their regulatory role.

Malate dehydrogenase, the enzyme that according to MALDI-TOF MS underwent a 6-fold downregulation in the LV of SHR-Tg19, had significantly lower activity in both cytoplasm and mitochondria samples of the LV from SHR-Tg19, as determined using an enzymatic assay. Activity of cytoplasmic hexokinase was also lower in the LV of SHR-Tg19. We also detected downregulated expression of the succinate dehydrogenase subunit SdhB (complex II) and 70 kDa peroxisomal membrane protein in the LV of SHR-Tg19. Although respirometric measurements did not reveal significant differences between the strains, our data demonstrated higher respiration rate of mitochondria isolated from the LV compared to RV.

We also adopted and elaborated a simplified method for lipid raft isolation from cardiac tissue. Feasibility of this methodology was tested by using a proteomic approach. The obtained results indicated that the method led to successful separation of typical raft and non-raft proteins. We used this method to analyze the distribution of several key components of beta-adrenergic signaling system in the LV of both rat strains. Expression of G protein beta subunit was lower in the raft fraction which could be linked to the enhanced cAMP signaling. Additionally, we found higher expression of connexin 43, which could be linked to increased arrhythmogenesis seen in SHR-Tg19, and higher expression of ERK1 and phosphorylation of RhoA, which may lead to an increase of heart mass observed in older SHR-Tg19. Connexin 43, ERK1 and RhoA are considered effectors of cAMP signaling network, thus showing its broad impact on heart function.

OBSAH / LIST OF CONTENTS

SEZNAM ZKRATEK / LIST OF ABBREVIATIONS 6
ČESKÁ ČÁST 7
1 ÚVOD 7
2 CÍLE 8
3 MATERIÁL A METODIKA 8
4 VÝSLEDKY A DISKUZE 9
5 ZÁVĚR 15
ENGLISH PART 16
1 INTRODUCTION 16
2 AIMS 17
3 MATERIALS AND METHODS 17
4 RESULTS AND DISCUSSION 18
5 CONCLUSIONS 21
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY / REFERENCES 22
7 SEZNAM PUBLIKACÍ/LIST OF PUBLICATIONS 25

SEZNAM ZKRATEK / LIST OF ABBREVIATIONS

AC	Adenylylcykláza	Adenylyl cyclase
ALDH	Aldehyd dehydrogenáza	Aldehyde dehydrogenase
AMPK	5 'AMP-aktivovaná protein kináza	5' AMP-activated protein kinase
AR	Adrenergní receptory	Adrenergic receptors
Cd36	Klastr diferenciace 36	Cluster of differentiation 36
CS	Citrát syntáza	Citrate synthase
DLAT	Dihydrolipoyl transacetyláza	Dihydrolipoyl transacetylase
DRM/DSM	Membrány odolné vůči detergentům / rozpustné pomoci detergentů	Detergent-resistant/soluble membranes
FA	Mastné kyseliny	Fatty acids
G3PDH	Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HK	Hexokináza	Hexokinase
LC	Kapalinová chromatografie	Liquid chromatography
LCAD	Acyl-CoA dehydrogenáza	Acyl-CoA dehydrogenase
MALDI-TOF	Matrixem asistovaná laserová desorpce/ ionizace - čas letu	Matrix-assisted laser desorption/ionization - time-of-flight
MDH	Malát dehydrogenáza	Malate dehydrogenase
MS	Hmotnostní spektrometrie	Mass spectrometry
NCOR	NADH:cytochrome c oxidoreduktáza	NADH:cytochrome c oxidoreductase
PM	Plazmatické membrány	Plasma membranes
PNS	Post-nukleární supernatant	Post-nuclear supernatant
PPAR	Receptory aktivované proliferátorem peroxizomů	Peroxisome proliferator-activated receptor
SCOR	Sukcinát:cytochrome c oxidoreduktáza	Succinate:cytochrome c oxidoreductase
SDHA	Sukcinát dehydrogenáza, podjednotka A	Succinate dehydrogenase complex, subunit A
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SHR	Spontánně hypertenzní potkan; - Tg19 transgenní linie 19	Spontaneously hypertensive rat; - Tg19 transgenic line 19

ČESKÁ ČÁST

1 ÚVOD

Podle Světové zdravotnické organizace má 17 milionů úmrtí ročně (třetina všech) důvodem kardiovaskulární onemocnění, přibližně 50 % z nich je důsledkem komplikací hypertenze. Hypertenze a rizikové faktory jako centrální obezita, inzulínová rezistence a dyslipidémie jsou seskupeny do metabolického syndromu. Úmrtnost na kardiovaskulární onemocnění je u pacientů s tímto syndromem zvýšena třikrát (Isomaa a kol., 2001).

Spontánné hypertenzní potkan (SHR) je široce studovaný genetický model vhodný pro výzkum polygenní hypertenze (Okamoto a Aoki, 1963). Kromě hypertenze vykazuje SHR zvýšené hladiny lipidů v plazmě, inzulinovou rezistenci, defektní působení katecholaminu a vyšší poměr glukózy k oxidaci mastných kyselin (FA) ve srovnání s normotenzními potkany (Christe a Rodgers, 1994, Iritani a kol., 1977, Rao a kol., 1993; Reaven a kol., 1989). Analýza genových vazebných skupin vedla k identifikaci mutovaného genu Cd36 jako determinanty těchto příznaku (Aitman a kol., 1999). Byl vytvořen transgenní kmen SHR-Tg19 zavedením divokého typu Cd36 do genomu SHR. Toto mělo za následek zmírnění výšky krevního tlaku, inzulínové rezistence a hyperlipidémie (Pravenec a kol., 2001). SHR-Tg19 také vykazuje výrazné zvýšení frekvence ventrikulárních arytmií (Neckář a kol., 2012) a zlepšené funkce několika složek β-adrenergního signalizačního systému, včetně vyšší exprese β2-adrenergních receptorů (β2AR) na membráně a aktivity adenylylcyklázy (AC), ale také mírně vyšší srdeční hmotnost v porovnání s SHR (Klevstig a kol., 2013).

Samotný Cd36 je transmembránový multifunkční protein, který patří do rodiny „scavengerových“ receptorů. Je schopen vázat mnoho ligandů včetně trombospondinu-1, PfEMP1 na erytrocytech infikovaných *P. falciparum* a oxidovaného LDL (PrabhuDas a kol., 2017). U buněk citlivých na inzulín Cd36 usnadňuje až 80 % intracelulárního transportu FA (Abumrad a kol., 1993). Bylo prokázáno, že Cd36 váže FA, které pak procházejí tunelem uvnitř proteinu a vkládají se do vnější vrstvy plazmatické membrány (Hsieh a kol., 2016). Uvnitř buňky FA ovlivňují regulaci metabolismu přes aktivaci PPAR receptorů (Drover a Abumrad, 2005). Cd36 je schopen intercelulární signalizace prostřednictvím aktivace kináz fyn a lyn, které regulují funkci AMPK (Samovski a kol., 2015). Studie Cd36 v kosterním svalu ukázala jeho roli ve preferencí metabolického substrátu (McFarlan a kol., 2012), která je zásadní pro běžně fungující srdce. Chronické zvýšené spoléhání na glykolýzu je škodlivé a vede k srdečnímu selhání.

2 CÍLE

Chtěli jsme zjistit, jaké změny může vyvolat transgenní exprese Cd36 u SHR potkanů v proteinovém složení srdečních komor, ale v metabolické aktivitě a distribuci vybraných signálních proteinů. Byly stanoveny následující cíle:

1. Zkoumání vlivu exprese Cd36 u SHR na proteinové složení levé a pravé komory srdeční pomocí kombinace „top-down " a „bottom-up" proteomických přístupů.
2. Hodnocení aktivity a exprese metabolických enzymů a měření respirace mitochondrií izolovaných z levé a pravé komory srdeční SHR a SHR-Tg19.
3. Charakterizace exprese a distribuce v membránových frakcích vybraných složek β-adrenergního signálního systému a konexinu 43.

3 MATERIÁL A METODIKA

Pokusná zvířata: Byli použiti dospělí samci potkanů ve věku 4 měsíců (250-270 g) ze dvou kmenů, SHR a SHR-Tg19. Druhý kmen nese divoký typ genu Cd36 (Pravenec a kol., 2001).

Příprava vzorků: Srdce byla rychle vyjmuta a po oddělení komor a septa zvážena. Pro přípravu PNS byla rozstříhaná tkáň homogenizována. Po centrifugaci homogenátu byl odebrán supernatant a pelet resuspendován. Pak byl pelet homogenizován a znovu centrifugován, poté byly oba supernatanty spojeny dohromady. Frakce PM byla izolována z PNS za použití 18 % Percolu. Vzorky byly centrifugovány při 26000 ot. za min po dobu 15 minut (rotor Beckman 50.2 Ti). Frakce PM byla izolována pomocí druhé centrifugace. Pro testy respirometrie a enzymových aktivit byly izolovány vzorky subsarkolemální mitochondriální populace z intaktních potkaních srdcí. Tkáň byla nakrájená, homogenizována a centrifugována, výsledný supernatant byl zfiltrován přes nylonovou síťku o velikosti 56 μm a potom znovu centrifugován při 8000 × g po dobu 10 minut. Pelet byl resuspendován a použit ve stejný den. Zbytky vzorků byly použity pro enzymatické testy. Pro izolaci lipidových mikrodomén byly vzorky PM ošetřeny 1 % detergentem Triton X-100 po dobu 1 h na ledu. Vzorky byly centrifugovány (128000 x g, 1 hodinu, 4 ° C) ve stolní ultracentrifuze Beckman.

SDS-PAGE a western blotting: Vzorky byly denaturovány a separovány pomocí SDS-PAGE na 10-15 % polyakrylamidových separačních gelech. Následné proteiny byly elektrotransferem přeneseny z gelů na nitrocelulózovou membránu. Membrány byly blokovány odstředěným mlékem a následně inkubovány se vhodnými primárními a sekundárními protilátkami.

Dvourozměrná elektroforéza: Vzorky PNS byly vysrážené, opracováné a nanesené na proužky Immobiline DryStrips (lineární pH gradient 3-11 NL, 13 cm) pro izoelektrické zaostření. Poté byly proteiny rozděleny pomocí SDS-PAGE.

MALDI-TOF MS/MS: Gely byly barvené koloidním CBB a kvantifikovány v PDQuest software (Bio-Rad). Jednotlivé skvrny nabarvené CBB byly vyříznuté, štěpené pomocí trypsinu a přenesené na MALDI-TOF analyzátor (Applied Biosystems / MDS Sciex).

LC-MS: Vzorky prošly zpracováním včetně jejich trypsinizace. Jednotlivé peptidy byly separované za použití vysoce výkonné kapalinové chromatografie. Ionty plynné fáze byly analyzované

na hmotnostním spektrometru Orbitrap Fusion (Thermo). Výsledky byly analyzované pomocí softwaru MaxQuant.

Respirometrie: Izolované mitochondrie byly vloženy do komor respirometru Oxygraph-2k (Oroboros) při RT s mitochondriálním respiračním médiem MiR05. Polarografický signál byl zaznamenán a zpracován pomocí softwaru DatLab 5 (Oroboros).

Spektrofotometrické analýzy: Enzymová aktivita (MDH, HK, CS, NCOR, SCOR) byla hodnocena spektrofotometrem Shimadzu UV1601 a 96-jamkovým destičkovým Synergy HT (BioTek).

Imunofluorescenční zobrazování: Srdce byla fixována pomocí perfuze 4 % PFA. Řezy o tloušťce 12 μm byly připraveny v kryostatu Leica CM1850. Po blokování oslím sérem a nekonjugovanými sekundárními protilátkami byly řezy inkubované se vhodnými primárními a sekundárními protilátkami. Obrazy byly snímány pomocí systému Olympus Cell^R a zpracovány pomocí aplikace Huygens Software a FIJI.

Statistická analýza: Všechny výsledky byly vyjádřeny jako průměr ± střední chyba průměru. Statistická významnost porovnávání rozdílů v normálně distribuovaných proměnných mezi skupinami byla určena Studentovým t-testem nebo dvoucestnou ANOVA a následným post-hoc testem Bonferroni. $P < 0.05$ byly považovány za statistické významné.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Transgenní exprese Cd36 indukovala více proteinových změn v pravé než v levé komoře SHR

Celkově 2D gely obsahovaly 411 proteinových skvrn ve vzorcích LV a 357 u RV. Byly identifikovány 3 změny proteinů v LV a 8 v Rvu SHR-Tg19 pomocí MALDI-TOF MS. Výsledky získané pomocí LS-MS ukázaly 7 změn proteinů v LV a 10 v RV u SHR-Tg19. Většina pozorovaných změn byl pokles, pouze proteasomální podjednotka α typu 1 (↑2.4 krát) a akonitáza (↑2.2 krát) byly zvýšené. Tyto změny lze považovat za protektivní. Akonitáza je enzym iniciující Krebsův cyklus, její vysoká exprese je důležitá pro správnou funkci mitochondrií (Matasova a Popova, 2008).

Více než polovina identifikovaných změn proteinů v SHR-Tg19 jsou enzymy energetického metabolismu

Množství proteinů zodpovědných za energetický metabolismus bylo 7 z 10 v LV a 6 z 18 v RV, včetně MDH, SDHA, ALDH, G3PDH, LCAD a DLAT. Kromě MDH a G3PDH jsou všechny tyto proteiny mitochondriální. Většina proteinů v RV byla snížena 2 až 3 krát, kromě ALDH (↓4 krát). Pokles ALDH u SHR-Tg19 může být spojen s nižším obsahem TG v srdci. Studie ukazují, že exprese ALDH může být potlačena aktivitou PKA, která je zvýšena u SHR-Tg19 v důsledku zvýšené signalizace β2-AR (You a kol., 2002). G3PDH je klíčový glykolytický enzym a DLAT zprostředkovává vstup pyruvátu do Krebsova cyklu. Jejich snížení může být znamením posunu směrem k β-oxidaci, která je dostatečně energeticky přijatelná. Navíc GAPDH má pro-apoptotickou funkci zprostředkovanou permeabilizací mitochondriální membrány, takže nižší hladiny tohoto enzymu mohou indukovat kardioprotekci u SHR-Tg19 (Tarze a kol., 2007). Na druhou stranu, downregulace SDHA je škodlivá v kontextu srdečních onemocnění (Chouchani a kol., 2014).

Pět proteinů z těch, které byly identifikovány pomoci LC-MS v LV, jsou produkty pseudogenů. BLAST algoritmus potvrdil jejich podobnost s krátkými oblastmi *ribozomálního proteinů S20* a

podjednotek 3 a 4 *subkomplexu NADH dehydrogenázy 1β*. Tyto podjednotky jsou části mitochondriálního komplexu I a jsou nezbytné pro jeho sestavení (Calvo a kol., 2012). Studie naznačují, že translatované pseudogeny mohou regulovat expresi jejich příbuzných proteinů (Poliseno a kol., 2010).

V RV jsme také pozorovali downregulaci některých proteinů souvisejících s tvorbou cytoskeletu, a to buď strukturní (tubulin beta 1, ↓2,5 krát; tubulin beta 6, ↓2,5 krát) nebo regulační (BMP10, ↓2,4 krát; Septin-11, ↓3,3 krát). MEK1, kináza MAPK dráhy, byla také snížena v RV SHR-Tg19 (↓2 krát), stejně jako PKIα (↓2,5 krát), což je inhibitor aktivity PKA. Toto poslední snížení může souviset se zvýšenou β-adrenergní signalizací u SHR-Tg19. Identifikované proteiny jsou uvedeny v tabulkách 3 až 8 v disertační práce.

Měření enzymatické aktivity MDH potvrdilo proteomické výsledky

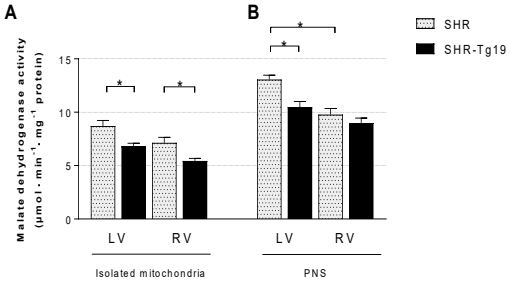
Exprese cytoplazmatické malát dehydrogenázy byla nižší jak u LV (↓6,2 krát), tak u RV (↓2,7 krát) SHR-Tg19. Využili jsme spektrofotometrické stanovení, které prokázalo významné snížení její aktivity (asi o 20 %) v izolovaných mitochondriích jak z LV, tak z RV a z PNS z LV SHR-Tg19. Aktivita HK byla také nižší (asi o 30 %), ale pouze u PNS z LV, nikoliv v mitochondriích. Aktivity komplexu CS a NCOR nebyly změněny u SHR-Tg19. Naměřená aktivita komplexu SCOR byla nízká ve srovnání s NCOR, ale byla vyšší u LV SHR-Tg19 ve srovnání s SHR o přibližně 40%. To bylo také významně vyšší v RV obou kmenů než v LV (Obr. 1).

Nadměrná NADH produkovaná glykolýzou v hypertrofovaném SHR srdci byla prokázána oxidací MDH (Atlante a kol., 2006; Nielsen a kol., 2011). Dále jsme pozorovali významně sníženou aktivitu HK (o přibližně 30 %) ve vzorcích z LV SHR-Tg19 ve srovnání s SHR, což naznačuje potlačení glykolýzy v transgenním kmeni.

Dále jsme zaznamenali významné snížení exprese 70-kDa peroxisomálního membránové proteinu PMP70 (o 40 %) v LV SHR-Tg19 (Obr. 2). Absence změn v expresi katalázy naznačuje, že celkové množství peroxizomů zůstalo stejné. Vzhledem k tomu, že PMP70 se účastní transportu molekul LCFA-CoA přes peroxisomální membránu, lze spekulovat, že u zvířat s deficiencí Cd36 je peroxisomální oxidace výraznější.

Nebyly zaznamenány žádné významné změny respirační rychlosti subsarcolemalních mitochondrií izolovaných z SHR-Tg19 ve srovnání s SHR

Rychlost mitochondriální oxidace se lišila pouze mezi komorami. Rozdíl míry využití O_2 byl téměř dvojnásobný pro komplex I a 30 % pro komplex II. Tento výsledek kontrastuje s předchozími pozorováními (Neckář a kol., 2012), které ukázala o 20 % vyšší míru respirace v homogenátu ze srdeční tkáně SHR-Tg19 v porovnání s SHR. Podobný nesoulad mezi vlastnostmi izolovaných mitochondrií a srdečních vláken byl pozorován v publikaci Jüllig a kol. (2008). V této studii měly mitochondrie izolované z SHR a WKY potkanů stejné respirační aktivity, ale srdeční vlákna z WKY byla aktivnější. Campbell a kol. (2004) popisují lokalizace Cd36 na mitochondriální membráně. Detekovali jsme expresi Cd36 v mitochondriálních frakcích připravených z LV obou kmenů potkanů, ale v množství nižším než v PM (Obr. 3). Jiné studie neukázaly žádný vliv přítomnosti mitochondriálního Cd36 na β-oxidaci (King a kol., 2007), což je v souladu s našimi výsledky.



Obr 1. Výsledky srovnávaní aktivit metabolických enzymů ve vzorcích PNS a izolovaných mitochondrií z levé a pravé komor srdci potkanů SHR a SHR-Tg19. **A:** Aktivita MDH ve vzorcích mitochondrií. **B:** Aktivita MDH ve vzorcích PNS. **C:** Aktivita hexokinázy ve vzorcích PNS. **D:** Aktivita SCOR komplexu ve vzorcích mitochondrií. * - P < 0,05.

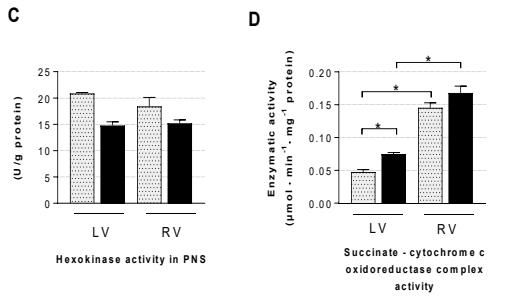
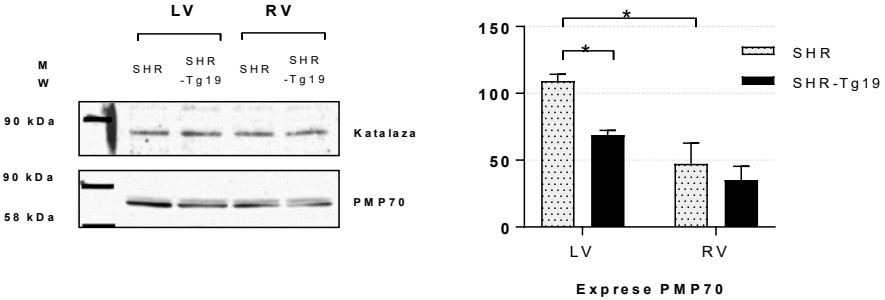
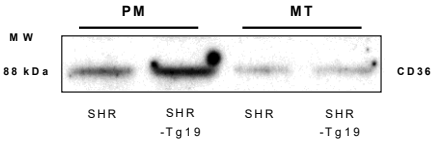


Fig. 1. Results of metabolic enzyme activity comparison in PNS and isolated mitochondria samples from LV and RV of SHR and SHR-Tg19. **A:** MDH activity in isolated mitochondria. **B:** MDH activity in PNS. **C:** Hexokinase activity in PNS. **D:** SCOR complex activity in isolated mitochondria. * - P < 0,05.



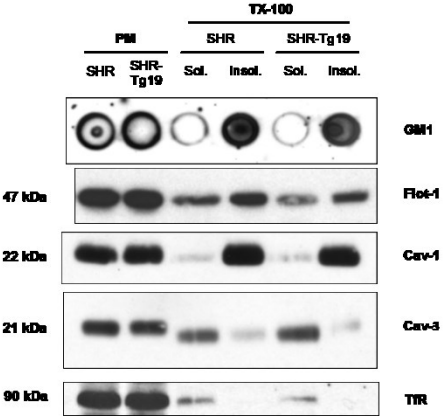
Obr. 2. Exprese proteinů PMP70 a katalázy ve vzorcích PNS izolovaných ze LV a RV obou kmenů. * - P < 0,05.

Fig. 2. Expression of PMP70 and catalase in samples of LV and RV PNS isolated from SHR and SHR-Tg19. * - P < 0,05.



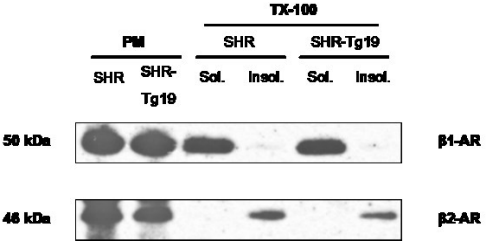
Obr. 3. Representativní imunoblot ukazující expresi Cd36 ve vzorcích PM a mitochondrií izolovaných ze srdcí SHR a SHR-Tg19.

Fig. 3. Representative immunoblot showing the expression of Cd36 in samples of PM and mitochondria from heart of SHR and SHR-Tg19.



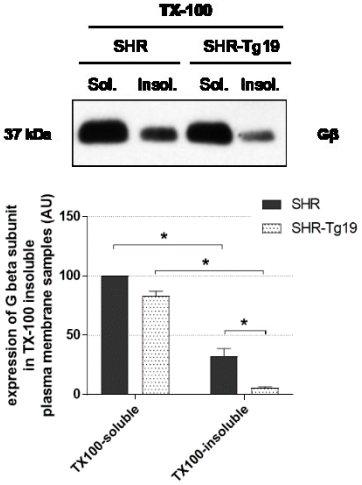
Obr. 4. Distribuce typických markérů lipidových raftů ve vzorcích plazmatických membrán a membrán izolovaných pomoci solubilizace detergentem TX-100. Vzorky pocházejí z levé srdeční komory SHR a SHR-Tg19.

Fig. 4. Distribution of typical lipid raft markers in PM and TX-100 solubilized membrane fractions. Samples were prepared from the LV of SHR and SHR-Tg19.



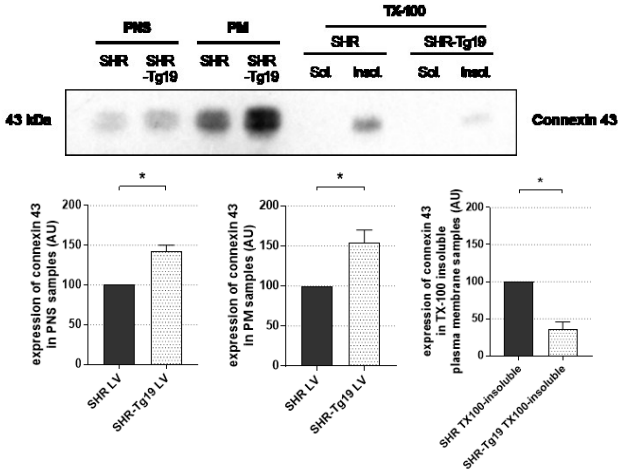
Obr. 5. Distribuce β-adrenergních receptorů ve vzorcích plazmatických membrán a membrán izolovaných pomocí solubilizace detergentem TX-100 z levých komor srdcí potkanů SHR a SHR-Tg19.

Fig. 5. Distribution of β-AR in PM and TX-100 solubilized fractions from the LV of SHR and SHR-Tg19.



Obr. 6. Distribuce β podjednotky G proteinu ve vzorcích membrán izolovaných pomocí solubilizace detergentem TX-100 z levých komor srdcí potkanů SHR a SHR-Tg19. * – $P < 0.05$.

Fig. 6. Distribution of G protein β subunit in TX100-soluble and -insoluble fractions of SHR and SHR-Tg19 LV cardiac plasma membranes. * – $P < 0.05$.



Obr. 7. Exprese a distribuce konexinu 43 ve vzorcích plazmatických membrán a membrán izolovaných pomocí solubilizace detergentem TX-100 z levých komor srdcí potkanů SHR a SHR-Tg19.
* – $P < 0.05$.

Fig. 7. Expression and distribution of connexin 43 protein in left ventricular PNS, PM and TX100-soluble and insoluble fractions of SHR and SHR-Tg19. * – $P < 0.05$.

Zjednodušená metoda pro přípravu membránových frakcí

Převzali jsme rychlý a účinný způsob detergentem zprostředkované izolace lipidových raftů (Rubin a Ismail-Beigi, 2003). Kvalita separace byla testována pomocí Western blottingu stanovením exprese hlavních markérů raftových a neraftových membrán, z nichž většina byla distribuována v příslušných frakcích včetně Cav-1, GM1 a TfR (Obr. 4).

Pro zjištěni proteinového složení frakcionovaných membrán jsme použili label-free LC-MS. V obou oddělených frakcích bylo identifikováno celkem 1676 proteinů. Vybrali jsme pouze ty, které vykázaly minimálně dvojnásobnou změnu mezi vzorky membránových frakcí. Pomocí webové databaze DAVID Bioinformatics Resources jsme utřídili tyto proteiny do funkčně-lokalizačních skupin.

Bylo zjištěno, že osmdesát jedna bílkovin je obohaceno ve frakci membrán rezistentních vůči detergentů (DRM). Pět z nich (Cav-1, Flot-1, Cx43 a dvě isoformy kavínu) patří do frakce lipidových raftů. Dvacet šest proteinů identifikovaných ve frakci DRM bylo cytoskeletálních. Je známo, že lipidové rafty a kaveoly jsou asociované se mnohými cytoskeletálními proteiny v kardiomyocytech (Head a kol., 2014). Frakce DRM také obsahovala mnoho kontraktilních a ECM proteinů, které mají známou kolokalizaci s proteiny cílenými do raftů. Vzhledem k tomu předpokládáme, že frakce DRM skutečně obsahuje lipidové rafty a jejich integrální proteiny.

Druhá skupina obsahovala 97 proteinů identifikovaných v DSM. Tato skupina byla více rozsáhla a nemohli jsme všechny tyto proteiny definitivně kategorizovat. Největší kategorie obsahuje proteiny účastnící se energetického metabolismu. Frakce DSM obsahuje také proteiny, které jsou citlivé na vysoký obsah cholesterolu, a proto jsou funkční mimo membrány raftů. Ty zahrnují Na^+/K^+-ATPázu (Sutherland a kol., 1988) a čtyři členy GTPazové rodiny Rab (Chen a kol., 2008), které byly identifikovány v DSM.

Lokalizace G proteinové podjednotky β je potlačena v DRM z SHR-Tg19

S použitím Western blottingu jsme nezjistili žádné významné rozdíly v lokalizaci β-adrenergních receptorů mezi kmeny. β1-AR byl nalezen pouze ve frakci DSM, zatímco β2-AR pouze v DRM u obou kmenů (Obr. 5). Existují důkazy ko-lokalizace β2-AR s lipidovými rafty, které tento typ receptoru opouští po své aktivaci (Allen a kol., 2005).

Pomocí imunofluorescenčního zobrazení jsme nezjistili téměř žádnou ko-lokalizaci mezi Cav-3 a β2-AR. Tento výsledek je v souladu s pozorovaným rozdílem v distribuci Cav-3 a β2-AR ve frakcionovaných membránách. Nicméně to je v rozporu s běžně uváděnou asociaci β2-AR s kaveolamí tvořenými Cav-3 v kardiomyocytech (Ostrom a Insel, 2004). Možným vysvětlením této nesrovnalosti by mohlo být to, že použité protilátky proti β2-AR se nemohou navázat na receptory lokalizované uvnitř kaveol.

Komponenty β-adrenergní signalizace jako Gα a AC se lokalizují v lipidových raftech způsobem závislým na cholesterolu (Pontier a kol., 2008). Toto potvrzují výsledky distribuce proteinu $G\alpha_i$, který byl pozorován v DRM frakci v obou kmenech. Na druhou stranu většinu exprese Gβ podjednotky jsme pozorovali ve frakci DSM (Obr. 6). Některé studie ukázaly, že ve srovnání s Gα má Gβ slabší asociaci s kaveolárními mikrodoménami (Oh and Schnitzer, 2001). Komplexy Gβγ mají významné inhibiční účinky na GPCR signalizaci (Pitcher a kol., 1992, Tang a Gilman, 1991). Snížení počtu Gβ asociovných s rafty může proto být v souladu s předchozím pozorovaným zvýšením aktivity AC a fosforylace PKA u SHR-Tg19 (Klevstig a kol., 2013).

Srdce SHR-Tg19 vykazuje vyšší expresi konexinu 43, vyšší expresi ERK1 a fosforylaci RhoA

Ačkoli jsme nepozorovali upregulaci exprese proteinu epac1 u kmene SHR-Tg19, můžeme spekulovat, že má zvýšenou aktivitu, protože a) AC aktivita je zvýšena u SHR-Tg19 (cAMP epac1 aktivuje); b) pozorovali jsme pozitivní změny efektorů epac1.

Dřívější studie prokázaly, že SHR-Tg19 má vyšší citlivost na arytmie, které jsou předpokládaným důsledkem zvýšené vodivosti srdce (Neckář a kol., 2012). Existují důkazy, že jak cAMP efektory PKA, tak epac1 pozitivně ovlivňují funkci štěrbinových spojů (Somekawa a kol., 2005). V současné studii jsme pozorovali významné zvýšení množství konexinu 43 v PNS a PM z LV SHR-Tg19 (Obr. 7). Nicméně nepodařilo se nám najít vysvětlení významného poklesu množství Cx43 ve vzorcích DRM z SHR-Tg19 v porovnání s SHR. Použili jsme imunofluorescenční barvení pro zjišťování ko-lokalizace Cav-3 a Cx43 ve vzorcích srdcí obou kmenů, ale nenalezli jsme žádné viditelné nebo kvantifikovatelné rozdíly mezi nimi.

U SHR-Tg19 jsme detekovali zvýšenou hladinu (o 15 %) fosforilované formy malé GTPázy RhoA. Signalizace tohoto proteinu je prohypertrofická a modulovaná fosforylací na Ser188, která indukuje jeho translokaci do cytosolu a chrání RhoA před degradací (Lang a kol., 1996).

Nakonec jsme zjistili, že exprese ERK1 byla významné vyšší v LV z SHR-Tg19. Některé studie ukazují, že aktivita MEK1 vede ke zvýšení tloušťky srdeční stěny a exprese ERK1 (Lips a kol., 2004). Navíc bylo prokázáno, že aktivace epac1 pomocí cAMP vede k pozitivní regulaci ERK zprostředkované MEK1 (Enserink a kol., 2002). Proliferační účinek signalizace cAMP prostřednictvím účinků RhoA a epacl by proto mohl vysvětlit malý, ale významný nárůst poměru hmotností srdce k hmotnosti těla pozorovaný u SHR-Tg19 v předchozích studiích (Klevstig a kol., 2013).

5 ZÁVĚR

Souhrnně lze říci, naše výsledky podporují předpoklad, že fungování Cd36 je základem flexibility kardiálního metabolického substrátu a poukazují na příspěvek této translokázy k preferenci substrátu v srdci. Pochopení změn indukovaných expresí Cd36 u SHR by mohlo pomoci zjistit účinky tohoto multifunkčního proteinu v intracelulární signalizaci kardiomyocytů.

Porovnáním výsledků získaných pomocí „bottom-up" and „top-down" proteomických strategií jsme zjistili, že tyto metody se navzájem doplňují. Oba přístupy ukázaly, že transgenní exprese CD36 ovlivnila hladiny exprese proteinů silněji v pravé než v levé komoře. Získané výsledky poukazují na posun energetického metabolismu a změny v apoptotické signalizaci, což může souviset se zlepšeným využitím energie zejména v pravé komoře.

Výsledky proteomické analýzy byly podpořeny měřením aktivit respiračních enzymů. Tato měření odhalila nižší aktivitu mitochondriální malátdehydrogenázy v levé i v pravé komoře u SHR-Tg19. Spolu s nižší aktivitou cytosolické hexokinázy v levé komoře tento výsledek ukazuje úlohu funkční exprese Cd36 v metabolické substrátové preferenci.

Předložená práce se také zabývala úlohou Cd36 v hypertrofických a pro-arytmických odpovědích zprostředkovaných β-adrenergním signálním systémem. Podařilo se demonstrovat upregulací konexinu 43, RhoA a ERK1 v LV z SHR-Tg19 v porovnání s SHR. Předpokládáme, že snížená asociace Gβ podjednotky a lipidových raftů by mohla částečně přispět ke zvýšení aktivity AC pozorované u SHR-Tg19.

ENGLISH PART

1 INTRODUCTION

According to World Health Organization, 17 million deaths a year (one third of the total) are accounted to cardiovascular disease, around 50% of these are the result of complications of hypertension. Hypertension, together with such risk factors as central obesity, insulin resistance and dyslipidemia, is clustered into the metabolic syndrome. Cardiovascular mortality is increased three-fold in subjects with MetS (Isomaa et al., 2001).

Spontaneous hypertensive rat is a widely studied phenotype-driven genetic model suitable for the research of polygenic hypertension (Okamoto and Aoki, 1963). Besides hypertension SHR exhibits elevated levels of lipids in plasma, insulin resistance, defective catecholamine action and higher ratio of glucose to fatty acids (FA) oxidation compared to normotensive rats (Christe and Rodgers, 1994; Iritani et al., 1977; Rao, 1993; Reaven et al., 1989). Genetic linkage analysis led to identification of a mutated Cd36 gene as a determinant for these traits (Aitman et al., 1999). Wild-type Cd36 was introduced to SHR which resulted in alleviation of high pressure, insulin resistance and hyperlipidemia (Pravenec et al., 2001). SHR-Tg19 transgenic strain also exhibited a marked increase in ventricular arrhythmias frequency (Neckář et al., 2012) and improved function of several components of β-adrenergic signaling system, including higher membrane expression of β2-adrenergic receptors (β2-AR) and AC activity, but it also exhibited a slightly higher heart mass compared to SHR (Klevstig et al., 2013).

Cd36 itself is a transmembrane multifunctional protein that belongs to a scavenger receptor family. It is able to bind many ligands including trombospondin-1, *P. falciparum* protein PfEMP1 on infected erythrocytes and oxidized LDL (PrabhuDas et al., 2017). In insulin-responsive cells Cd36 is facilitating up to 80% of FA uptake (Abumrad et al., 1993). Cd36 was shown to bind FA which then passes through a tunnel inside the protein and gets inserted into an outer leaflet of plasma membrane (Hsieh et al., 2016). Once inside the cell, FA influence regulation of metabolism by activating PPAR receptors (Drover and Abumrad, 2005). Beside this, Cd36 is capable of intercellular signaling via activation of kinases fyn and lyn which regulate AMPK function (Samovski et al., 2015). A study of Cd36 in skeletal muscle indeed shows its role in metabolic fuel selection (McFarlan et al., 2012) which is crucial for normally functioning heart. While initially cardioprotective, increased reliance in glycolysis is detrimental and leads to heart failure.

2 AIMS

We wondered what changes could bring the restoration of Cd36 expression in SHR to the protein makeup of cardiac ventricles, to metabolic activity and distribution of selected signaling proteins. Our aims can be summarized as follows:

4. Investigation of the effect of Cd36 expression in SHR on a broader protein composition of left and right ventricles using a combination of top-down and bottom-up proteomic approaches.
5. Assessment of activity and expression of metabolic enzymes and respirometric evaluation of mitochondria isolated from the left and right ventricles of SHR and SHR-Tg19.
6. Characterization of expression and membrane fraction distribution of connexin 43 as well as selected components of β-adrenergic signaling system.

3 MATERIALS AND METHODS

Animals: Adult male rats around the age of 4 month (250-270 g) from two strains, SHR and SHR-Tg19 were used. The latter strain harbors the wild type of Cd36 transgene (Pravenec et al., 2001).

Sample preparation: Hearts were rapidly excised, dissected into chambers and septum and weighted. For the PNS preparation the tissue was dispersed and homogenized. The homogenate was centrifuged to collect the supernatant and resuspend the pellet. The pellet was then homogenized and centrifuged again, then the two supernatants were pooled together. PM fraction was isolated from PNS using 18% Percoll. Samples were centrifuged at 26000 rpm for 15 min (Beckman 50.2 Ti rotor). The PM fraction was isolated by second centrifugation. For high-resolution respirometry and enzyme activity assays samples of subsarcolemmal mitochondrial population were isolated from intact rat hearts. Tissue was minced, homogenized and centrifuged, the resulting supernatant was filtered through a 56 μm nylon mesh and then centrifuged again at 8000 × g for 10 min. The pellet was resuspended and used for measurements on the same day. Leftover samples were used in enzymatic assays. To isolate lipid microdomains samples of PM were treated with 1% Triton X-100 for 1 h on ice. The samples were centrifuged (128000 × g, 1 h, 4 °C) in Beckman tabletop ultracentrifuge.

SDS-PAGE and western blotting: The samples were denatured and separated by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 10-15% polyacrylamide separating gels. The resolved proteins were electro-transferred from the gels to nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with skimmed milk, and subsequently incubated with appropriate primary and secondary antibody.

Two-dimensional electrophoresis: PNS samples were precipitated, processed and loaded into the Immobiline DryStrips (linear pH gradient 3-11 NL, 13 cm) for the isoelectric focusing. After that the proteins were resolved using SDS-PAGE.

MALDI-TOF MS/MS: The gels were stained by colloidal CBB and quantified in PDQuest software (Bio-Rad). Individual CBB-stained spots were excised, digested using trypsin and transferred onto MALDI-TOF analyzer (Applied Biosystems/MDS Sciex).

LC-MS: The samples underwent processing including their trypsinization. Individual peptides were separated using high-performance liquid chromatography. Gas-phase ions were analyzed on an Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo). The results were analyzed with MaxQuant software.

High-resolution respirometry: Isolated mitochondria were loaded into a respirometer Oxygraph-2k (Oroboros) at RT with a mitochondrial respiration medium MiR05. Polarographic signal was recorded and processed using DatLab 5 software (Oroboros).

Spectrophotometric analyses: Enzyme activities (MDH, HK, CS, NCOR, SCOR) were assessed using Shimadzu UV1601 spectrophotometer or 96-well plate reader system (Synergy HT, BioTek).

Immunofluorescence imaging: Hearts were perfusion-fixated using 4% PFA. 12 µm thick sections were prepared in Leica CM1850 cryostat. After blocking using both donkey serum and unconjugated secondary antibodies, the sections were incubated with appropriate primary and secondary antibodies. The images were acquired using Olympus Cell^R system and processed using Huygens Software and FIJI application.

Statistical analysis: All results were expressed as means ± SEM. Statistical significance of comparing differences in normally distributed variables between the groups was determined by either Student's t-test or Two-Way ANOVA and a subsequent Bonferroni post-hoc test. $P < 0.05$ were considered to be statistically significant.

4 RESULTS AND DISCUSSION

Transgenic Cd36 expression induced more protein changes in the right than in the left ventricles of SHR

In total, 2D gels contained 411 protein spots in samples from the LV and 357 in the RV. We identified 3 protein changes in the LV and 8 in the RV of SHR-Tg19 using **MALDI-TOF MS**. Results obtained by **LS-MS** showed 7 proteins in the LV and 10 in the RV of SHR-Tg19. Most of observed changes were downregulations, only proteasome subunit α type-1 (↑2.4-fold) and aconitase (↑2.2-fold) were upregulated. These changes could be viewed as protective. Aconitase is a TCA cycle initiating enzyme, its high expression is important for proper mitochondrial function (Matasova and Popova, 2008).

More than a half of the identified altered proteins in SHR-Tg19 are energy metabolism enzymes

The number of proteins responsible for energy metabolism was 7 out of 10 in the LV and 6 out of 18 in the RV, including MDH, SDHA, ALDH, G3PDH, LCAD and DLAT. All of these except MDH and G3PDH were mitochondrial proteins. Most of the RV proteins were downregulated 2- to 3-fold except ALDH (↓4-fold). The downregulation of ALDH in SHR-Tg19 may be associated with lower cardiac TG contents. Research indicates that ALDH expression can be suppressed by PKA activity, which is elevated in SHR-Tg19 due to enhanced β2-AR signaling (You et al., 2002). G3PDH is a key glycolytic enzyme and DLAT mediates entry of pyruvate into the TCA cycle. Their downregulation may be a sign of shift towards more energy-sufficient β-oxidation. Additionally, GAPDH has pro-apoptotic function mediated via mitochondrial membrane permeabilization, thus lower levels of this enzyme may induce cardioprotection in SHR-Tg19 (Tarze et al., 2007). On the other hand, downregulation of SDHA is detrimental in the context of heart disease (Chouchani et al., 2014).

Five proteins of those identified by LC-MS in the LV were determined to be translated products of pseudogenes. BLAST algorithm confirmed their similarity to short regions of *ribosomal protein S20* and *NADH dehydrogenase 1β subcomplex subunits 3* and *4*. Two latter proteins are parts of the mitochondrial Complex I that are necessary for its assembly (Calvo et al., 2012). Studies suggest that translated pseudogenes may regulate the expression of their cognate proteins (Poliseno et al., 2010).

In the RV we also observed downregulations of some proteins related to cytoskeleton formation, either structural (tubulin beta 1, ↓2,5-fold; tubulin beta 6, ↓2,5-fold) or regulatory (BMP10, ↓2,4-fold; Septin-11, ↓3,3-fold). MEK1, a kinase of MAPK pathway, was also downregulated in the RV of SHR-Tg19 (↓2-fold) as well as PKIα (↓2,5-fold) which is a strong suppressor of PKA activity. The latter finding may be related to enhanced β-adrenergic signaling in SHR-Tg19. The identified proteins are listed in tables 3-8 of the thesis.

Measurements of MDH enzymatic activity corroborated proteomic results

Expression of cytoplasmic malate dehydrogenase was lower in both LV (↓6.2-fold) and RV (↓2.7-fold) of SHR-Tg19. We utilized spectrophotometric assay which showed a significant reduction of its activity (by about 20%) in isolated mitochondria from both LV and RV and in PNS from the LV of SHR-Tg19. Activity of HK was also lower (by about 30%) but only in the PNS from the LV and not mitochondria. Activities of CS and NCOR complex were not altered in SHR-Tg19. Measured activity of SCOR complex was low compared to NCOR, but it was higher in the LV of SHR-Tg19 compared to SHR by about 40%. It was also significantly higher in the RV of both strains than in the LV (Fig. 1).

The excessive NADH produced in glycolysis in hypertrophied SHR heart was shown to be oxidized by MDH (Atlante et al., 2006; Nielsen et al., 2011). Furthermore, we observed a significantly reduced activity of HK (by about 30%) in samples from the LV of SHR-Tg19 compared to SHR, indicating suppression of glycolysis in the transgenic strain.

Additionally, we observed a significant downexpression of the 70-kDa peroxisomal membrane protein PMP70 (by 40%) in the LV of SHR-Tg19 (Fig. 2). Absence of changes in the expression of catalase suggests that total number of peroxisomes remains the same. Because PMP70 participates in transport of LCFA-CoA molecules across the peroxisomal membrane it could be speculated that in Cd36-deficient animals peroxisomal oxidation becomes more pronounced.

There were no significant alterations in respiratory rates of subsarcolemmal mitochondria isolated from SHR-Tg19 compared to SHR

Rates of mitochondrial oxidation differed only between the ventricles. The difference was almost two-fold for complex I and about 30% for complex II-restricted O_2 utilization rates. This finding contrasts previous observations by Neckář et al. (2012) who observed 20% higher respiratory rates in cardiac tissue homogenate of SHR-Tg19. A similar discrepancy between the properties of isolated mitochondria and skinned heart fibers was observed by Jüllig et al. (2008). In that study mitochondria isolated from SHR and WKY rats had similar respiratory activities and skinned cardiac fibers were more active in WKY. Campbell et al. (2004) have reported mitochondrial membrane localization of Cd36. Indeed, we have detected some Cd36 expression in the mitochondrial fractions prepared from the LV of both rat strains, albeit in much lower amounts than in the PM (Fig. 3). Other studies did not show any influence of mitochondrial Cd36 presence on β-oxidation (King et al., 2007). Our current results agree with this observation.

A simplified method for preparation of membrane fractions

We adopted a fast and efficient method of detergent solubilization described by Rubin and Ismail-Beigi (2003). The quality of separation was tested using Western blots for major raft and non-raft markers most of which were distributed in the relevant fractions, including Cav-1, GM1 and TfR (Fig. 4). To elucidate the proteomic composition of TX-100 fractionated membranes we used label-free LC/MS. There were 1676 proteins identified in both separated fractions. We chose only those that were expressed 2-fold change between the samples of membrane fractions. By using DAVID Bioinformatics Resources, we clustered these proteins into functional-localizational groups.

Eighty-one proteins were identified to be enriched in the detergent resistant membrane (DRM) fraction. Five of them (Cav-1, Flot-1, Cx43 and two isoforms of cavin) belong to lipid raft fraction. Twenty-six of the proteins identified in the DRM fraction were cytoskeletal. Lipid rafts and caveolae are indeed known to tether with many cytoskeletal elements in cardiomyocytes (Head et al., 2014). The DRM fraction also contained many cardiac contractility machinery and ECM proteins which have known known associations with proteins targeted to rafts. It may be therefore correct to assume that the DRM fraction indeed contains lipid rafts with their integral proteins.

Second group contains 97 proteins identified in the DSM. As it is more diverse not all of these proteins could be decisively categorized. The largest category contains proteins participating in energy metabolism. The DSM fraction also contains proteins that are sensitive to high cholesterol content and therefore are functional outside of raft membranes. These include Na^+/K^+-ATPase (Sutherland et al., 1988) and four GTPase members of the Rab family (Chen et al., 2008) that were identified in DSM.

Localization of G protein subunit β is almost diminished in DRM from SHR-Tg19

Using Western blotting we detected no significant differences in the localization of β-adrenergic receptors between the strains. The β1-AR signal was found only in the DSM fraction, while the β2-AR signal only in the DRM in both strains (Fig. 5). β2-AR are known to co-localize with lipid rafts and leave them upon activation (Allen et al., 2005).

Using immunofluorescence imaging we determined almost no co-localization between Cav-3 and β2-AR. This result is consistent with the observed difference in the distribution of Cav-3 and β2-AR in the fractionated membranes. However, it conflicts with the consensus which suggests β2-AR association with Cav-3 caveolae in cardiomyocytes (Ostrom and Insel, 2004). A possible explanation for this discrepancy could be that our antibodies to β2-AR could not bind to those receptors inside the caveolae.

Some components of β-adrenergic signaling like Gα and AC localize to lipid rafts in a cholesterol-dependent manner (Pontier et al., 2008). This corroborates our results of the distribution of $G\alpha_i$ protein that was predominantly observed in the DRM fraction in both strains. On the other hand, we observed most of the Gβ subunit expression in the DSM fraction (Fig. 6). Some studies showed that compared to Gα proteins, Gβ has weaker association with caveolar microdomains (Oh and Schnitzer, 2001). Gβγ complex have multiple inhibitory effects on GPCR signaling (Pitcher et al., 1992; Tang and Gilman, 1991). Therefore, the decrease in raft-associated Gβ could be in line with our previous observations of increased AC activity and PKA phosphorylation in SHR-Tg19 (Klevstig et al., 2013).

Heart of SHR-Tg19 exhibits higher expression of connexin 43 as well as higher expression of ERK1 and phosphorylation of RhoA

Although we failed to observe an upregulation of epac1 expression in SHR-Tg19, we suspect it may increased activity in this strain because a) AC activity upstream of epac1 is enhanced in SHR-Tg19; b) we observed positive changes in epac1 effectors.

Previous studies have shown that SHR-Tg19 has a higher susceptibility to arrhythmias which as we hypothesized might arise from increased conductivity (Neckář et al., 2012). There is evidence that both cAMP effectors PKA and epac1 positively influence gap junction function (Somekawa et al., 2005). In the present study we observed a significant increase in the amount of connexin 43 in both PNS and PM from the LV of SHR-Tg19 (Obr. 7). However, we were not able to find explanation to a significant decrease in Cx43 amount in the DRM samples from SHR-Tg19 other than it was an artefact of the preparation. In order to elucidate these results, we used immunostaining to inspect co-localization of Cav-3 and Cx43 in both strains but did not found any visible or quantifiable differences between them.

In SHR-Tg19 we detected a 15% increase in the level of phosphorylated form of small GTPase RhoA. Signaling of this protein is prohypertrophic and modulated by phosphorylation on Ser188 which induces its translocation to cytosol and protects RhoA from degradation (Lang et al., 1996).

Finally, we found that the expression of ERK1 was significantly higher in the LV of SHR-Tg19. Studies show that MEK1 activity leads to increased heart wall thickness and ERK1 expression (Lips et al., 2004). Additionally, activation of epac1 by cAMP was shown to lead to MEK1 mediated regulation of ERK (Enserink et al., 2002). Proliferative effect of cAMP signaling through RhoA and epac1 effects could therefore explain a small but significant increase in heart to body weight ratio observed in SHR-Tg19 in previous studies (Klevstig et al., 2013).

5 CONCLUSIONS

In conclusion, our results support the assumption that Cd36 functioning underlies cardiac metabolic substrate flexibility and suggest a contribution of this translocase to cardiac substrate selection. The present findings regarding changes induced by of Cd36 restoration in SHR could help elucidate the effects of this protein in cardiomyocyte signaling.

We also compared bottom-up and top-down proteomic strategies and found these methods to be complementary to each other. Both approaches indicated that transgenic expression of CD36 affected protein levels more strongly in the right than left ventricles. The observed results could be linked to a shift in energy metabolism and alterations in apoptotic signaling which can lead to improvement of energy utilization particularly in the right ventricle.

Respiration enzymes activity measurements corroborated our proteomic analysis and revealed downregulation of mitochondrial malate dehydrogenase activity in both left and right heart ventricles of SHR-Tg19. Together with lower cytosolic hexokinase activity in the left ventricles this result shows a role of functional Cd36 expression in metabolic substrate preference.

Current work also elaborated the role of Cd36 in hypertrophic and pro-arrhythmic responses mediated by β-adrenergic signaling system as it demonstrated upregulation of connexin 43, RhoA and ERK1 in SHR-Tg19 compared to SHR. We suggest that diminished association of Gβ subunit with lipid raft membranes may contribute to enhanced AC activity observed in SHR-Tg19.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY / REFERENCES

Abumrad, N.A., el-Maghrabi, M.R., Amri, E.Z., Lopez, E., Grimaldi, P.A., 1993. J. Biol. Chem. 268, 17665–17668.

Aitman, T.J., Glazier, A.M., Wallace, C.A., Cooper, L.D., Norsworthy, P.J., Wahid, F.N., Al-Majali, K.M., Trembling, P.M., Mann, C.J., Shoulders, C.C., Graf, D., St. Lezin, E., Kurtz, T.W., Kren, V., Pravenec, M., Ibrahimi, A., Abumrad, N.A., Stanton, L.W., Scott, J., 1999. Nat. Genet. 21, 76–83.

Allen, J.A., Yu, J.Z., Donati, R.J., Rasenick, M.M., 2005. Mol. Pharmacol. 67, 1493–1504.

Atlante, A., Seccia, T.M., De Bari, L., Marra, E., Passarella, S., 2006. Int. J. Mol. Med. 18, 177–186.

Calvo, S.E., Compton, A.G., Hershman, S.G., Lim, S.C., Lieber, D.S., Tucker, E.J., Laskowski, A., Garone, C., Liu, S., Jaffe, D.B., Christodoulou, J., Fletcher, J.M., Bruno, D.L., Goldblatt, J., Dimauro, S., Thorburn, D.R., Mootha, V.K., 2012. Sci. Transl. Med. 4, 118ra10.

Campbell, S.E., Tandon, N.N., Woldegiorgis, G., Luiken, J.J.F.P., Glatz, J.F.C., Bonen, A., 2004. J. Biol. Chem. 279, 36235–36241.

Chen, H., Yang, J., Low, P.S., Cheng, J.-X., 2008. Biophys. J. 94, 1508–1520.

Chouchani, E.T., Pell, V.R., Gaude, E., Aksentijević, D., Sundier, S.Y., Robb, E.L., Logan, A., Nadtochiy, S.M., Ord, E.N.J., Smith, A.C., Eyassu, F., Shirley, R., Hu, C.-H., Dare, A.J., James, A.M., Rogatti, S., Hartley, R.C., Eaton, S., Costa, A.S.H., Brookes, P.S., Davidson, S.M., Duchen, M.R., Saeb-Parsy, K., Shattock, M.J., Robinson, A.J., Work, L.M., Frezza, C., Krieg, T., Murphy, M.P., 2014. Nature 515, 431–435.

Christe, M.E., Rodgers, R.L., 1994. J. Mol. Cell. Cardiol. 26, 1371–1375.

Drover, V.A., Abumrad, N.A., 2005. Biochem. Soc. Trans. 33, 311–315.

Enserink, J.M., Christensen, A.E., Rooij, J. de, Triest, M. van, Schwede, F., Genieser, H.G., Døskeland, S.O., Blank, J.L., Bos, J.L., 2002. Nat. Cell Biol. 4, 901–906.

Hanse, E.A., Ruan, C., Kachman, M., Wang, D., Lowman, X.H., Kelekar, A., 2017. Oncogene 36, 3915–3924.

Head, B.P., Patel, H.H., Insel, P.A., 2014. Biochim. Biophys. Acta 1838.

Hsieh, F.-L., Turner, L., Bolla, J.R., Robinson, C.V., Lavstsen, T., Higgins, M.K., 2016. Nat. Commun. 7, 12837.

Iritani, N., Fukuda, E., Nara, Y., Yamori, Y., 1977. Atherosclerosis 28, 217–222.

Isomaa, B., Almgren, P., Tuomi, T., Forsén, B., Lahti, K., Nissén, M., Taskinen, M.R., Groop, L., 2001. Diabetes Care 24, 683–689.

Jüllig, M., Hickey, A.J.R., Chai, C.C., Skea, G.L., Middleditch, M.J., Costa, S., Choong, S.Y., Philips, A.R.J., Cooper, G.J.S., 2008. PROTEOMICS 8, 2556–2572.

King, K.L., Stanley, W.C., Rosca, M., Kerner, J., Hoppel, C.L., Febbraio, M., 2007. Arch. Biochem. Biophys. 467, 234–238.

Klevstig, M., Manakov, D., Kasparova, D., Brabcova, I., Papousek, F., Zurmanova, J., Zidek, V., Silhavy, J., Neckar, J., Pravenec, M., Kolar, F., Novakova, O., Novotny, J., 2013. Pflugers Arch. 465, 1477–1486.

Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M., Bertoglio, J., 1996. EMBO J. 15, 510–519.

Lips, D.J., Bueno, O.F., Wilkins, B.J., Purcell, N.H., Kaiser, R.A., Lorenz, J.N., Voisin, L., Saba-El-Leil, M.K., Meloche, S., Pouysségur, J., Pagès, G., De Windt, L.J., Doevendans, P.A., Molkentin, J.D., 2004. Circulation 109, 1938–1941.

Matasova, L.V., Popova, T.N., 2008. Biochem. Biokhimiia 73, 957–964.

McFarlan, J.T., Yoshida, Y., Jain, S.S., Han, X.-X., Snook, L.A., Lally, J., Smith, B.K., Glatz, J.F.C., Luiken, J.J.F.P., Sayer, R.A., Tupling, A.R., Chabowski, A., Holloway, G.P., Bonen, A., 2012. J. Biol. Chem. 287, 23502–23516.

Neckář, J., Šilhavy, J., Zídek, V., Landa, V., Mlejnek, P., Šimáková, M., Seidman, J.G., Seidman, C., Kazdová, L., Klevstig, M., Novák, F., Vecka, M., Papoušek, F., Houštěk, J., Drahota, Z., Kurtz, T.W., Kolář, F., Pravenec, M., 2012. Physiol. Genomics 44, 173–182.

Nielsen, T.T., Støttrup, N.B., Løfgren, B., Bøtker, H.E., 2011. Cardiovasc. Res. 91, 382–391.

Oh, P., Schnitzer, J.E., 2001. Mol. Biol. Cell 12, 685–698.

Okamoto, K., Aoki, K., 1963. Jpn. Circ. J. 27, 282–293.

Ostrom, R.S., Insel, P.A., 2004. Br. J. Pharmacol. 143, 235–245.

Pitcher, J.A., Inglese, J., Higgins, J.B., Arriza, J.L., Casey, P.J., Kim, C., Benovic, J.L., Kwatra, M.M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., 1992. Science 257, 1264–1267.

Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W.J., Pandolfi, P.P., 2010. Nature 465, 1033–1038.

Pontier, S.M., Percherancier, Y., Galandrin, S., Breit, A., Galés, C., Bouvier, M., 2008. J. Biol. Chem. 283, 24659–24672.

PrabhuDas, M.R., Baldwin, C.L., Bollyky, P.L., Bowdish, D.M.E., Drickamer, K., Febbraio, M., Herz, J., Kobzik, L., Krieger, M., Loike, J., McVicker, B., Means, T.K., Moestrup, S.K., Post, S.R., Sawamura, T., Silverstein, S., Speth, R.C., Telfer, J.C., Thiele, G.M., Wang, X.-Y., Wright, S.D., El Khoury, J., 2017. J. Immunol. Baltim. Md 1950 198, 3775–3789.

Pravenec, M., Landa, V., Zidek, V., Musilova, A., Kren, V., Kazdova, L., Aitman, T.J., Glazier, A.M., Ibrahimi, A., Abumrad, N.A., Qi, N., Wang, J.M., St. Lezin, E.M., Kurtz, T.W., 2001. Nat. Genet. 27, 156–158.

Rao, R.H., 1993. Diabetes 42, 1364–1371.

Reaven, G.M., Chang, H., Hoffman, B.B., Azhar, S., 1989. Diabetes 38, 1155–1160.

Rubin, D., Ismail-Beigi, F., 2003. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 285, C377–C383.

Samovski, D., Sun, J., Pietka, T., Gross, R.W., Eckel, R.H., Su, X., Stahl, P.D., Abumrad, N.A., 2015. Diabetes 64, 353–359.

Shah, A., Chen, D., Boda, A.R., Foster, L.J., Davis, M.J., Hill, M.M., 2015. Nucleic Acids Res. 43, D335–D338.

Somekawa, S., Fukuhara, S., Nakaoka, Y., Fujita, H., Saito, Y., Mochizuki, N., 2005. Circ. Res. 97, 655–662.

Sutherland, E., Dixon, B.S., Leffert, H.L., Skally, H., Zaccaro, L., Simon, F.R., 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 8673–8677.

Tang, W.J., Gilman, A.G., 1991. Science 254, 1500–1503.

Tarze, A., Deniaud, A., Le Bras, M., Maillier, E., Molle, D., Larochette, N., Zamzami, N., Jan, G., Kroemer, G., Brenner, C., 2007. Oncogene 26, 2606–2620.

Valentine, C.D., Haggie, P.M., 2011. Mol. Biol. Cell 22, 2970–2982.

You, M., Fischer, M., Cho, W.K., Crabb, D., 2002. Arch. Biochem. Biophys. 398, 79–86.

Zheng, Y.Z., Berg, K.B., Foster, L.J., 2009. J. Lipid Res. 50, 988–998.

7 SEZNAM PUBLIKACÍ/LIST OF PUBLICATIONS

PUBLICATIONS RELATED TO THIS THESIS

Manakov, D., Ujčíková, H., Pravenec, M. and Novotný, J. (2016) Alterations in the cardiac proteome of the spontaneously hypertensive rat induced by transgenic expression of CD36. *Journal of Proteomics* 145:177-86 (IF = 3.722).

Manakov, D., Kolar, D., Žurmanová, J., Pravenec, M., and Novotný, J. (2018). Changes in the activity of some metabolic enzymes in the heart of SHR rat incurred by transgenic expression of CD36. *Journal of Physiology and Biochemistry* [*In press*] (IF = 2.444).

PUBLICATIONS UNRELATED TO THIS THESIS

Klevstig, M., **Manakov, D.**, Kašparová, D., Brabcová, I., Papoušek, F., Žurmanová, J., Zídek, V., Šilhavý, J., Neckář, J., Pravenec, M., Kolář, F., Nováková, O., Novotný, J. (2013) Transgenic rescue of defective Cd36 enhances myocardial adenylyl cyclase signaling in spontaneously hypertensive rats. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 465(10): 1477–1486 (IF = 2.765).

CURRICULUM VITAE

Mgr. Dmitry Manakov
dmitry.manakov@natur.cuni.cz

Education

Ph.D.	2013 – now	Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic Supervisor: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc
M.Sc.	2010 – 2012	Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic Supervisor: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc
B.Sc.	2006 – 2010	Faculty of Biology, Ural State University, Yekaterinburg, Russia

Grants

S.T.A.R.S. (Supporting Talented PhD Research Students) grant holder
Period: 2013-2017

Charles University Agency Grant No: 1016214
Period: 2014-2016
Title: Adrenergic signaling in myocardium of transgenic rat strain SHR-Tg19

Charles University Agency Grant No: 478417
Period: 2018-current
Title: A study of the role of RNA demethylase FTO in astrocyte energy metabolism

Conference participation

02/2013 89st Physiological Days, Praha, Poster session
10/2015 KEK Buchlovice, Poster session
10/2016 KEK Stará Lesná, Poster Session
10/2017 KEK Kutná Hora, Organization team, Poster session