

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Biologie
Buněčná a vývojová biologie



Bc. Klára Hahnová

Studium β -adrenergní signalizace v myokardu potkana během adaptace na
chronickou hypoxii

Myocardial β -adrenergic signaling during adaptation of rats
to chronic hypoxia

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Jiří Novotný DSc.

Praha, 2011

Prohlášení, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala sama za použití uvedených literárních zdrojů. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne 29. srpna 2011

Klára Hahnová

Ráda bych na tomto místě podkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za jeho odbornou pomoc a vedení při sepsání této diplomové práce, dále také všem svým kolegyním za vytvoření příjemného pracovního prostředí v laboratoři. Současně bych ráda podkovala svým rodičům a celé rodině za umožnění studia na vysoké škole a v neposlední řadě děkuji za podporu také svým přátelům.

Abstrakt

Endogenní odolnost myokardu v i akutnímu ischemickému/reperfúznímu poškození lze zvýšit adaptací srdce na různé formy chronické hypoxie. Chronická hypoxie vyvolává širokou škálu adaptivních změn v myokardu, které by mohly být považovány za kardioprotektivní, ale přesný mechanismus zvýšené ischemické tolerance je zatím neznámý. Různé studie naznačují, že právě uvolnění katecholaminu a jejich ovlivnění β -adrenergní signalizace po adaptaci na chronickou hypoxii přispívá ke kardioprotekci.

V této práci jsme se zaměřili na charakterizaci β -adrenergních receptorů (β -ARs) v myokardech potkanů po jejich adaptaci na tři různé typy hypoxických podmínek: 1. intermitentní normobarická hypoxie - INH/R (23 hod. hypoxie, 1 hod. reoxygenace), 2. intermitentní normobarická hypoxie - INH (8 hod. hypoxie, 16 hod. normoxie), 3. kontinuální normobarická hypoxie - CNH (24 hod. hypoxie). Porovnávali jsme, jak jednotlivé hypoxické modely ovlivní především celkové množství β -adrenergních receptorů a procentuální zastoupení jednotlivých podtypů (β_1 - a β_2 -ARs) v levých a pravých komorách oproti kontrolním normoxickým potkanům.

Ukázalo se, že INH model nemá žádný vliv na β -ARs ani v jedné komoře. Na druhou stranu, adaptace na INH/R a CNH prokázala signifikantní pokles v celkovém množství β -adrenergních receptorů v pravých komorách, a to o více než ¼ oproti kontrole. Naše výsledky ukázaly, že různé modely adaptace mohou být spojeny především s poklesem β_1 -ARs v pravých komorách, což by mohl být jeden z mechanismů, kterým by se účastnily navození kardioprotektivního fenotypu. Vzhledem k nepříliš významným rozdílům v naměřených hodnotách není však možné určit, který z těchto dvou modelů by byl prospěšnější.

Klíová slova: β -adrenergní receptory, ischemické/reperfúzní poškození, chronická hypoxie, kardioprotekce

Abstract

Endogenous cardiac protection against acute ischemia/reperfusion injury can be increased by cardiac adaptation to various forms of chronic hypoxia. Chronic hypoxia induces a large variety of adaptive changes in the myocardium that could be considered as protective, but the exact mechanism of increased ischemic tolerance is unknown. Different studies suggest that catecholamine release and their effect on β -adrenergic signaling after adaptation to chronic hypoxia contributes to cardioprotection.

In this study we focused on characterization of β -adrenergic receptors (β -ARs) in the myocardium of rats after adaptation to three different hypoxic conditions: 1. intermittent normobaric hypoxia - INH/R (23 h hypoxia, 1 h reoxygenation), 2. intermittent normobaric hypoxia - INH (8 h hypoxia, 16 h normoxia), 3. continuous normobaric hypoxia - CNH (24 h hypoxia). We compared how each hypoxic model affects the total number of β -adrenergic receptors and proportion of individual subtypes (β_1 - and β_2 -ARs) in the left and right ventricles compared control normoxic rats.

The INH model had apparently no effect on β -ARs in either ventricles. On the other hand, adaptation to INH/R and CNH was accompanied by a significant decrease (by about 25%) in the total number of β -adrenergic receptors in the right ventricles. Our present result demonstrated that these models could lead to downregulation of β_1 -ARs in right ventricles, which may represent one of the mechanisms involved in the development of a cardioprotective phenotype. However, due to not very significant differences in the determined values it is not possible to decide which of these two models would be more beneficial.

Key words: β -adrenergic receptors, ischemia/reperfusion injury, chronic hypoxia, cardioprotection

Obsah

1	Seznam použitých zkratk	8
2	Seznam použitých termín	10
3	Úvod	12
4	Adrenergní receptory	13
5	-adrenergní receptory	13
5.1	Receptory spojené s G-proteiny	14
5.2	G-proteiny a signální dráhy -adrenergních receptor	14
5.3	Lokalizace -adrenergních receptor	16
5.4	Desensitizace -ARs	16
5.5	Úinky dlouhodobé stimulace -ARs	18
5.5.1	Apoptóza kardiomyocyt	18
5.5.2	Příčiny kardiomyocyt	20
5.5.3	p38 MAPK - apoptóza při příčiny kardiomyocyt ?	20
6	Srdce a onemocnění	21
7	Kardioprotekce	21
7.1	Preconditioning	22
7.2	Chronická hypoxie	22
7.3	Molekulární mechanismy kardioprotekce	24
7.3.1	ATP-dependentní draslíkové kanály (K_{ATP})	24
7.3.2	Reaktivní formy kyslíku (ROS)	25
7.3.3	Proteinkináza C (PKC)	25
8	Membránové mikrodomény (rafty)	26
9	Cíle diplomové práce	28
10	Materiál a metody	29
10.1	Laboratorní zvířata	29
10.2	Usmrcení potkan a odebrání tkán	29
10.3	Homogenizace a frakcionace	29
10.3.1	Optimalizace způsobu přípravy vzork	29
10.3.2	Příprava vlastních vzork N, INH/R, INH a CNH	32
10.3.3	Izolace membránových raft	32
10.4	Stanovení protein BCA metodou	34

10.5	Vazebné pokusy	36
10.5.1	Teoretický úvod	36
10.5.2	Optimalizace vazebných pokusu.....	36
10.5.3	Satura ní pokusy.....	38
10.5.4	Kompeti ní pokusy	39
10.5.5	Zpracování dat	39
10.6	SDS-PAGE elektroforéza.....	40
10.7	Western Blotting a imunodetekce	43
11	Výsledky.....	45
11.1	Hmotnostní parametry	45
11.2	Optimalizace zp sobu p ípravy vzork	46
11.3	Optimalizace vazebných pokus	47
11.4	Charakterizace -adrenergních receptor po adaptaci potkan na daný model hypoxie.....	48
11.4.1	Satura ní pokusy.....	48
11.4.2	Kompeti ní pokusy	52
11.4.3	SDS-PAGE elektroforéza, Western blotting a imunodetekce	56
11.5	Membránové mikrodomény (rafty).....	58
12	Diskuze.....	63
13	Záv r.....	69
14	Seznam pouflité literatury	70

1 Seznam použitých zkratek

A	absorbance
AC	adenylátcykláza
Akt	faktor p effivání (známý jako proteinkináza B)
AP-2	adaptorový protein 2
ARs	adrenergní receptory
-ARK1	-adrenergní receptorová kináza 1
B	mnořství specificky vázaného radioligandu
B _{max}	celkový počet vazebných míst ve tkáni
Bad	proapoptotický protein Bcl-2 rodiny
BCA	kyselina bicinchoninová
Bcl	rodina apoptotických a antiapoptotických protein
BSA	hořví sérový albumin
BW	hmotnost tkáně
C	celková vazba radioligandu
CaMK II	Ca ²⁺ /kalmmodulin-dependentní kináza II
cAMP	3',5'-cyklický adenosinmonofosfát
cMyBP-C	srdeční myosin-vázající protein C
CNH	kontinuální normobarická hypoxie
CREB	transkripční faktor aktivovaný zvýšenou hladinou cAMP
Epac	výměník guaninových nukleotidů aktivovaný cAMP
ERK	extracelulárním signálem regulovaná proteinkináza
F	koncentrace volného radioligandu
G _i	inhibiční G-protein
G _s	stimulační G-protein
G _{αx}	-podjednotka p řísle-ného G-proteinu
G	-podjednotka p řísle-ného G-proteinu
GPI	glykosylfosfatidyl-inositolová kotva
GPCRs	receptory sp řafené s G-proteiny
GSK-3	glykogensyntáza-kináza 3
GTP	guanosintrifosfát
GRK	G-protein-vázající receptorová kináza

HDAC	histon deacetyláza
HM	hrubé membrány
ICER	asný represor transkripce indukovaný cAMP
INH	intermitentní normobarická hypoxie
JNK	c-Jun N-terminální kináza
K_{ATP}	ATP-dependentní draslíkové kanály
K_d	rovnovážná disocia ní konstanta
K_i	zdánlivá disocia ní konstanta
KOR	-opioidní receptor
LTCC	Ca^{2+} kanál L-typu
LV	levá komora
M_r	relativní molekulová hmotnost
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MITO	mitochondrie
mPTP	mitochondriální p echodn propustný pór
N	normoxie
N_s	nespecifická vazba
PEI	polyethylenimin
PI3K	fosfoinositid-3 kináza
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C
PLN	fosfolamban
PM	plazmatická membrána
ROS	reaktivní formy kyslíku
RapGTP	Ras-p íbuzný GTP-vazebný protein
RV	pravá komora
S	supernatant
SDS	dodecylsulfát sodný
SERCA	Ca^{2+} ATPáza sarkoplazmatického retikula
SR	sarkoplazmatické retikulum
RyR	ryadinový receptor
T	koncentrace radioligandu p ed inkubaci
TNI	troponin I

2 Seznam použitých termínů

antioxidant	látko, jejíř molekuly omezují aktivitu kyslíkových radikál
apoptóza	programovaná bun ěná smrt
arterioskleróza	kornat ění tepen v d sledku ukládání tukových látek do st ěny tepny
arytmie	porucha srde ěního rytmu
autakoidy	látky t ělu vlastní, které se ú astní na humorální regulaci organismu
desensitizace	snířená schopnost receptor ě reagovat na aktivaci agonistou
hemodynamika	studium vlivu fyzikálních vlastností krve a cěv na tlak krve a její proud ění cěvami
homeostáze	stálost vnit ěního prost edí
hyperkapnie	vzestup koncentrace oxidu uhlí itého v krvi
hyperlipidémie	zvý ěná hladiny tuku v krvi
hypertenze	vysoký krevní tlak
hypertrofie	zv ět ění orgánu nebo jeho ásti
hypobarie	pokles atmosférického tlaku
hypoxie	snířený obsah kyslíku
chronotropie	ovlivn ění srde ění frekvence
inotropie	ovlivn ění síly srde ění kontrakce
intermitentní	p ěru ěvaný
ischemie	místní nedokrevnost tkáńí a orgán
kardiomyocyt	bun ěka srde ění svaloviny
kardioprotekce	opat ění vedoucí k ochran ě myokardu a zmen ění nebo prevenci po ěkození myokardu
koronární okluze	uzáv ěr koronární tepny
lusitropie	ovlivn ění srde ění relaxace
myokard	srde ění svalovina
normoxie	normální obsah kyslíku
nekróza	náhodná smrt bun ěk v řivém organismu
permanentní	nep ětrřitý, stáły
peroxidace	oxida ění degradace lipid

preconditioning	ochranný adaptační mechanismus vyvolaný krátkodobou ischemií spojenou s reperfúzí
rexygenace	obnovení dodávky kyslíku po předchozí hypoxii
reperfuze	obnovení průtoku krve ischemickou tkání nebo orgánem
viabilita	životoschopnost

3 Úvod

Srdeční choroby patří v současné době k nejastjším a inám onemocn ní a úmrtí obyvatel západních zemí. Hledání protektivních mechanism , které by se podílely na zvýení srde ní tolerance k ischemickému/reperfúznímu po-kození, se v dne ní dob stalo hlavním cílem celé ady experimentálních a klinických laborato í. Je známo, že adaptace na chronickou hypoxii mezi tyto kardioprotektivní mechanismy patří. Adaptace na chronickou hypoxii vede ke zvýené aktivit sympatického nervového systému, tedy ke zvýení hladiny katecholamin v organismu. Adrenergní receptory, které jsou tmito katecholaminy aktivované, hrají dleflitou roli ve fyziologické odpov dí související se srde ní kontrakcí, hypertrofií a vzru-ivostí myokardu. etné studie prokázaly, že aktivace adrenergní signalizace je spojená s patogenezí srde ního po-kození b hem ischemie. Na druhou stranu se za ínají objevovat práce, které ukazují na dleflitou roli katecholamin v indukci zvýení srde ní tolerance p ed akutní ischemii a reperfúzi. Proto se zdá, že adrenergní signalizace, a to p edevším -adrenergní signalizace, m že zprost edkovávat jak kardioprotekci, tak po-kození myokardu v d sledku akutní ischemie.

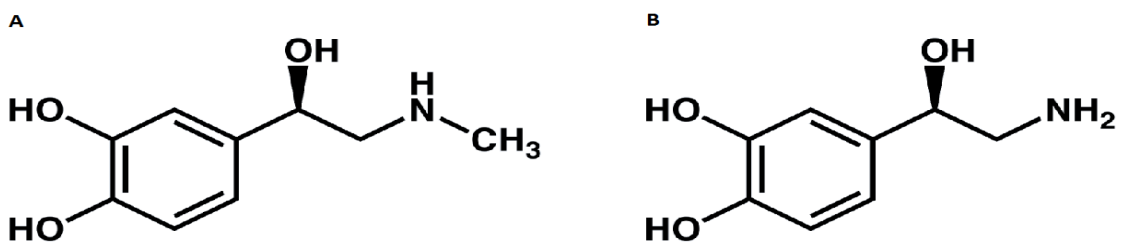
P edm tem zájmu této diplomové práce byla charakterizace -adrenergních receptor v hrubých membránách izolovaných z pravých a levých komor potkan adaptovaných na t i r zné typy hypoxických podmínek. Výsledky byly porovnávány s výsledky získanými stejným postupem u potkan chovaných v normoxických podmínkách.

4 Adrenergní receptory

-ARs představují jednu ze dvou skupin adrenergních receptorů, druhou jsou β -ARs. Do dnešní doby bylo identifikováno 9 genů kódujících adrenergní receptory: $1A$ -AR, $1B$ -AR, $1D$ -AR, $2A$ -AR, $2B$ -AR, $2C$ -AR, 1 -AR, 2 -AR a 3 -AR (Kobilka, 2011). V kardiomyocytech dochází k expresi nejméně pěti z nich (podtypy α -ARs a 1 -ARs), exprese 2 -ARs nebyla u většiny živočišných druhů zjištěna (Amin et al., 2011). Poměr α -ARs k β -ARs se v lidském srdci pohybuje okolo 10:1, z čehož vyplývá, že na rozdíl od β -ARs je zde pouze malý počet α -ARs (Rockman et al., 2002). Za normálního stavu je u člověka poměr mezi 1 - a 2 -ARs v srdečních síních 7:3, zatímco v komorách 4:1. Na druhou stranu celkový počet α -ARs se zdá být jak v komorách, tak v síních rovnoměrně rozložený (Brodde and Michel, 1999). V selhávajícím srdci je ale 35-40% z celkového počtu α -ARs tvořeno 2 -ARs, a to v důsledku selektivního poklesu 1 -ARs (Bristow, 2000).

5 β -adrenergní receptory

β -ARs tvoří rozhraní mezi kardiovaskulárním systémem a sympatickým nervovým systémem. 1 - a 2 -AR signalizace představuje v lidském srdci jeden z nejúčinnějších regulátorů srdeční funkce. Důležitou roli v tomto systému hrají sympatické neurotransmitery - adrenalin, což je neselektivní agonista 2 -ARs a noradrenalin, což je neselektivní agonista 1 -ARs (Naga Prasad et al., 2001; Skeberdis, 2004) (Obrázek 1). Aktivace β -ARs představuje základní mechanismus pro zvyšování srdečního výkonu při zátěži a ve stresu (Xiang, 2011). Zmíněnou β -AR signalizaci hrají důležitou roli u chronického srdečního selhání (Brodde et al., 2006).



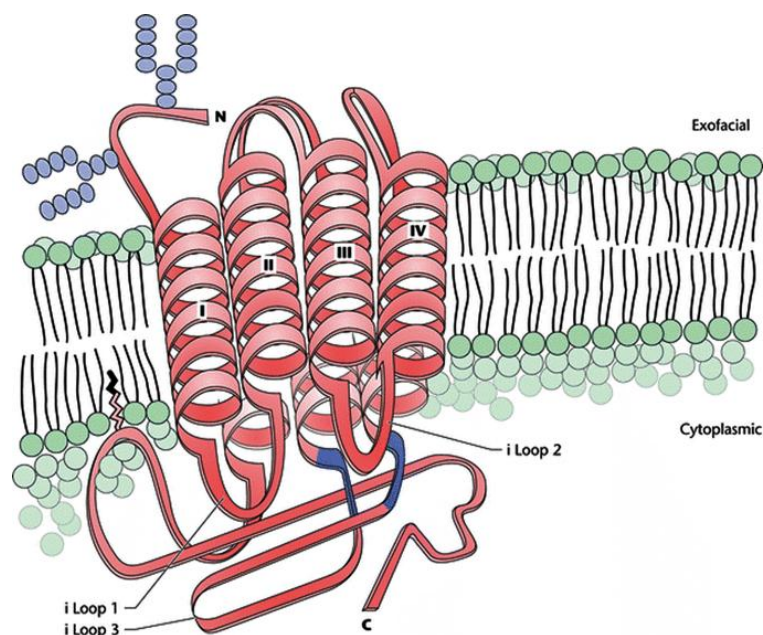
Obrázek 1. Katecholaminy - A) adrenalin; B) noradrenalin

5.1 Receptory spřažené s G-proteiny

-ARs jsou jednou z nejpodrobněji prostudovaných skupin z rodiny receptorů spřažených s trimerními G-proteiny (GPCRs - *šG-protein coupled receptors*) (Kobilka, 1992). GPCRs jsou pozoruhodně v-estrané signální molekuly. Členové této velké rodiny membránových proteinů reagují na strukturně odlišné ligandy a jsou zodpovědné za většinu buněčných odpovědí v reakci na hormony a neurotransmitery (Kobilka, 2002; Rosenbaum et al., 2009). Všechny GPCRs sdílejí společný strukturní motiv a to sedm α -helikálních transmembránových segmentů, které jsou propojené těmi extracelulárními a těmi intracelulárními smyčkami. N-konec, který je obvykle glykosylovaný, směřuje extracelulárně, zatímco C-konec (často označovaný jako C-koncový ocas) směřuje do cytoplazmy (Morris and Malbon, 1999) (Obrázek 1.2). Jednotlivé GPCRs mohou přivádět signál prostřednictvím působení různých G-proteinů, ale také přes G-protein nezávislé dráhy (Kobilka and Deupi, 2007).

5.2 G-proteiny a signální dráhy β -adrenergických receptorů

Jak β_1 - tak β_2 -ARs jsou v srdci spřažené se stimulačními G-proteiny (G_s). Interakce ligandem aktivovaného receptoru s G-proteinem vede k uvolnění aktivované G_s podjednotky, která je zodpovědná za aktivaci adenylátcyklázy (AC). Aktivace AC vede k produkci druhého posla cAMP, jehož zvýšená koncentrace má za následek aktivaci cAMP-dependentní PKA (Zheng et al., 2004). Zvýšená aktivita PKA vede k fosforylaci různých substrátů, od receptorů a jejich přidružených partnerů k bílkovinám, které se podílejí na zvýšené kontraktilitě a regulaci srdeční innosti (Xiang, 2011). Příkladem těchto substrátů je například L-typ vápenatého kanálu (LTCC), fosfolamban (PLN), ryadinový receptor (RyR) nebo troponin I (TNI), které se podílejí na zvýšení chronotropního, inotropního a lusitropního úinku (Freedman and Lefkowitz, 2004). Po fosforylaci LTCC proteinkinázou A dochází k vtoku Ca^{2+} do kardiomyocytů, což má za následek otevření RyR a uvolnění Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula. Takto zvýšená koncentrace intracelulárního Ca^{2+} vede ke kontrakci. Ta je poté rychle následovaná relaxací v důsledku přeerpání Ca^{2+} zpět do sarkoplazmatického retikula přes SR Ca^{2+} -ATPázu, která se otvírá po fosforylaci fosfolambanu PKA, a ven z buňky přes sarkolematický Na^+/Ca^{2+} výměník (Grimm and Brown, 2010).



Obrázek . 2: Schematické znázornění topologie adrenergických receptorů na základě informací získaných ze studia β_2 -AR. N-konec je glykosylovaný a směřuje extracelulárně. Je zde 7 (I-VII) transmembránových domén s α -helikálním charakterem, které jsou propojené těmito vnitřními (i loop 1, 2, 3) a těmito vnějšími smyčkami. C-konec je cytoplazmatický. Oblast 3 vnitřní smyčky, která je zvýrazněna modře, interaguje s G-proteinem (Malbon and Wang, 2005).

Genetické a farmakologické přístupy prokázaly, že to jsou především β_1 -ARs, které hrají rozhodující úlohu při zprostředkování srdeční inotropní a chronotropní odpovědi na katecholaminy. β_2 -ARs sice také zvyšují srdeční funkci přes cAMP signální dráhu, ale jejich schopnost aktivovat také neklasickou signální dráhu svědčí o funkční odlišnosti od β_1 -ARs. (Lohse et al., 2003). β_2 -ARs vázou kromě G_s proteinu také pertussis toxin-senzitivní inhibiční G-proteiny (G_i), jejichž G_i podjednotka může inhibovat adenylátcyklázu, a tím inhibovat syntézu cAMP a aktivaci PKA. Toto propojení vyžaduje fosforylaci β_2 -ARs prostřednictvím cAMP-dependentní PKA. G_i podjednotka G_i proteinu po aktivaci stimuluje MAP kinázovou kaskádu a to prostřednictvím dráhy zahrnující nerekceptorovou tyrozin kinázu c-Src a malý G-protein Ras (Daaka et al., 1997).

5.3 Lokalizace β -adrenergických receptorů

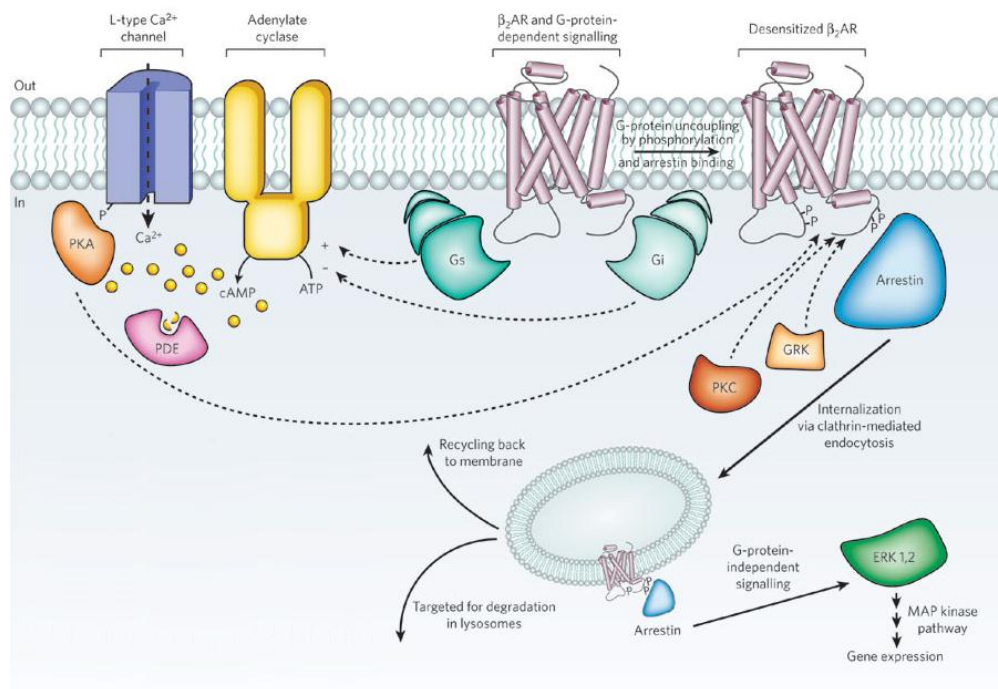
V normálních kardiomyocytech jsou β_2 -ARs lokalizované výhradně hluboko v transverzálních tubulech, zatímco β_1 -ARs jsou distribuovány po celém buněčném povrchu. Redistribuce β_2 -ARs z transverzálních tubul na buněčný povrch byla objevena v kardiomyocytech izolovaných z potkanů, u nichž došlo k srdečnímu selhání. Tato redistribuce umožní u β_2 -ARs regulovat cAMP signalizaci jak v tubulech, tak na buněčném povrchu, tedy po celém buněčném povrchu jako tomu je u β_1 -AR (Nikolaev et al., 2010).

5.4 Desensitizace β -ARs

Experimentální studie ukázaly, že trvale zvýšená hladina katecholaminů má za následek redukcii β_1 -ARs o 50%, zatímco hladina β_2 -ARs zůstává beze změny (Kiuchi et al., 1993; Lohse et al., 2003). Trvalá stimulace β -ARs vede také k desensitizaci těchto receptorů, což je snížená schopnost receptorů reagovat na nadměrnou stimulaci agonistou (Ferguson et al., 1996). Molekulární mechanismy vedoucí k rychlé desensitizaci β -ARs vyflaďují změny v jejich fungování, která spoívá v rozpuštění receptorů od jejich signálních G-proteinů (Hausdorff et al., 1990). K tomu dochází poté, co je receptor fosforylován buď druhým poslem (cAMP, DAG) aktivovanou proteinkinázou (PKA, PKC) (fosforylace C-koncové části těchto intracelulární smyčky a cytoplazmatického C-konce receptoru) nebo G-protein-vázající receptorovou kinázou (GRK) (fosforylace cytoplazmatického C-konce receptoru). Zatímco GRK fosforyluje pouze receptory obsazené agonistou (homologní desensitizace), PKA a PKC fosforylují také nestimulované receptory (heterologní desensitizace). Nejvýznamnější srdeční GRK je GRK 2, která je také známá jako β -adrenergický receptorová kináza 1 (β -ARK1) (Freedman et al., 1995; Madamanchi, 2007).

Fosforylace C-konce β -ARs prostřednictvím GRKs umožňuje vazbu β -arrestinu, čímž se stericky zabrání další interakci mezi β -ARs a G-proteiny a dochází k desensitizaci. Vazba β -arrestinu umožňuje translokaci klatrinu a adaptorového proteinu AP-2 z cytosolu na membránu, což vede k internalizaci receptoru prostřednictvím klatrinových váček (Marchese et al., 2003; Lefkowitz and Whalen,

2004). Nedávné studie ale ukázaly, že kromě úasti při endocytóze může β -arrestin fungovat jako zprostředkovatel G-protein nezávislé signalizace, při níž vytváří jakési lepení pro různé signální molekuly. Mezi n patří například malé GTP-vazebné proteiny, ubikvitinligáza Mdm2 nebo lenové MAPK (ERK) signální dráhy (Ferguson, 2001; Lefkowitz and Shenoy, 2005; Lefkowitz et al., 2006) (Obrázek . 3).



Obrázek . 3: Rozmanité signální dráhy regulované β_2 -adrenergním receptorem (β_2 -AR)

β_2 -AR může aktivovat G_s a G_i proteiny, což vede k uvolnění $G\alpha_s$ a $G\alpha_i$ podjednotky, které rovněž ovlivní adenylátcyklázu (AC). Adenylátcykláza generuje cyklický AMP (cAMP), který aktivuje proteinkinázu A (PKA). PKA reguluje aktivitu různých buněčných proteinů, včetně L-typ Ca^{2+} kanálu a β_2 -AR. cAMP je regulováno specifickou fosfodiesterázou (PDE). Aktivace β_2 -AR také vede k jeho fosforylaci prostřednictvím G-protein-vázající receptorové kinázy (GRK) a k následné vazbě arrestinu. Arrestin je signální a regulační protein, který podporuje aktivaci extracelulárním signálem regulované kinázy (ERK), zabráňuje aktivaci G-proteinů a podporuje internalizaci receptoru prostřednictvím klatrinových váček. PKC, proteinkináza C. (Rosenbaum et al., 2009).

5.5 Účinky dlouhodobé stimulace β -ARs

Po áte ní uvoln ní katecholamin sympatickým nervovým systémem má d leflitý vliv na biologii kardiomyocyt vedoucí ke zvý-ené kontraktilit . Nicmén chronické zvý-ení sympatické aktivity má nep íznivé ú inky na srdce (Rona, 1985). Dlouhodobá stimulace β_1 -ARs a β_2 -ARs ale vyvolává protich dné ú inky na osud kardiomyocyt . Zatímco β_1 -ARs jsou zodpov dné za hypertrofii a indukci proapoptotických signál , tudífl apoptózu kardiomyocyt vedoucí k po-kození srdce (Wang and Dhalla, 2000), specifické propojení β_2 -ARs s G_i má naopak antiapoptotické ú inky, které p íspívají k p eflívání bun k (Shizukuda and Buttrick, 2002).

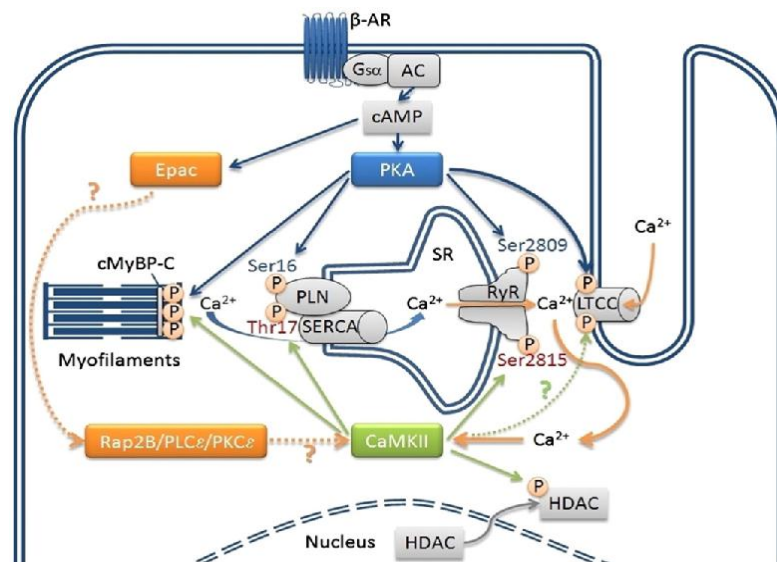
5.5.1 Apoptóza kardiomyocytů

Apoptóza kardiomyocyt je dokumentovaná jako d sledek ischemického/reperfúzního po-kození srdce a jako potenciální faktor p íspívající k srde ní dysfunkci, spojené s mechanickým stresem a hemodynamickým p etíflením, a k srde nímu selhání (Haunstetter and Izumo, 1998). Bylo objeveno n kolik mechanism vedoucích k apoptóze indukované prost ednictvím β -ARs signalizace. Jedním z nich je zvý-ená exprese ICER protein . Bylo prokázáno, fle zvý-ená hladina t chto protein v kardiomyocytech vyvolává patologické d sledky (Tomita et al., 2003). Pro expresi ICER protein je klí ovou molekulou práv PKA, která je aktivovaná β -ARs signalizací. PKA aktivuje v jád e transkrip ní faktor CREB, který je zodpov dný za transkripci ICER protein (Molina et al., 1993). K apoptóze indukované ICER proteiny dochází v d sledku sníflené exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2 (Ding et al., 2005).

Dal-ím mechanismem vedoucím k indukci apoptózy se ukázala být aktivace CaMKII (Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní kináza II). CaMKII je aktivovaná na základ zvý-ené koncentrace intracelulárního Ca^{2+} v d sledku dlouhodobé stimulace β_1 -ARs nezávisle na PKA (Zhu et al., 2003b). Objevují se ale studie, které ukazují, fle by CaMKII mohla být aktivovaná také prost ednictvím dráhy cAMP-Epac-RapGTPóPLC- β -PKC- (Oestreich et al., 2009). Zvý-ená exprese srde ní CaMKII (delta C) má za následek apoptózu kardiomyocyt , která souvisí se zvý-eným uvol ováním cytochromu c z mitochondrií (Zhu et al., 2007). Krom ú asti na apoptóze se ale CaMKII uplat uje

také p i regulaci n kterých Ca^{2+} -vazebných protein , jako jsou například PLN a RyR, cofil jsou typické substráty pro fosforylaci zprost edkovanou PKA aktivovanou β -ARs signalizaci (Wegener et al., 1989; Huke and Bers, 2008) (Obrázek . 4).

Bylo prokázáno, že také aktivita dalších kináz aktivovaných po stimulaci β -ARs vede k apoptóze kardiomyocyt . Jednou z nich je c-jun N-terminální kináza (JNK), která patří do velké rodiny mitogenem aktivovaných proteinkináz (MAPKs) (Communal et al., 2000). Po stimulaci β -ARs dochází k její aktivaci prostřednictvím reaktivních forem kyslíku (ROS) a to vede ke spu-t ní vnit ní dráhy apoptózy, tedy k uvol ování cytochromu c z mitochondrií (Remondino et al., 2003). Také glykogensyntáza-kináza 3 (GSK-3) hraje proapoptotickou roli v β -ARs-stimulované apoptóze zprost edkované uvol ováním cytochromu c z mitochondrií (Menon et al., 2007).



Obrázek . 4: Aktivace PKA a CaMKII stimulací β -adrenergních receptor a fosforylace jejich cílových molekul.

Otazníky a p eru-ované áry nazna ují kontroverzní dráhy.

β -AR - β -adrenergní receptor, LTCC - L-typ Ca^{2+} kanálu, G_s - podjednotka stimula ního G proteinu, AC - adenylátcykláza, cAMP - cyklický adenosin monofosfát, PKA - proteinkináza A, Epac - guanin nukleotidový vým ník aktivovaný cAMP, SR - sarkoplazmatické retikulum, PLN - fosfolamban, SERCA - SR Ca^{2+} -ATPáza, RyR - ryadinový receptor, CaMKII - Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní kináza, HDAC - histon deacetyláza, cMyBP-C - srde ní myosin-vázající protein C, Rap2B - Ras-p íbuzný GTP- vazebný protein, PLC - fosfolipáza C ; PKC - proteinkináza C (Grimm and Brown, 2010).

5.5.2 Přežívání kardiomyocytů

Opakovaně byly ukázané β_1 -ARs a β_2 -ARs na přežívání a smrt kardiomyocytů. Pramení z velké části z toho, že β_2 -ARs jsou schopné spolupracovat nejen se stimulačními G-proteiny (G_s), ale také s inhibičními G-proteiny (G_i) (Xiao et al., 1999; Zhu et al., 2001). Toto spojení vede k inhibici adenylátcyklázy přes aktivovanou G_i podjednotku. Z toho vyplývá, že β_2 -AR- G_i signalizace může působit proti β -AR- G_s signalizaci. Uvolněná G_i podjednotka G_i proteinu aktivuje fosfoinositid-3 kinázu (PI3K). PI3K signální dráha, která zahrnuje aktivaci faktoru přežívání Akt (proteinkináza B), je vyvolávána pro ochranu kardiomyocytů před apoptotickými stimuly často spojenými s ischemickým stresem (Chesley et al., 2000). Je známo několik mechanismů, které mohou být zahrnuté v Akt-zprostředkovaném přežívání buněk. Mezi ně patří například fosforylace proapoptického proteinu Bad, uvolnění antiapoptických proteinů Bcl rodiny (Datta et al., 1997) nebo fosforylace a inaktivace kaspázy-9 (Datta et al., 1999).

5.5.3 p38 MAPK - apoptóza či přežívání kardiomyocytů?

Rodina mitogenem-aktivovaných proteinkináz (MAPK) se podílí na regulaci růstu a apoptózy kardiomyocytů. Bylo prokázáno, že stimulace β -ARs vede k aktivaci p38 MAPK, c-jun N-terminální kinázy (JNK) a extracelulárním signálem-regulované kinázy (ERK1/2) v kardiomyocytech dospělých potkanů (Communal et al., 2000).

Velké množství studií ukázalo, že aktivace p38 MAPK, také nazývané stresem-aktivovaná proteinkináza, je spojena s rozvojem srdeční hypertrofie a apoptózou v odpovědi na *in vivo* tlakové přetížení nebo ischemické/reperfúzní poškození (Bogoyevitch et al., 1996). Bylo prokázáno, že u neonatálních kardiomyocytů aktivace p38 MAPK zvyšuje výskyt apoptózy (Wang et al., 1998; Mackay and Mochly-Rosen, 1999). Na druhé straně bylo však také zjištěno, že p38 MAPK v kultivovaných kardiomyocytech dospělých potkanů, která je aktivovaná β_2 -AR- G_i signální dráhou, chrání tyto buňky před apoptózou zprostředkovanou β -AR- G_s signalizací (Communal et al., 2000). Později se však ukázalo, že je to spíše G_s -AC-PKA dráha než G_i signální dráha, která po stimulaci β -ARs aktivuje p38 MAPK. Rozdílné úlohy p38 MAPK na osud kardiomyocytů mohou souviset s heterogenitou této kinázy nebo rozdílnými

experimentálními podmínkami (rozdílný buněný typ nebo odlišný vývojový i diferenciací stav studovaných buněk) (Zheng et al., 2000).

6 Srdeční onemocnění

Hypoxické stavy srdce patří k nebezpečným a nejčastějším onemocněním moderní doby. Vyplynávají z narušení zásobení srdečních buněk kyslíkem, které nestačí pokrýt jejich metabolické požadavky, což vede k nekróze postižené části srdce (infarktu) (Kolar and Ostadal, 2004). Akutní koronární okluze je v současnosti hlavní příčinou nemocí a úmrtnosti v západním světě (Murray and Lopez, 1997). Ischemická choroba srdce vzniká jako důsledek mnoha patologických jevů, včetně hypertenze, arteriosklerózy, hyperlipidémie a cukrovky. Během posledních 50 let se odehrála klinických a experimentálních laboratorní záměra na výzkum kardioprotektivních účinů, které by vedly ke zlepšení srdeční funkce, snížení výskytu arytmií a oddálení nástupu nekrózy během ischemie/reperfúze (Kolar and Ostadal, 2004).

7 Kardioprotekce

V dnešní době jsou známy dva jevy, které vedou k navození kardioprotekce - adaptace na chronickou hypoxii a preconditioning. Adaptace na chronickou hypoxii a různé formy preconditioningu představují přesně definované a reprodukovatelné prostředky ke zlepšení srdeční ischemické tolerance prostřednictvím aktivace endogenních protektivních drah (Ostadal and Kolar, 2007; Starnes and Taylor, 2007). Neckář a spol. (2002) se zabývali tím, zda kombinace obou těchto kardioprotektivních fenoménů bude mít vliv na zmenšení velikosti infarktu myokardu. Ukázalo se, že kardioprotekce navozená při této kombinaci byla stejného rozsahu jako kardioprotekce navozená samotným preconditioningem. Z toho vyplývá, že kardioprotektivní účinky těchto dvou jevů nejsou aditivní, z čehož se usuzuje, že by mohly sdílet stejné signální dráhy (Neckář et al., 2002a). Podrobná identifikace molekulárních drah podílejících se na zachování viability myokardu je nezbytnou podmínkou pro rozvoj účinných farmakologických látek, které by mohly být použity v praxi (Kolar and Ostadal, 2004).

7.1 Preconditioning

Na rozdíl od adaptace na chronickou hypoxii, existuje velké množství dat týkající se mechanismu preconditioningu (Yellon and Downey, 2003; Zaugg and Schaub, 2003). Jako jedna z prvních studií, která pojednává o preconditioningu, se objevila v roce 1986 práce Murryho a spol. Na psím modelu ukázali, že čtyřicetipětiminutové ischemie oddálené reperfúzí, výrazně snížily velikost infarktu myokardu (o 25%) vyvolaného následnou dlouhodobou ischemií (Murry et al., 1986). Ischemický preconditioning je spojen se dvěma fázemi kardioprotekce, a to s klasickou formou, která trvá asi 2 hodiny po aplikaci ischemického stimulu (Sack et al., 1993) a s tzv. druhým oknem protekce, což je druhá fáze, která se objevuje po 24 hodinách a trvá přibližně 3 dny (Baxter et al., 1997). V obou případech preconditioning vyvolává uvolnění autakoidů, které spouští kardioprotekci tím, že obsazují receptory na buněčném povrchu. Obsazené receptory aktivují komplexy signálních kaskád, které během letální ischemie a následné reperfúze aktivují konečné efekторы zprostředkovávající kardioprotekci (Yellon and Downey, 2003). Řečné studie prokázaly, že protekce navozená v důsledku preconditioningu spoívá v útlumu škodlivých účinků reperfúzního poškození. Dochází tedy například ke snížení oxidačního stresu, snížení akumulace Ca^{2+} v mitochondriích, redukcii proapoptotických faktorů nebo k inhibici otevírání mitochondriálních propustných pórů (mPTP) (Hausenloy and Yellon, 2007).

7.2 Chronická hypoxie

K chronické hypoxii myokardu dochází v důsledku nerovnováhy mezi zásobením a potřebou tkáň na kyslík. Chronická hypoxie je hlavním patofyziologickým rysem řady kardiopulmonálních onemocnění. Může být způsobená několika mechanismy. Nejčastěji příčinou je ischemická hypoxie indukovaná sníženým nebo přerušovaným koronárním průtokem krve a systémová (hypoxická) hypoxie, která se vyznačuje poklesem parciálního tlaku kyslíku (pO_2) v arteriální krvi při dostatečném prokrvení (Ostadal and Kolar, 2007).

Ve dvou případech je hypoxický stav považovaný za fyziologický, a to u myokardu plodu, kde parciální tlak kyslíku v arteriální krvi odpovídá nadměrné vý-

8000 m, a u myokardu populací flujících trvale ve vysokých nadmořských výškách (Moret, 1980). Je známo už mnoho let, že lidé a zvířata adaptovaná na vysokou nadmořskou výšku jsou více odolná vůči akutnímu ischemickému poškození srdce (Hurtado, 1960). Adaptace na chronickou hypoxii se vyznačuje celou řadou funkčních změn s cílem zachování homeostázy s minimálními náklady na energii (Durand, 1982). Adaptace tedy zvyšuje toleranci srdce ke větším hlavním škodlivým důsledkům vyvolaným nedostatkem kyslíku. Avšak kromě ochranných účinků má adaptace na chronickou hypoxii také negativní důsledky, včetně hypoxické plicní hypertenze a hypertrofie pravé komory, které mohou v případě nadměrného hypoxického stimulu vést k srdečnímu selhání (Ostadal and Kolar, 2007). Hypoxické podmínky simulované v hypobarické nebo normobarické komoře slouží jako odpovídající experimentální model chronické hypoxie. Tento model umožnil studium časového průběhu vývoje prospěšných a nežádoucích adaptivních změn a možnost jejich spontánní reverzibility po odebrání zvířat z hypoxického prostředí.

Většina experimentálních studií prokázala, že srdce zvířat adaptovaných na chronickou hypoxii vyvíjí menší velikost infarktu myokardu (Neckar et al., 2002a), vykazuje lepší obnovení funkce po ischemickém/reperfúzním poškození (Tajima et al., 1994) a pokles ischemických a reperfúzních arytmií komor (Asemu et al., 1999). Milano a spol. v roce 2002 provedli experiment, ve kterém porovnávali kardioprotektivní účinek permanentní (5500 m, 2 týdny) a intermitentní (1 h/den vystavení normoxii) normobarické hypoxie. Zjistili, že na základě reoxygenace u potkanu vystavených intermitentní hypoxii došlo k výraznému zlepšení kardioprotekce (Milano et al., 2002). Nicméně experimentální data, která srovnávají účinek permanentní a intermitentní hypoxie na myokard jsou stále omezená. Navíc také dnešní protokoly intermitentní hypoxie se velmi liší v délce cyklu, počtu hypoxických epizod za den a počtu dnů expozice. Tyto faktory se zdají být zásadní pro určení, zda je intermitentní hypoxie prospěšná nebo škodlivá (Beguin et al., 2005).

Dlouhým rysem adaptace na chronickou hypoxii je zjištěno, že protektivní účinek může přetrvávat relativně dlouhou dobu po odebrání zvířat z hypoxického prostředí. Studie Neckar et al. (2004) ukázala, že kardioprotekce přetrvávala po dobu nejméně 35 dnů od návratu zvířat do normoxických podmínek. Délka trvání kardioprotekce se však u jednotlivých srdečních poškození lišila. Na rozdíl od přetrvávajícího snížení velikostí infarktu, antiarytmická protekce zmizela už během prvního týdne po ukončení hypoxické adaptace (Neckar et al., 2004). Z těchto poznatků

vyplývá, že kardioprotekce před akutním ischemickým/reperfúzním poškozením vyvolaná adaptací na chronickou hypoxii trvá výrazně déle než jakákoliv forma ischemického preconditioningu, což naznačuje určitou možnost v hledání klinicky relevantních protektivních mechanismů před srdeční ischemií (Ostadal and Kolar, 1999).

7.3 Možné molekulární mechanismy kardioprotekce

Ačkoli je kardioprotektivní účinek chronické hypoxie před r znými projevy akutního ischemického/reperfúzního poškození znám přes 1 století, jeho molekulární mechanismy, kterým se dostalo v této pozornosti teprve v nedávné době, nejsou zdaleka pochopené. Byla navržena řada potenciálních protektivních faktorů spojených s chronickou hypoxií, ale jen některé z nich byly doposud experimentálně prozkoumané (Ostadal and Kolar, 2007). Přesto se zdá, že kardioprotektivní účinek chronické hypoxie je omezen do několika signálních drah. Zajímavé je, že většina těchto protektivních faktorů je zapojena také v mechanismu preconditioningu, z čehož vyplývá, že oba jevy vyúsňují v podstatě stejné signální dráhy, i když s různou účinností (Neckar et al., 2002a). V následujících kapitolách jsou uvedeny příklady možných protektivních faktorů.

7.3.1 ATP-dependentní draslíkové kanály (K_{ATP})

Bylo prokázáno, že chronická hypoxie vede k aktivaci K_{ATP} v různých tkáních (Cameron and Baghdady, 1994). Kardiomyocyty obsahují dva odlišné podtypy K_{ATP} kanálu, sarkolemální ($sarcK_{ATP}$) a mitochondriální ($mitoK_{ATP}$). Zatímco molekulární struktura srdečního $sarcK_{ATP}$ je známa, struktura $mitoK_{ATP}$ nebyla zatím popsána (Garlid, 1996). Některá nedávných studií poukázala na zapojení K_{ATP} kanálu v mechanismu zvýšené tolerance vyvolané chronickou hypoxií na akutní ischemické/reperfúzní poškození. Ke zjištění, který podtyp K_{ATP} kanálu se účastní kardioprotekce, se využívá odlišné citlivosti obou podtypů k farmakologickým modulátorům. Pokusy prováděné především na potkanech za použití selektivních $mitoK_{ATP}$ blokátorů (5-hydroxydekanoát nebo MCC-134) a aktivátorů (diazoxid nebo BMS-191095) naznačily, že právě $mitoK_{ATP}$ kanály jsou zapojeny v protektivních

úincích chronické hypoxie především hlavními projevy akutního ischemického/reperfúzního poškození (Asemu et al., 1999; Neckar et al., 2002b; Zhu et al., 2003a; Kolar et al., 2005). Naproti tomu Kong a spol. v roce 2001 ve své práci prokázali, že jsou to jak $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, tak $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ kanály, které přispívají ke zvýšení ischemické tolerance u srdce novorozeneých králíků adaptovaných na chronickou hypoxii (Kong et al., 2001). Zdá se tedy, že mechanismus navození kardioprotekce prostřednictvím K_{ATP} je druhově závislý.

7.3.2 Reaktivní formy kyslíku (ROS)

Chronická hypoxie je spojena se zvýšeným oxidačním stresem, ovlivněným peroxidací lipidů (Yoshikawa et al., 1982) a indukce antioxidantní odpovědi (Nakanishi et al., 1995) v různých tkáních a orgánech. Zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) je tradičně považována za škodlivou, přispívá k ischemickému/reperfúznímu poškození srdce u normoxických potkanů. V poslední době se ale ukazuje, že se může také podílet na kardioprotektivních mechanismech vyvolaných adaptací na chronickou hypoxii. V roce 2007 Kolář a spol. za použití antioxidantu N-acetylcysteinu prokázali, že zvýšený oxidační stres během adaptace na chronickou intermitentní hypoxii hraje roli v indukci zvýšení srdeční ischemické tolerance (Kolar et al., 2007). Také práce Neckar a spol. (2003) pojednává o pozitivním vlivu ROS na kardioprotekci. U dospělých potkanů zkoumali vliv chronické hyperkapnie na kardioprotekci indukovanou adaptací na chronickou permanentní hypoxii. Ukázalo se, že hyperkapnie, která je známa redukcí oxidačního stresu, výrazně oslabila protektivní vliv na snížení velikosti infarktu (Neckar et al., 2003). Tyto data naznačují, že ROS opravdu přispívají k indukci kardioprotekce po adaptaci na chronickou hypoxii, ale přesný mechanismus je zatím neznámý.

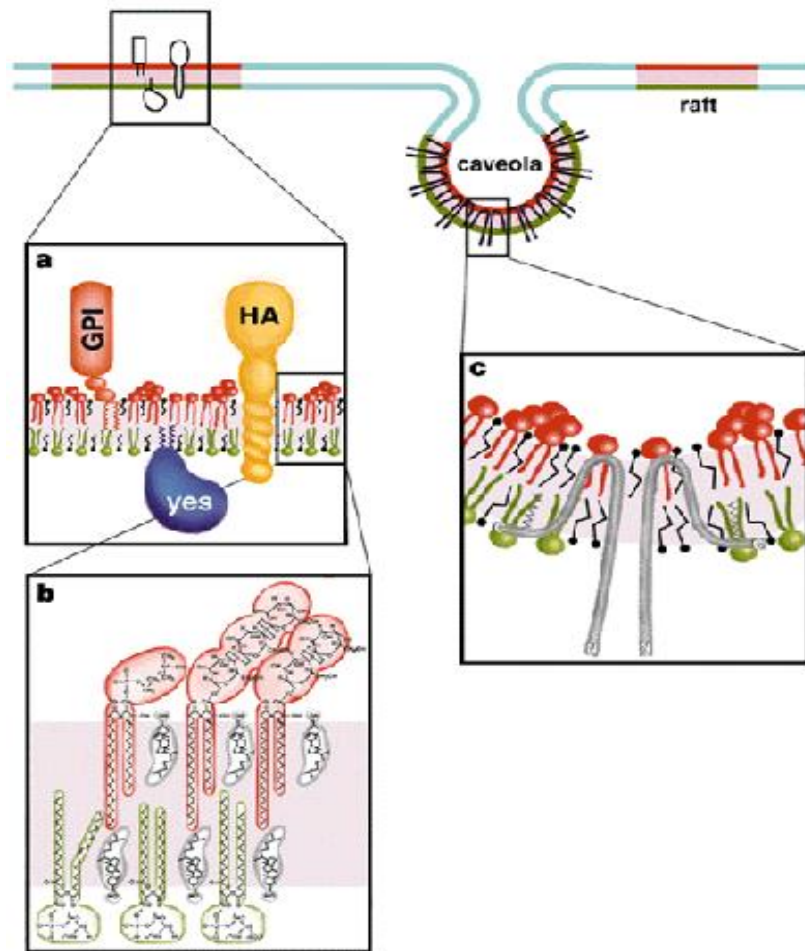
7.3.3 Proteinkináza C (PKC)

Dleřitou roli v mechanismu zvýšení srdeční ischemické tolerance hrají také různé proteinkinázy, které jsou zapojeny v několika paralelních protektivních signálních drahách (Kolar and Ostadal, 2004). Nejvýznamnější význam se zatím připisuje proteinkináze C (PKC), která, jak se ukázalo, hraje klíčovou roli v signální transdukcii u

preconditioningu (Mitchell et al., 1995). Nedávné studie ale prokázaly, že se PKC uplatňuje také při kardioprotekci navozené adaptací na chronickou hypoxii. Ding a spol. v roce 2004 publikovali práci, ve které uvedli, že adaptace na intermitentní chronickou hypoxii chrání potkaní srdce před ischemickým/reperfúzním poškozením právě aktivací PKC. Dokázali to za použití chelerytrinu, což je inhibitor PKC, který výrazně inhiboval protektivní účinky (Ding et al., 2004). Zatímco u preconditioningu za zprostředkování protekce zodpovídají především izoformy PKC- α a PKC- β (Kawamura et al., 1998), Neckář a spol. v roce 2005 zjistili, že u kardioprotektivních mechanismů, které nabízí chronická hypoxie, hraje důležitou roli zejména PKC- δ . Použili k tomu rottlerin, což je selektivní inhibitor PKC- δ , který zeslabil pozitivní vliv hypoxie na snížení velikosti infarktu, z čehož vyplynulo, že protekce byla zprostředkována touto izoformou (Neckář et al., 2005).

8 Membránové mikrodomény (rafty)

Membránové mikrodomény, nazývané také jako lipidické rafty, tvoří určité okruhy v lipidové dvojvrstvě buněčných membrán, které jsou bohaté na cholesterol, sfingolipidy a glykolipidy s převážně nasycenými mastnými kyselinami. Tyto lipidy jim udávají poměrně velkou rigiditu, nachází se tedy v tzv. fázi uspořádané tekutiny, čímž se odlišují od zbytku membrány, která je ve fázi tzv. neuspořádané tekutiny (London and Brown, 2000). Rigidita membránových raftů umožní jejich izolaci prostřednictvím solubilizace membrány neiontovými detergenty, jako například Tritonem X-100, i při nízkých teplotách (Simons and Ikonen, 1997). Kromě typického lipidového složení, se rafty vyznačují přítomností proteinů, které jsou k membráně vázány pomocí glykosylfosfatidyl-inositolové kotvy (Brown and Rose, 1992). Jsou známy dva podtypy membránových raftů, rovinné membránové rafty a kaveoly. Kaveoly byly popsány už v 50tých letech dvacátého století jako lahvicovité invaginace v plazmatické membráně, které jsou charakterizované specifickým transmembránovým proteinem kaveolinem (Obrázek 5) (Yamada, 1955; Rothberg et al., 1992). Nedávné studie ukázaly, že lipidové rafty obsahují velké množství signálních molekul, jako například známé GPCR, trimerní a malé G-proteiny a jejich efekторы, což naznačuje, že hrají důležitou roli v receptorem zprostředkovaném přenosu signálu (Fielding, 2001; Ohkubo and Nakahata, 2007).



Obrázek . 5: Model organizace raft a kaveol v plazmatické membrán

a) rafty obsahující proteiny přichycené k vnější vrstvě membrány pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy (GPI), proteiny přichycené k vnitřní vrstvě membrány acylovými zbytky (Src kináza Yes) nebo transmembránové proteiny (HA-hemaglutinin); b) lipidová dvojvrstva raft je asymetrická, vnější vrstva obsahuje sfingomyelin (červený) a glykosfingomyelin (červený), vnitřní vrstva obsahuje glycerolipidy (např. fosfatidylserin a fosfatidyletanolamin; zelené), cholesterol (šedý) je zastoupen v obou vrstvách; c) kaveoly jsou vytvářeny asociací molekul kaveolinu s membránou. Interakce kaveolinu s lipidy v raftu může být zprostředkována vazbou k cholesterolu a acylací C-koncového cysteinu (Simons and Ikonen, 1997).

9 Cíle diplomové práce

1. optimalizace způsobu přípravy vzorků (plazmatických membrán) z tkání levé a pravé komory myokardu potkana
2. optimalizace vazebných studií α -adrenergních receptorů s [³H]CGP 12177 a použití nejlepšího postupu na vlastní vzorky
3. charakterizace α_1 -a α_2 -adrenergních receptorů (B_{max} a K_d) v hrubých membránách izolovaných z pravých a levých komor z různě ovlivněných potkanů (3 týdenní hypoxická adaptace (10% O₂)):
 1. intermitentní normobarická hypoxie: 23 hod. hypoxie, 1 hod. reoxygenace (INH/R)
 2. intermitentní normobarická hypoxie: 8 hod. hypoxie, 16 hod. normoxie (INH)
 3. kontinuální normobarická hypoxie: 24 hod. hypoxie, bez reoxygenace (CNH)
4. charakterizace β -adrenergních receptorů v hrubých membránách izolovaných z pravé a levé komory z různě ovlivněných potkanů za použití SDS-PAGE elektroforézy, Western blottingu a imunodetekce (protilátky proti α_1 - a α_2 -ARs)
5. izolace membránových mikrodomén (rafts), jejich následná detekce prostřednictvím kaveolinu a porovnávání profilu distribuce zvolených proteinů v plazmatické membráně

10 Materiál a metody

10.1 Laboratorní zvířata

Za účelem našich experimentů byli použiti dospělí samci laboratorního potkana kmene Wistar o průměrné váze 250-300 gramů. Potkani byli rozděleni do čtyř skupin. Zatímco tři skupiny potkanů byly po dobu tří týdnů adaptovány na různé hypoxické podmínky v normobarické hypoxické komoře (10% O₂), čtvrtá skupina byla během této doby chována v normoxických podmínkách.

Experimenty byly provedeny na těchto 4 modelech:

1. normoxie - **N**
2. intermitentní normobarická hypoxie - **INH/R** (23 hodin hypoxie, 1 hodina reoxygenace)
3. intermitentní normobarická hypoxie - **INH** (8 hodin hypoxie, 16 hodin normoxie)
4. kontinuální normobarická hypoxie - **CNH** (24 hodin hypoxie)

10.2 Usmrcení potkanů a odebrání tkáně

Potkani byli po ukonění třítydenní adaptace usmrceni cervikální dislokací. Po vyjmutí byla srdce rozdělena na levou komoru (LV), pravou komoru (RV) a septum. Jednotlivé srdeční oddíly byly poté zváženy a následně zamrazeny v tekutém dusíku. Před dalším zpracováním byly uchovány v hlubokomrazícím boxu (-80 °C).

10.3 Homogenizace a frakcionace

10.3.1 Optimalizace způsobu přípravy vzorků

Zásobní roztoky:

Pufry: TMES - 20 mM Tris-HCl (pH 7,4)

3 mM MgCl₂

1 mM EDTA

250 mM sacharóza

TME - 20 mM Tris-HCl (pH 7,4)

3 mM MgCl₂

1 mM EDTA

Pro optimalizaci způsobu přípravy vzorků jsme zvolili 4 různé způsoby homogenizace (A, B, C, D), které se lišily časem, při němž byla srdeční tkáň rozmělněna v homogenizačním pufru TMES pomocí Ultra-Turaxu a dobou homogenizace pomocí sklo-teflonového homogenizátoru (Tabulka 1). K tomuto experimentu byla použita srdeční tkáň z kontrolních potkanů.

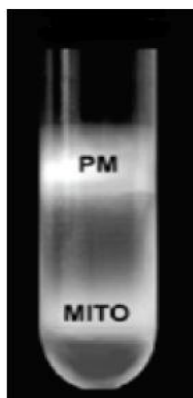
Tabulka 1: Informace o sezech použitých během optimalizace způsobu přípravy vzorků při použití turaxu a sklo-teflonového homogenizátoru (A, B, C, D - označení 4 různých způsobů homogenizace)

	Ultra-Turax (24000 rpm) [s]	Sklo-teflonový homogenizátor (1200 rpm) [min]
A	15	1
B	15	3
C	30 (2x15)	0,5
D	30 (2x15)	1

Homogenizace a frakcionační postup:

1. Srdeční tkáň vyjmutou z hlubokomrazíčního boxu jsme přenesli do zkumavky a přidali k ní odpovídající množství vychlazeného TMES pufru (v poměru 1g tkáň na 4 ml pufru) a inhibitory proteas (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Poté jsme tkáň fláčky rozstříhali na malé kousky. Vzniklou směs jsme přelili do homogenizační zkumavky.
2. Směs jsme rozmělňovali Ultra-Turaxem při 24000 rpm po dobu 15 s a následně homogenizovali pomocí sklo-teflonového homogenizátoru při 1200 rpm po dobu ~ 1 minuty, což odpovídá 10 tahům nahoru-dolů. Vše probíhalo za stálého chlazení v ledové lázni.

3. Vzniklý homogenát jsme centrifugovali při 2100 rpm po dobu 10 minut v předem vychlazené centrifuzě na 4 °C (centrifuga Hettich Universal R30). Odebrali jsme supernatant S1 a uchovali ho na ledu.
4. K peletu P1 jsme přidali stejný objem TMES pufru a inhibitory proteas jako v kroku . 1 a pelet resuspendovali a rehomogenizovali pomocí sklo-teflonového homogenizátoru jako v kroku . 2.
5. Vzniklou směs jsme opět centrifugovali jako v kroku . 3. Odebrali jsme supernatant S2 a spojili ho s předchozím supernatantem S1 (S1+S2→S). Změřili jsme celkový objem a odebrali vzorek pro stanovení protein .
6. Nanesli jsme 3-4 ml supernatantu S na 18% Percoll (připravili jsme ho naředěním 100% Percollu v TMES pufru) v centrifugačních zkumavkách.
7. Takto připravené zkumavky jsme dali centrifugovat při 26000 rpm po dobu 15 minut, při 4 °C (centrifuga Beckman-Coulter, rotor Ti50.2).
8. Odebrali jsme postupně jednotlivé vrstvy vzniklé během centrifugace (2 vrstvy - horní představuje plazmatické membrány (PM), dolní mitochondrie (MITO) - Obrázek . 6). Každou jsme dali zvláště do centrifugační zkumavky a doplnili TME pufrém přibližně 1 cm pod okraj.
9. Zkumavky jsme dali centrifugovat při 40000 rpm po dobu 1 hodiny, při 4 °C (centrifuga Beckman-Coulter, rotor Ti50.2).
10. Supernatanty jsme odsáli a pelety (PM a MITO) resuspendovali v TME pufru. Odebrali jsme vzorky na stanovení protein , zbytek rozpíjetovali do mikrozkušavek a zamrazili v tekutém dusíku. Před dalším zpracováním jsme vzorky uchovávali v hlubokomrazícím boxu (-80 °C).



Obrázek . 6: Ilustrativní obrázek separace plazmatické a mitochondriální frakce v hustotním gradientu Percollu.

10.3.2 Příprava vlastních vzorků N, INH/R, INH a CNH

Pro přípravu vlastních vzorků jsme použili zpočátku stejný postup jako u optimalizace způsobu přípravy vzorků (kroky 1-5), při němž byl použit způsob homogenizace D (ultra-turrax (24000rpm) - 30 s, sklo-teflonový homogenizátor (1200 rpm) - 1 min). Získané supernatanty S od každé skupiny (N, INH/R, INH, CNH) byly přeneseny do centrifugačních zkumavek a centrifugovány. Centrifugace probíhala při 27000 rpm po dobu 30 minut (centrifuga Beckman-Coulter, rotor Ti50.2). Po odstředění jsme odsáli supernatant a pelet, který představoval odstředěné hrubé membrány (HM), jsme resuspendovali v TME pufru. Alikvoty (~ 1,4 ml) hrubých membrán jsme poté rozpipetovali do mikrozkušavek, zmrazili v tekutém dusíku a uložili do hlubokomrazicího boxu (-80 °C).

10.3.3 Izolace membránových raftů

Zásobní roztok:

Pufry : TMCS - 20 mM Tris-HCl (pH 7,4)

3 mM MgCl₂

1 mM CaCl₂

250 mM sacharóza

TNMC - 20 nM Tris-HCl (pH 7,8)

150 mM NaCl

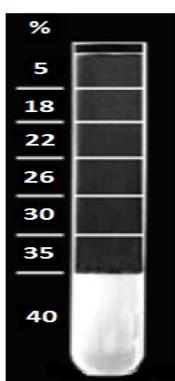
3 mM MgCl₂

1 mM CaCl₂

Pro homogenizaci srdeční tkáně jsme použili stejný postup jako u optimalizace způsobu přípravy vzorků (kroky 1-5), který odpovídal způsobu homogenizace D (Ultra-Turax (24000rpm) - 30 s, sklo-teflonový homogenizátor (1200 rpm) - 1 min). Místo homogenizačního pufru TMES jsme ale použili pufr TMCS. Izolaci membránových raftů jsme prováděli za použití 4 koncentrací Tritonu X-100 (0,1%, 0,2%, 0,5% a 1%) při teplotě 4 °C a 2 koncentrací Tritonu X-100 (0,1% a 1%) při laboratorní teplotě (~ 25 °C).

Postup izolace membránových raft :

1. Do 6 centrifuga ní zkusavek jsme rozpipetovali odebraný supernatant S, který jsme získali spojením S1 a S2 supernatantu vzniklých b hem homogenizace srde ní tkán (1200 μ l S do každé zkusavky).
2. Do každé centrifuga ní zkusavky jsme p idali 10% Triton X-100 a pufrem TMCS doplnili objem do 2 ml. Kone né koncentrace Tritonu X-100 byly 0,1%, 0,2%, 0,5% a 1% pro 4 °C a 0,1% a 1% pro 25 °C. Procenta jsou objemová (z celkového objemu 2 ml), proto bylo pot eba p idat 20 μ l 10% Tritonu X-100 pro získání výsledné koncentrace 0,1%, 40 μ l pro 0,2%, 100 μ l pro 0,5% a 200 μ l pro 1%. Vzniklé sm si jsme promíchali na vortexu.
3. Po promíchání jsme zkusavky nechali po dobu 30 minut na ledu, respektive p i laboratorní teplot .
4. Následn jsme jednotlivé sm si smíchali s 80% sacharózou (80g sacharózy dopln né do objemu 100 ml TNMC pufrem) v pom ru 1:1 (\rightarrow 40% sacharóza).
5. 40% sacharózu jsme p evrstvili 1,5 ml 35%, 1 ml 30%, 1,5 ml 26%, 1,5 ml 22%, 1 ml 18% a 1 ml 5% sacharózy (Obrázek . 7). Zkusavky jsme poté vyváffili.
6. Vyváffené zkusavky jsme dali centrifugovat p i 3300 rpm po dobu ~ 19 hodin (centrifuga Beckman-Coulter, rotor SW41).
7. Sacharózové gradienty jsme po centrifugaci rozebrali do 13 frakcí (íslované 1-13 od nejniří koncentrace sacharózy po nejvy—í) po 890 μ l na jednu mikrozkusavku a dali zamrazit do tekutého dusíku.
8. Pelet jsme resuspendovali v 890 μ l TMCS pufru a také dali zamrazit do tekutého dusíku (ozna ili jsme ho jako frakci íslo 14).
9. Vzorky jsme p ed dal—ím zpracováním uchovávali v hlubokomrazícím boxu (-80 °C).



Obrázek . 7: Schéma vrstvení sacharózového gradientu

10.4 Stanovení proteinů BCA metodou

Zásobní roztoky:

A: 8 g uhličitanu sodného + 1,6 g vinanu sodného, doplněno deionizovanou vodou do 100 ml, pH upraveno pomocí 10 mM NaOH na 11,25

B: 4 g BCA rozpouštěné v deionizované vodě

C: 0,4 g pentahydrátu síranu manganatého rozpouštěno v deionizované vodě

Standard: hovězí sérový albumin (BSA) - 1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$

Pracovní postup:

1. Vzorky jsme po rozmrazení zvortexovali a naředili deionizovanou vodou v poměru 1:100 (10 μl vzorku + 990 μl deionizované vody).
2. Připravili jsme si 10x zředěný standard BSA (50 μl BSA standardu (1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) + 450 μl deionizované vody (0,1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), který je spolu s nezředěným standardem BSA zapotřebí ke stanovení kalibrační křivky (Graf . 1)
3. Na mikrotitrační destičce jsme si připravili řadu standardů BSA s obsahem proteinu v rozptí od 0,2 μg do 50 μg proteinu v celkovém objemu 100 μl (Tabulka . 2).
4. Poté jsme nanесли na mikrotitrační destičku vzorky v triplicátech (3x 100 μl zředěného vzorku).
5. Do každé jamky mikrotitrační destičky se standardem BSA nebo vzorkem jsme přidali 100 μl pracovního roztoku (1 díl roztoku C + 25 díl roztoku B + 26 díl roztoku A).
6. Jamky jsme přelepili lepící páskou a mikrotitrační destičku jsme inkubovali po dobu 30 minut při teplotě 60 °C.
7. Po inkubaci jsme vložili destičku do přístroje Synergy HT (BioTek Instruments) a změřili absorbanci při vlnové délce 562 nm.

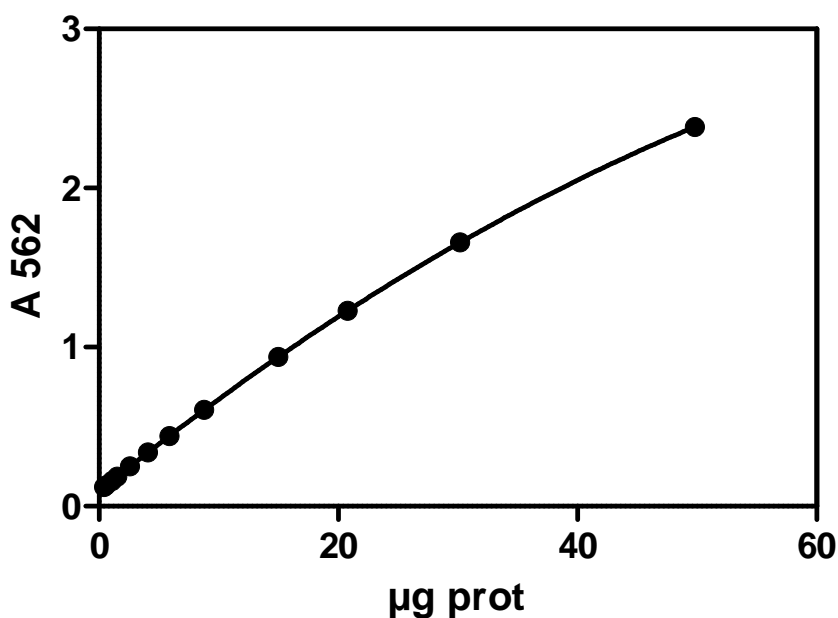
Tabulka .2: ady standard pot ebná ke zm ení kalibra ní k ivky

číslo standardu	BL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
μg BSA (ve 100 μl)	0	0,2	0,5	1,0	1,5	2,5	4	6	10	15	20	30	50
BSA (0,1 μg.μl⁻¹) [μl]	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	-
BSA (1 μg.μl⁻¹) [μl]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50
H₂O [μl]	100	98	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70	50

Výsledky stanovení protein pomocí BCA metody byly zpracovány v programu Gen 5, verze 1,08. Množství protein v jednotlivých vzorcích bylo vypočteno z rovnice

$$Y = C.X^2 + B.X + A \quad (1)$$

kde Y je absorbance vzorku, X je koncentrace protein ve vzorku a A , B , C jsou konstanty charakteristické pro dané měření, určené nelineární regresní analýzou hodnot absorbance ady standard BSA.



Graf .1 : Kalibra ní k ivka pro stanovení množství protein ve vzorcích

osa x : množství protein v jednotlivých standardech BSA [μg]

osa y : naměřená absorbance při vlnové délce 562 nm

10.5 Vazebné pokusy

10.5.1 Teoretický úvod

Vazebné pokusy s radioligandem jsou relativně jednoduché, ale úinné metody pro studium receptorů spojených s G-proteiny (GPCR). Používají se k určení afinity mnoha chemických látek k GPCR a k charakterizaci změn v přítomnosti receptorů. Existují tři základní typy vazebných pokusů s radioligandem: saturační pokusy (určení afinity radioaktivního značeného ligandu k receptoru a maximální vazebné kapacity tkáně), kompetiční pokusy (určení afinity kompetujícího, neznámého ligandu k receptoru) a kinetické pokusy (určení rychlosti asociace a disociace radioligandu k receptoru) (Bylund and Toews, 2011).

Zásobní roztoky:

Inkubační médium - 50 mM Tris-HCl

10 mM MgCl₂

1 mM kyselina askorbová

pH 7,4 (upravit HCl)

Promývací pufr - 50 mM Tris-HCl

10 mM MgCl₂

pH 7,4 (upravit HCl)

Použitý radioligand : [³H]CGP 12177 - specifická aktivita: 111 dpm.fmol⁻¹

- koncentrace: 20 μM

10.5.2 Optimalizace vazebných pokusů

Během optimalizace vazebných studií β -AR jsme se zaměřili na určení optimálního množství proteinu pro vazebné pokusy. Nejprve jsme sledovali závislost vazby radioligandu [³H]CGP 12177, což je neselektivní antagonist β -adrenergických receptorů, na množství proteinu ve vzorku, tedy množství vazebných míst přítomných ve vzorku. V rámci tohoto pokusu jsme si zvolili čtyři množství proteinu - 50 μg, 75 μg, 100 μg a 150 μg proteinu. Pro porovnání jsme použili kromě frakce plazmatických membrán (PM), také mitochondriální frakci (MITO) a supernatant (S). Pro tento pokus

jsme si vybrali jednodušší formu vazebných studií, tzv. jednobodové stanovení, kdy se stanoví množství vázaného radioligandu v jedné jeho fixní koncentraci (1 nM). Nespecifická vazba (Ns) jsme stanovili inkubací v přítomnosti 10 μ M L-propranololu. Stanovení celkové i nespecifické vazby jsme provedli v triplicátech. Množství radioaktivity zachycené na filtrech jsme stanovili kapalnou scintilační spektrometrií na scintilačním počítači (Packard).

Pracovní postup:

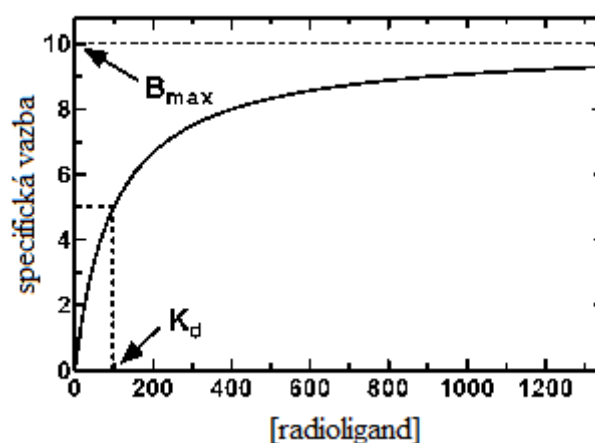
1. Po rozmrazení jsme vzorky (PM, MITO, S) zvortexovali a naedili v inkubačním médiu na požadované množství proteinu (50 μ g, 75 μ g, 100 μ g a 150 μ g).
2. Do jednotlivých zkumavek jsme napipetovali odpovídající objem inkubačního média, L-propranololu, radioligandu a naedního vzorku podle schématu . 1.
3. Zkumavky jsme dali inkubovat při 37 °C po dobu 1 hodiny.
4. Reakci jsme ukončili přidáním 3 ml vychlazeného promývacího pufru a následnou vakuovou filtrací přes filtry Whatman GF/C, které byly po dobu inkubace namočené v 0,3% roztoku PEI.
5. Filtry jsme následně promyli ještě 2x 3 ml promývacího pufru.
6. Poté jsme filtry přenesli do scintilačních lahví a zalili je 4 ml scintilačního roztoku CytoScint.
7. Změřili jsme množství radioaktivity zachycené na filtrech prostřednictvím scintilačního počítače.

Schéma . 1: Dávkovací schéma

	$[^3\text{H}]\text{CGP}$ 12177	vzorek	L-propranolol	inkubační médium
celková vazba [μl]	100	100	-	300
Ns [μl]	100	100	100	200

10.5.3 Saturační pokusy

Saturační pokusy se používají k určení maximální vazebné kapacity tkáně ve vzorku (počet receptorů; B_{max}) a k určení rovnovážné disociační konstanty (K_d), která odpovídá koncentraci radioligandu, při níž je obsazena polovina receptorů. V saturačních pokusech se měří množství specificky vázaného radioligandu v závislosti na jeho rostoucí koncentraci. Jak ukazuje názorný obrázek . 8, se zvyšující se koncentrací radioligandu se zvyšuje množství specificky vázaného radioligandu, a to až do té doby, než jsou všechny receptory obsazeny a radioligand se tudíž nemá již kam vázat. Nespecifickou vazbu (N_s) jsme stanovili inkubací v přítomnosti $10 \mu\text{M}$ L-propranololu. V našem případě jsme ke stanovení celkové a nespecifické vazby radioligandu [^3H]CGP 12177 použili sedm jeho koncentrací (4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,13 a 0,06 nM), které jsme si připravili polovičním dělením, výchozí koncentrace byla tedy 4 nM. Stanovení jsme provedli v triplicátech. Saturační pokusy jsme prováděli na vzorcích hrubých membrán (HM) izolovaných ze srdeční tkáně 4 skupin potkanu (viz. Laboratorní zvířata), které jsme naedili tak, aby ve výsledné reakční směsi bylo vždy $100 \mu\text{g}$ proteinů. Pracovní postup je dále stejný jako u jednobodového stanovení (viz. Optimalizace vazebných pokusů, kroky . 2-7).



Obrázek . 8: Názorný příklad saturačního pokusu

10.5.4 Kompetiční pokusy

Při kompetičním uspořádání pokusu se za fixní koncentrace radioligandu [³H]CGP 12177 měří změny jeho vázaného množství k receptorům ve vzorku v závislosti na přítomnosti mění se koncentrace jiného neznámého ligandu (kompetitoru). Kompetiční pokusy se používají k charakterizaci vazebných vlastností neznámých ligandů. Slouží k určení vztahu kompetitoru k použitému radioligandu a k určení zdánlivé afinity kompetitoru k vazebným místům ve vzorku (zdánlivá disociační konstanta; K_i). V našem případě je oním kompetitorem ICI 118 551. Použili jsme 19 koncentrací ICI 118 551 (10^{-4} , $10^{-4,3}$, $10^{-4,7}$, 10^{-5} , $10^{-5,3}$... $10^{-9,7}$, 10^{-10} M), které jsme si naedili ze zásobního roztoku ICI 118 551 s výchozí koncentrací 10^{-3} . Nеспецифickou vazbu (Ns) jsme stanovili inkubací v přítomnosti 10 μ M L-propranololu. Stanovení jsme provedli v triplicátech. Kompetiční pokusy jsme prováděli na vzorcích hrubých membrán (HM) izolovaných ze srdeční tkáně 4 skupin potkanu (viz. Laboratorní zvířata), které jsme naedili tak, aby výsledné množství proteinu ve vzorku odpovídalo 100 μ g. Pracovní postup je dále stejný jako u jednobodového stanovení (viz. Optimalizace vazebných pokusů, kroky 2-7), a navíc to, že v kroku 2 bylo při pipetování objem jednotlivých složek použito schéma 2. místo schématu 1.

Schéma 2: Dávkovací schéma

	[³ H]CGP12177	vzorek	L-propranolol	ICI 118,551	inkubační médium
celková vazba [μ l]	100	100	-	-	300
kompetitor [μ l]	100	100	-	50	250
Ns [μ l]	100	100	100	-	200

10.5.5 Zpracování dat

K vyhodnocení dat z vazebných pokusů jsme potřebovali určit celkovou vazbu radioligandu (C), jeho nспецифickou vazbu (Ns) a jeho koncentraci před inkubací (T). Celková vazba radioligandu odpovídala radioaktivitě zachycené na filtrech. Nспецифickou vazbu jsme změřili jako radioaktivitu zachycenou na filtrech po filtraci

vzorky, které jsme kromě radioligandu inkubovali také v přítomnosti 10 nM L-propranololu. Koncentraci radioligandu před inkubací jsme získali změním alikvotního množství přidávaného radioligandu. Množství specificky vázaného radioligandu (B) jsme vypočetli jako rozdíl C - Ns a množství volného radioligandu (F) jako rozdíl T - C.

Naměřená data z pokusu jak v saturacím, tak kompetitivním uspořádání jsme vyhodnotili pomocí nelineární regrese v programu GraphPad Prism 5. Hodnoty K_d a B_{max} v saturacích pokusech jsme určili nelineární regresní analýzou dat podle rovnice

$$B = \frac{[F] \times B_{max}}{[F] + K_d} \quad (2)$$

kde B je množství specificky vázaného radioligandu, [F] je koncentrace volného radioligandu, B_{max} je maximální vazebná kapacita tkáně a K_d je rovnovážná disociační konstanta radioligandu.

Hodnotu zdánlivé disociační konstanty kompetitoru (K_i) jsme pro oba podtypy receptorů (β_1 - a β_2 -AR) vypočetli podle rovnice

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_d}} \quad (3)$$

kde K_i je zdánlivá disociační konstanta kompetitoru, IC_{50} je koncentrace kompetitoru, při níž je 50% specifických vazebných míst pro radioligand obsazeno kompetitorem, [L] je koncentrace radioligandu, která byla použita při kompetitivním pokusu, K_d je disociační konstanta, která byla zjištěna saturacími pokusy.

Signifikantnost rozdílů výsledných dat jsme určili nepárovým Studentovým t-testem v programu GraphPad Prism 5.

10.6 SDS-PAGE elektroforéza

SDS-PAGE elektroforéza je metoda používaná k separaci proteinů, která probíhá na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS). Je založená na elektroforetické pohyblivosti proteinů. SDS, který se přidává jako roztok k proteinu, tak do gelu, způsobuje denaturaci proteinu a udává hodnotu jejich

povrchového náboje, který je ve výsledku záporný. To má za následek separaci protein v gelu na základ jejich molekulové hmotnosti.

Pracovní postup:

1. Očistili jsme skla pomocí etanolu a sestavili aparaturu na nalévání gelu.
2. V kádince jsme si připravili roztok dle lícího gelu smícháním roztoků číslo I, II, IV, V, VI (Tabulka 3) a deionizované vody. To kolikaprocentní gel jsme si připravili, záleželo na molekulové hmotnosti sledovaného proteinu (např. 10% dle lící gel - 6,7 ml I, 5 ml II, 200 μ l IV, 90 μ l V, 8 μ l VI a 8 ml deionizované vody).
3. Ihned po namíchání dle lícího gelu jsme jím naplnili připravená skla asi tak 1 cm pod okraj a převrstvili butanolem.
4. Po zpolymerování dle lícího gelu (~ 45 minut) jsme slili butanol, vypláchli prostor deionizovanou vodou a vysušili filtračním papírem.
5. V kádince jsme si připravili roztok zaostovacího gelu smícháním roztoků číslo I, III, IV, V, VI (Tabulka 3) a deionizované vody. Pro přípravu 4% zaostovacího gelu bylo zapotřebí 1,3 ml I, 2,5 ml III, 100 μ l IV, 90 μ l V, 8 μ l VI a 6 ml deionizované vody.
6. Zbývající prostor mezi skly jsme zaplnili zaostovacím gelem a zasunuli do nich hřebíček pro vytvoření jamek na vzorky.
7. Po zpolymerování zaostovacího gelu (~ 20 minut) jsme vyndali hřebíček a skla vložili do elektroforetické vany naplněné elektrolytem (roztok VIII) tak, aby hladina pufru přesahovala okraj krycího skla.
8. Vzorky jsme po rozmrazení zvortexovali a podle stanovené koncentrace proteinu naedili Laemmliho vzorkovým pufrům (roztok VII) v poměru 3:1 (vzorek: pufr) a opět zvortexovali.
9. Naedné vzorky jsme povařili 2 minuty při 100 °C a nechali vychladnout.
10. Do první jamky v zaostovacím gelu jsme nanесли 2 μ l barevného standardu molekulových hmotností. Do ostatních jamek jsme nanесли zkoumané vzorky.
11. K elektroforetické soustavě jsme připojili zdroj stejnosměrného napětí. Nastavili jsme konstantní napětí 200 V, při kterém probíhalo dlezení proteinu v gelu po dobu 45-60 minut.

Tabulka . 3: Popis a složení roztoků pro SDS-PAGE elektroforézu

íslo roztoku	popis	složení
I	30% akrylamid - 0,8% N, N-metylenbisakrylamid	30 g akrylamidu, 0,8 g N,N-bisakrylamidu, doplnit deionizovanou vodou do 100 ml
II	pufr 1; 1,5 M Tris-HCl pH 8,8	18,17 g Tris-HCl, doplnit deionizovanou vodou do 100 ml, upravit pH koncentrovanou HCl na 8,8
III	pufr 2; 0,5 M Tris-HCl pH 6,8	6,05 g Tris-HCl, doplnit deionizovanou vodou do 100 ml, upravit pH koncentrovanou HCl na 6,8
IV	10% SDS	10 g SDS, doplnit deionizovanou vodou do 100 ml
V	roztok APS	0,1 g APS rozpustit v 1 ml deionizované vody
VI	TEMED	-
VII	4x konc. Laemmliho vzorkový pufr pH 6,8	2,4 ml 1 M Tris-HCl, 1 ml glycerolu; 0,8 g SDS, 0,8 g DTT (nebo 0,4 ml merkaproetanolu), 1 mg bromfenolové mod i, doplnit deionizovanou vodou do 10 ml, upravit pH koncentrovanou HCl na 6,8
VIII	10x konc. elektrodový pufr	30,3 g Tris-HCl, 144 g glycinu, 10 g SDS, doplnit deionizovanou vodou na 1000 ml

10.7 Western Blotting a imunodetekce

Poufíté protilátky:

název	katalogové íslo (www.scbt.com)	ed ní	sekundární protilátka
adenosine A1-R	19223	2 000x	Anti-Goat
₁ -AR	568	3 000x	Anti-Rabbit
₂ -AR	569	2 000x	Anti-Rabbit
kaveolin-1	894	5 000x	Anti-Rabbit
G	378	10 000x	Anti-Rabbit
KOR-1	7493	2 000x	Anti-Rabbit
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	28200	5 000x	Anti-Rabbit

Pracovní postup:

1. Po ukon ení elektroforézy jsme vyjmuli skla z elektroforetické vany, odd lili krycí sklo od gelu a odstranili zaost ovací gel.
2. Sestavili jsme sendvi pro p enos protein z gelu na nitrocelulózovou membránu (Western blotting). Sestavování jsme provád li tak, aby jednotlivé vrstvy sendvi e byly stále pono ené v pufru . I (Tabulka . 4), aby nedo-šlo k vytvo ení vzduchových bublin mezi gelem a nitrocelulózovou membránou.
3. Naplnili jsme vanu pro elektrop enos blotovacím puftrem I a vlofili do ní správn sestavené sendvi e.
4. K blotovací soustav jsme p ipojili zdroj stejnosm rného nap tí. Nastavili konstantní nap tí 100 V a 60 minut.
5. Po ukon ení p enosu jsme sendvi e rozebrali a membrány propláchli deionizovanou vodou.
6. Po dobu 1 hodiny jsme membrány blokovali v pufru . I.
7. Membrány jsme p es noc inkubovali v primárních protilátkách na ed ných v pufru . IV.
8. Membrány jsme promyli v pufru . V - 3x 10 minut.
9. Následn jsme membrány inkubovali po dobu 1 hodiny v sekundárních protilátkách, které byly zna eny k enovou peroxidázou.
10. Membrány jsme op t promyli v pufru . V - 3x 10 minut.

11. Po dobu 1 minuty jsme membrány inkubovali se substrátem pro klenovou peroxidázu (Pierce Super Signal).
12. Membrány jsme lehce osušili mezi dvěma plochami filtračního papíru, obalili potravinářskou fólií a vložili do vyvolávací kazety.
13. Zatím jsme na membrány přiložili film, kazetu zavěsili a nechali exponovat. Doba expozice závisela na typu použité protilátky.
14. Po expozici jsme film vyvolali, naskenovali a vyhodnotili pomocí programu Image J.

Tabulka 4 : Popis a složení roztoku pro Western Blotting a imunodetekci

íslo roztoku	popis	složení
I	blotovací pufr	15 g TRIS-HCl, 72 g glycinu, 1 l metanolu, doplnit deionizovanou vodou do 5 l
II	10x konc. TBS pufr pH 8,0	360 ml 4 M NaCl, 96 ml 1M Tris-HCl, 504 ml deionizované vody, pH upravit koncentrovanou HCl na 8,0
III	blokovací pufr (5% mléko; 0,1% Tween)	2,5 g nízkotučného sušeného mléka, 50 ml TBS pufru, 50 µl Tweenu-20
IV	zředovací pufr ("diluting") (1% mléko; 0,1% Tween)	0,5 g nízkotučného sušeného mléka, 50 ml TBS pufru, 50 µl Tweenu-20
V	promývací pufr (0,3% Tween)	3 ml Tweenu-20, 1 l TBS pufru

11 Výsledky

11.1 Hmotnostní parametry

Pro naše experimenty, které byly zaměřeny na studium beta-adrenergických receptorů v myokardu potkana během adaptace na chronickou hypoxii, jsme použili tři různé modely hypoxie (INH/R, INH, CNH). Tyto hypoxické modely byly porovnávány s odpovídajícími kontrolními zvířaty (normoxie, N).

V tabulce 5 jsou zaznamenány hmotnostní parametry jednotlivých skupin získané po čtyřdenní adaptaci. U všech tří skupin potkanů adaptovaných na různé hypoxické podmínky došlo v porovnání s kontrolou k poklesu tělesné hmotnosti. Zatímco u INH to byl pouze nepatrný pokles (o 4%), u zbývajících dvou skupin INH/R a CNH se jednalo o signifikantní rozdíl (pokles o 15% a 14%). Oproti tělesné hmotnosti u hmotnosti srdce došlo u všech tří hypoxických modelů k jejímu nárůstu, a to v důsledku zvýšené hmotnosti pravé komory, která hypertrofovala. U INH/R, a zejména u CNH, došlo k velice výraznému nárůstu hmotnosti pravé komory v porovnání s kontrolou, a to asi o 70% (INH/R) a 86% (CNH). U INH byl tento nárůst podstatně menší než u ostatních dvou skupin (asi o 20%).

	N	INH/R	INH	CNH
n	10	10	10	10
hmotnost těla [g]	359,9 ± 8,3	305,3 ± 7,7 *	347,3 ± 4,4	309,9 ± 6,9 *
hmotnost srdce [mg]	836,4 ± 20,9	936,4 ± 43,3 *	879,2 ± 18,6	971,8 ± 56,5 *
hmotnost LV [mg]	452,9 ± 15,1	442,5 ± 22,4	465,4 ± 10,9	441,7 ± 26,2
hmotnost RV [mg]	185,0 ± 5,9	314,4 ± 15,5 *	221,5 ± 6,1	343,4 ± 27,6 *
LV/BW ($\cdot 10^{-3}$)	1,26 ± 0,04	1,44 ± 0,05	1,34 ± 0,04	1,43 ± 0,08
RV/BW ($\cdot 10^{-3}$)	0,52 ± 0,01	1,03 ± 0,04 *	0,64 ± 0,02	1,10 ± 0,07 *

Tabulka 5: Hmotnostní parametry

Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± S.E.M.

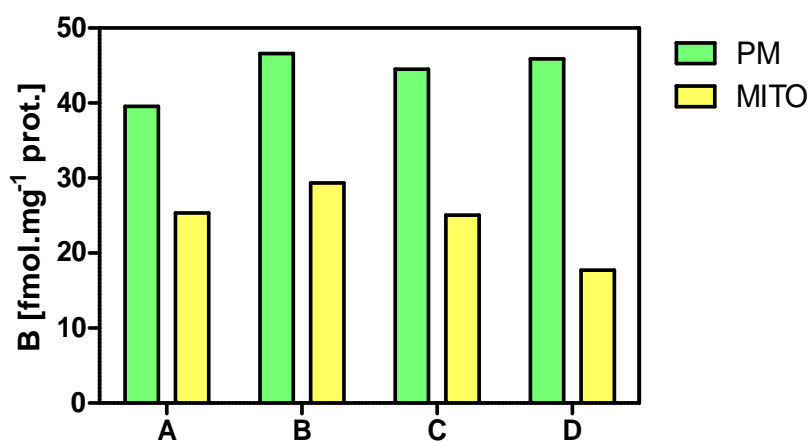
N - normoxie, INH/R - intermitentní normobarická hypoxie/reoxygenace, INH - intermitentní normobarická hypoxie, CNH - chronická normobarická hypoxie, n - počet potkanů ve skupině, LV - levá komora, RV - pravá komora, BW - hmotnost těla

* signifikantní rozdíl mezi daným hypoxickým modelem a kontrolou ($p < 0,05$)

11.2 Optimalizace způsobu přípravy vzorků

Cílem této optimalizace bylo zjistit nejlepší způsob homogenizace srdeční tkáně. Zvolili jsme 4 různé způsoby přípravy (A, B, C, D), které se od sebe lišily časem, při němž byla srdeční tkáň rozmělněna pomocí Ultra-turraxu a dobou homogenizace pomocí sklo-teflonového homogenizátoru. Pro jejich porovnání jsme si zvolili jednoduchou formu vazebných studií, tzv. jednobodové stanovení. To nám umožnilo určit množství vazebných míst odpovídajících β -adrenergním receptorům v jednotlivých frakcích (PM a MITO). Jako radioligand jsme použili 1 nM [3 H]CGP 12177, což je neselektivní antagonist β -adrenergních receptorů. Nespecifickou vazbu (Ns) jsme stanovili inkubací v přítomnosti 10 μ M L-propranololu.

Jak vyplývá z grafu 2, jako nejvhodnější způsob přípravy se ukázal být způsob homogenizace D. U něj byla prokázána vysoká vazba radioligandu ve frakci plazmatických membrán a zároveň největší rozdíl mezi množstvím vazebných míst v jednotlivých frakcích, z čehož vyplývá, že mitochondriální frakce nebyla příliš významně kontaminována plazmatickými membránami jako tomu je u ostatních způsobů homogenizace.



Graf 2: Porovnání 4 způsobů homogenizace pomocí jednobodového stanovení

A - Ultra-turrax (24000 rpm) 15 s, sklo-teflonový homogenizátor (1200 rpm) 1 min.

B - Ultra-turrax (24000 rpm) 15 s, sklo-teflonový homogenizátor (1200 rpm) 3 min.

C - Ultra-turrax (24000 rpm) 30 s, sklo-teflonový homogenizátor (1200 rpm) 0,5 min.

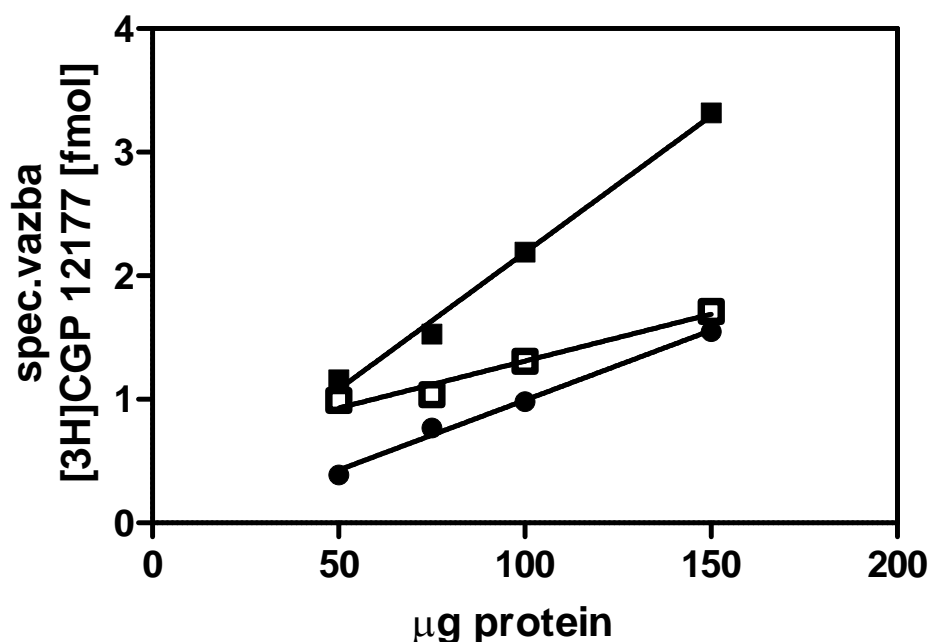
D - Ultra-turrax (24000 rpm) 30 s, sklo-teflonový homogenizátor (1200 rpm) 1 min

PM - plazmatické membrány, MITO - mitochondrie, B - množství specificky vázaného [3 H]CGP 12177 [fmol.mg⁻¹ prot.]

11.3 Optimalizace vazebných pokusů

Cílem optimalizace vazebných studií α -adrenergických receptorů bylo určení optimálního množství proteinu pro saturační a kompetiční vazebné pokusy. Sledovali jsme závislost vazby 1 nM [3 H]CGP 12177 na množství proteinu přítomných ve vzorcích. Pro optimalizaci jsme si zvolili čtyři různé množství proteinu - 50 μ g, 75 μ g, 100 μ g a 150 μ g proteinu. Kromě frakce plazmatických membrán jsme pro porovnání použili také mitochondriální frakci a supernatant. Nespecifickou vazbu (Ns) jsme stanovili inkubací v přítomnosti 10 μ M L-propranololu.

Jak nám potvrdily výsledky uvedené v grafu 3, ve frakci plazmatických membrán je nejvyšší vazba [3 H]CGP 12177, což koresponduje nejvyššímu zastoupení α -adrenergických receptorů. Zatímco specifická vazba [3 H]CGP 12177 u všech tří použitých vzorků (PM, MITO, S) se zvyšujícím se množstvím proteinu roste, nespecifická vazba klesala (Tabulka 6). Abychom mohli mluvit o optimálním množství proteinu, měla by se nespecifická vazba radioligandu obecně pohybovat kolem 20-25%. Tuto podmínku u plazmatických membrán splňuje množství 100 μ g a 150 μ g proteinu. Z důvodů účinnosti množstvím tkáň jsme se nakonec rozhodli pro saturační a kompetiční pokusy použít množství 100 μ g proteinu.



Graf 3: Specifická vazba [3 H]CGP 12177 v závislosti na množství proteinu

- plazmatické membrány, - mitochondrie, - supernatant

Tabulka . 6: Specifická a nespecifická vazba [³H]CGP 12177 u PM, MITO a S p i použití 4 r zných množství protein

vzorek	50 [μg]		75 [μg]		100 [μg]		150 [μg]	
	spec. vazba [fmol]	Ns [%]	spec. vazba [fmol]	Ns [%]	spec. vazba [fmol]	Ns [%]	spec. vazba [fmol]	Ns [%]
PM	1,16	34,7	1,53	27,0	2,19	21,2	3,32	18,1
MITO	0,99	39,7	1,04	35,2	1,31	32,1	1,71	31,5
S	0,39	48,4	0,77	36,4	0,98	33,6	1,55	27,2

Ns - nespecifická vazba, PM- plazmatické membrány, MITO - mitochondrie, S - supernatant

11.4 Charakterizace β-adrenergických receptorů po adaptaci potkanů na daný model hypoxie

11.4.1 Saturační pokusy

Vliv tří různých modelů hypoxie na počet β-adrenergických receptorů v myokardech potkanů jsme stanovili měřením specifické vazby β-adrenergického antagonisty [³H]CGP 12177 k srdečním membránám kontrolních (N) a ovlivněných (INH/R, INH, CNH) zvířat. Saturační pokusy jsme určili maximální vazebnou kapacitu tkáň (B_{max}) a rovnovážnou disociační konstantu (K_d). Pokusy jsme prováděli na hrubých membránách izolovaných z pravé a levé komory zkoumaných zvířat. V saturačních pokusech jsme měřili množství specificky vázaného [³H]CGP 12177 v závislosti na jeho rostoucí koncentraci (od 0,06 nM do 4 nM). Nespecifickou vazbu (Ns) jsme stanovili inkubací v přítomnosti 10 μM L-propranololu. Pokusy jsme pro každou skupinu vzorku prováděli třikrát nezávisle na sobě a to v triplicátech. Pro grafické znázornění jsme si poté od každé skupiny vybrali jeden pokus, jehož data jsme zanesli do grafu společného pro všechny typy i skupiny (Grafy . 4 a 5).

Jak je vidět v tabulce . 7, v levých komorách nedochází ani u jednoho hypoxického modelu v porovnání s kontrolou k významným změnám u maximální vazebné kapacity (B_{max}) ani u rovnovážné disociační konstanty (K_d). Naproti tomu, jak vyplývá z tabulky . 8, v pravých komorách izolovaných ze zvířat po adaptaci na INH/R a CNH došlo u B_{max} ke snížení téměř o třetinu, zatímco hodnoty K_d se téměř neměnily.

Tabulka . 7: Hodnoty B_{max} a K_d u vzork izolovaných z levých komor

	B_{max} [fmol.mg ⁻¹]	K_d [nM]
N	24,64 ± 0,73	0,41 ± 0,03
INH/R	25,78 ± 1,00	0,37 ± 0,06
INH	27,21 ± 0,94	0,32 ± 0,01
CNH	25,62 ± 0,54	0,38 ± 0,05

Hodnoty jsou vyjád eny jako aritmetický pr m r ± S.E.M. ze t í nezávislých pokus provedených v triplikátech.

N - normoxie, INH/R - intermitentní normobarická hypoxie, INH - intermitentní normobarická hypoxie, CNH - chronická normobarická hypoxie, B_{max} - maximální vazebná kapacita tkán , K_d - rovnovážná disocia ní konstanta

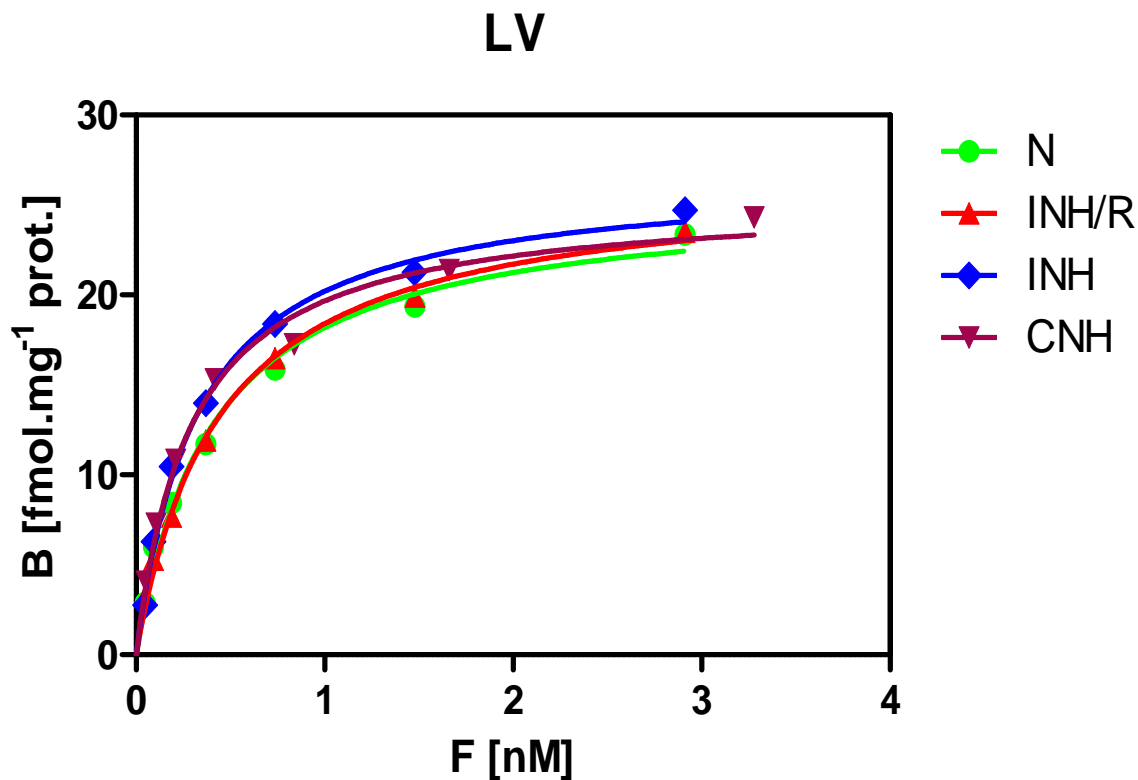
Tabulka . 8: Hodnoty B_{max} a K_d u vzork izolovaných z pravých komor

	B_{max} [fmol.mg ⁻¹]	K_d [nM]
N	29,47 ± 1,24	0,30 ± 0,01
INH/R	21,17 ± 0,65 *	0,30 ± 0,02
INH	30,34 ± 1,12	0,31 ± 0,04
CNH	21,68 ± 1,45 *	0,35 ± 0,03

Hodnoty jsou vyjád eny jako aritmetický pr m r ± S.E.M. ze t í nezávislých pokus provedených v triplikátech.

N - normoxie, INH/R - intermitentní normobarická hypoxie, INH - intermitentní normobarická hypoxie, CNH - chronická normobarická hypoxie, B_{max} - maximální vazebná kapacita tkán , K_d - rovnovážná disocia ní konstanta

* signifikantní rozdíl mezi daným hypoxickým modelem a kontrolou (p < 0,05)



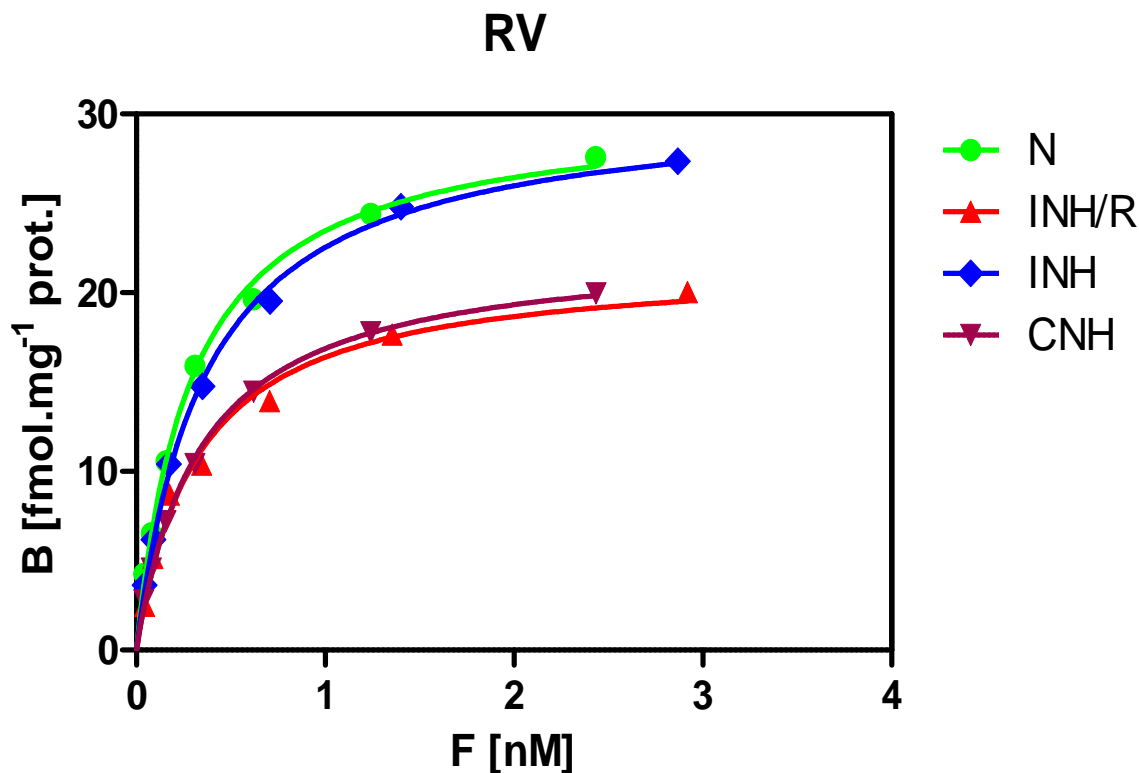
Graf . 4: Satura ní k ivka [³H]CGP 12177 u N, INH/R, INH a CNH - levé komory (LV)

Satura ní pokus p edstavující specifickou vazbu [³H]CGP 12177 k β -adrenergním receptor m hrubých membrán izolovaných z levých komor zkoumaných potkan (N, INH/R, INH, CNH) v závislosti na jeho rostoucí koncentraci. Koncentrace [³H]CGP 12177 byla pouffitá v rozp tí 0,06 - 4 nM. Jedná se o graf sestavený z dat, která byla vybraná ze t í pokus od každé zkoumané skupiny.

N - normoxie, INH/R - intermitentní normobarická hypoxie, INH - intermitentní normobarická hypoxie, CNH - chronická normobarická hypoxie

osa x : koncentrace volného [³H]CGP 12177, F [nM]

osa y : množství specificky vázaného [³H]CGP 12177 k β -adrenergním receptor m,
B [fmol.mg⁻¹ prot.]



Graf . 5: Satura ní k ivka [³H]CGP 12177 u N, INH/R, INH a CNH - pravé komory (RV)

Satura ní pokus p edstavující specifickou vazbu [³H]CGP 12177 k β -adrenergním receptor m hrubých membrán izolovaných z pravých komor zkoumaných potkan (N, INH/R, INH, CNH) v závislosti na jeho rostoucí koncentraci. Koncentrace [³H]CGP 12177 byla poufítá v rozp tí 0,06 - 4 nM. Jedná se o graf sestavený z dat, která byla vybraná ze t í pokus od každé zkoumané skupiny.

N - normoxie, INH/R - intermitentní normobarická hypoxie, INH - intermitentní normobarická hypoxie, CNH - chronická normobarická hypoxie

osa x : koncentrace volného [³H]CGP 12177, F [nM]

osa y : množství specificky vázaného [³H]CGP 12177 k β -adrenergním receptor m,
B [fmol.mg⁻¹ prot.]

11.4.2 Kompetiční pokusy

B hem kompetičních pokusů jsme za fixní koncentrace radioligandu měřili změny jeho vázaného množství k α -adrenergním receptorům p ítomných ve vzorcích v závislosti na p ítomnosti mění se koncentrace kompetitoru. Jako radioligand jsme použili 1 nM [³H]CGP 12177, což je neselektivní antagonist α -adrenergních receptorů. Pokusy jsme prováděli za p ítomnosti 19 koncentrací kompetitoru ICI 118 551, které se pohybovali v rozpětí od 10^{-4} M do 10^{-10} M. ICI 118 551 je selektivním antagonistou α_2 -ARs, což má za následek jeho vazbu k α_2 -ARs u p í velmi nízkých koncentracích. Naopak, k α_1 -ARs se váže a p í po obsazení všech p ítomných α_2 -ARs, tudíž a p í vyšších koncentracích. Po vyhodnocení naměřených hodnot nelineární regresní analýzou pomocí programu GraphPad Prism 5 jsme získali procentuální zastoupení α_2 -ARs a zdánlivou disocia ní konstantu vyjadující afinitu ICI 118551 k α_1 -ARs a α_2 -ARs (K_i). Pokusy jsme prováděli na hrubých membránách izolovaných z pravé a levé komory zkoumaných zvířat. Nespecifickou vazbu (N_s) jsme stanovili inkubací v p ítomnosti $10 \mu\text{M}$ L-propranololu. Pokusy jsme pro každou skupinu vzorku prováděli t íkrát nezávisle na sobě a to v triplicátech.

Jak je patrné z tabulek . 9 a 10, procentuální zastoupení α_2 -ARs a zdánlivá disocia ní konstanta vyjadující afinitu ICI 118551 k α_2 -ARs se v pravé ani levé komoře u zvířat adaptovaných na t í r zné modely hypoxie v porovnání s kontrolou významně nezměnily. I když by se mohlo zdát, že u INH/R a zejména u CNH v pravé komoře došlo k významnějšímu nárůstu procentuálního zastoupení α_2 -ARs, t-test provedený programem GraphPad Prim 5 tento předpoklad nepotvrdil. Ukázalo se, že také zdánlivá disocia ní konstanta vyjadující afinitu ICI 118551 k α_1 -ARs se u všech t í hypoxických modelu v pravých komorách a u INH modelu v levých komorách nezměnila. Signifikantní rozdíl se prokázal pouze u zdánlivé disocia ní konstanty vyjadující afinitu ICI 118551 k α_1 -ARs u modelu INH/R a CNH. Výsledky kompetičních pokusů jsou znázorněny v grafech . 6 a 7.

Tabulka . 9: Procentuální zastoupení β_2 -ARs a zdánlivá disocia ní konstanta vyjad ující afinitu ICI 118551 k β_2 -ARs a β_1 -ARs u vzork izolovaných z levých komor

	β_2 - AR [%]	$K_i \beta_2$ [nM]	$K_i \beta_1$ [μ M]
N	35,09 \pm 2,19	3,63 \pm 0,66	1,29 \pm 0,24
INH/R	30,33 \pm 1,59	2,19 \pm 0,53	0,56 \pm 0,02 *
INH	33,60 \pm 3,03	2,15 \pm 0,46	1,06 \pm 0,11
CNH	29,68 \pm 1,56	2,05 \pm 0,53	0,63 \pm 0,08 *

Hodnoty jsou vyjád eny jako aritmetický pr m r \pm S.E.M. ze t í nezávislých pokus provedených v triplikátech.

N - normoxie, INH/R - intermitentní normobarická hypoxie, INH - intermitentní normobarická hypoxie, CNH - chronická normobarická hypoxie, K_i - zdánlivá disocia ní konstanta vyjad ující afinitu ICI 118551 k β -adrenergním receptor m

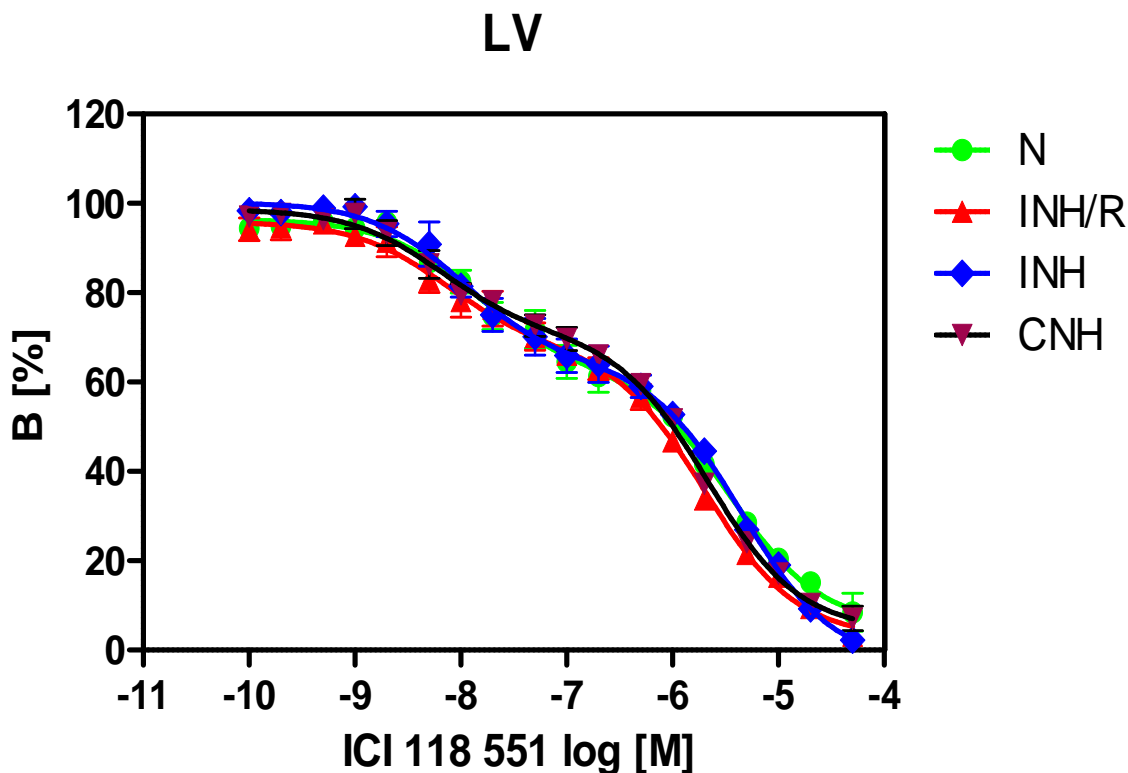
* signifikantní rozdíl mezi daným hypoxickým modelem a kontrolou ($p < 0,05$)

Tabulka . 10: Procentuální zastoupení β_2 -ARs a zdánlivá disocia ní konstanta vyjad ující afinita ICI 118551 k β_2 -ARs a β_1 -ARs u vzork izolovaných z pravých komor

	β_2 [%]	$K_i \beta_2$ [nM]	$K_i \beta_1$ [μ M]
N	32,30 \pm 1,41	2,24 \pm 0,67	0,51 \pm 0,06
INH/R	37,80 \pm 3,08	1,95 \pm 0,56	0,52 \pm 0,17
INH	33,80 \pm 2,22	2,21 \pm 0,29	0,81 \pm 0,28
CNH	40,43 \pm 0,29	2,11 \pm 0,73	0,68 \pm 0,10

Hodnoty jsou vyjád eny jako aritmetický pr m r \pm S.E.M. ze t í nezávislých pokus provedených v triplikátech.

N - normoxie, INH/R - intermitentní normobarická hypoxie, INH - intermitentní normobarická hypoxie, CNH - chronická normobarická hypoxie, K_i - zdánlivá disocia ní konstanta vyjad ující afinitu ICI 118551 k β -adrenergním receptor m

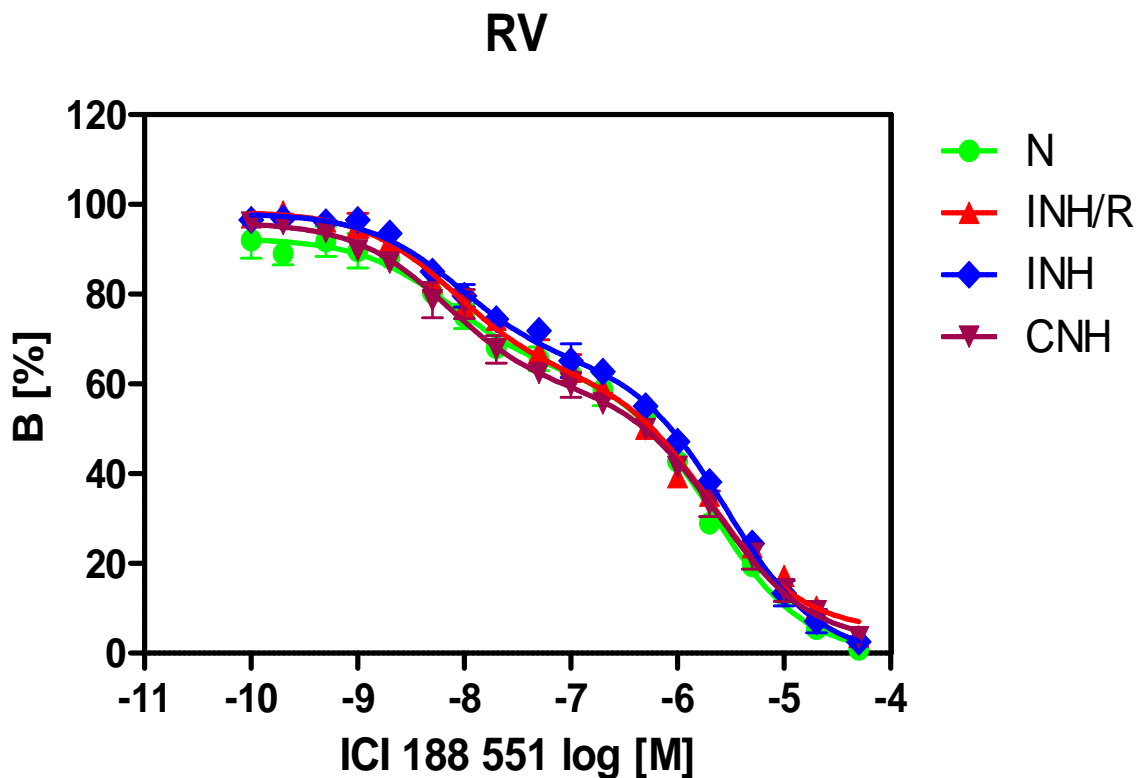


Graf . 6: Vliv ICI 118 551 na vazbu [³H]CGP 12177

Kompeti ní pokus p edstavující zm ny v mnofství vázaného radioligandu [³H]CGP 12177 k β -adrenergním receptor m hrubých membrán izolovaných z levých komor zkoumaných potkan (N, INH/R, INH, CNH) v závislosti na p ítomnosti m nící se koncentrace kompetitoru ICI 118551. Koncentrace [³H]CGP 12177 byla 1 nM a koncentrace ICI 118551 se pohybovala v rozp tí od 10^{-4} M do 10^{-10} M. Jednotlivé body p edstavují aritmetický pr m r \pm S.E.M ze t í nezávislých pokus provedených v triplikátech. N - normoxie, INH/R - intermitentní normobarická hypoxie, INH - intermitentní normobarická hypoxie, CNH - chronická normobarická hypoxie, LV - levá komora

osa x : dekadický logaritmus koncentrace ICI 118551, [M]

osa y : mnofství specificky vázaného [³H]CGP 12177 vyjád ené jako procenta jeho vazby v nep ítomnosti ICI 118551, B [%]



Graf . 7: Vliv ICI 118 551 na vazbu [³H]CGP 12177

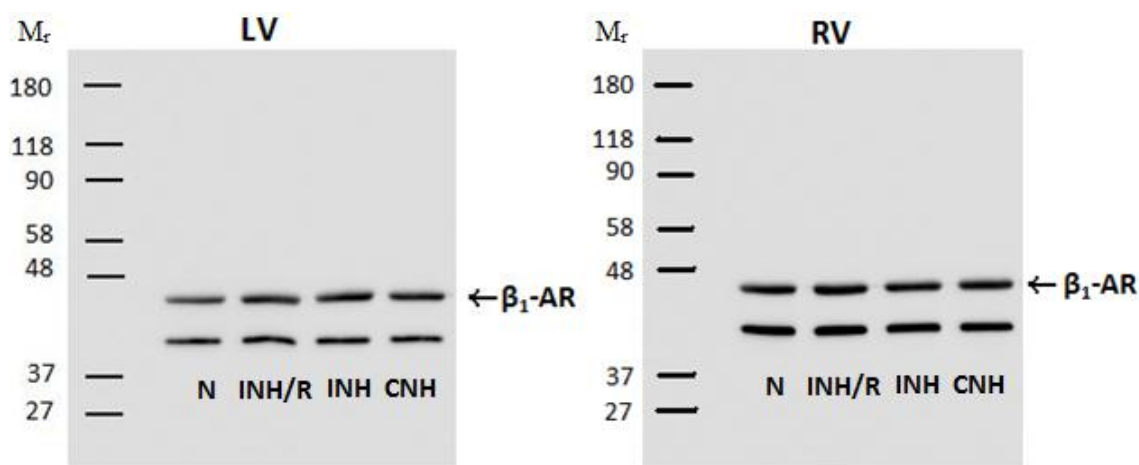
Kompeti ní pokus p edstavující zm ny v mnofství vázaného radioligandu [³H]CGP 12177 k β -adrenergním receptor m hrubých membrán izolovaných z pravých komor zkoumaných potkan (N, INH/R, INH, CNH) v závislosti na p ítomnosti m nící se koncentrace kompetitoru ICI 118551. Koncentrace [³H]CGP 12177 byla 1 nM a koncentrace ICI 118551 se pohybovala v rozp tí od 10^{-4} M do 10^{-10} M. Jednotlivé body p edstavují aritmetický pr m r \pm S.E.M ze t í nezávislých pokus provedených v triplikátech. N - normoxie, INH/R - intermitentní normobarická hypoxie, INH - intermitentní normobarická hypoxie, CNH - chronická normobarická hypoxie, RV - pravá komora

osa x : dekadický logaritmus koncentrace ICI 118551, [M]

osa y : mnofství specificky vázaného [³H]CGP 12177 vyjád ené jako procenta jeho vazby v nep ítomnosti ICI 118551, B [%]

11.4.3 SDS-PAGE elektroforéza, Western blotting a imunodetekce

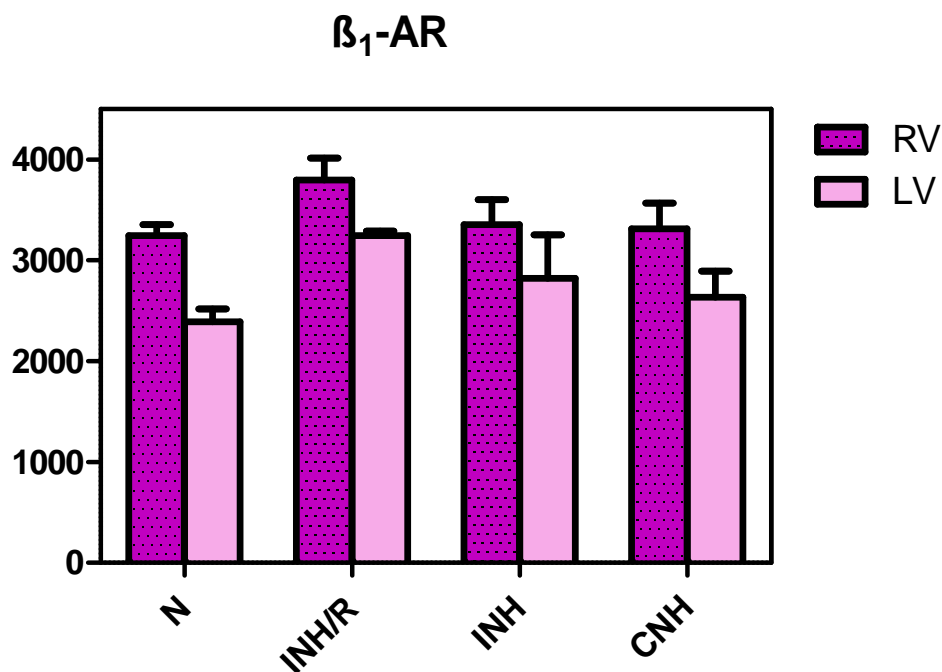
SDS-PAGE elektroforézu s následným Western blottingem a imunodetekcí jsme zvolili jako doplňkovou metodu vazebných pokusů k charakterizaci β -adrenergických receptorů. Touto metodou jsme zjistili rozdíly v zastoupení β_1 - a β_2 -adrenergických receptorů u jednotlivých vzorků (N, INH/R, INH, CNH) a mezi levou a pravou komorou. Filmy jsme po vyvolání naskenovali a k vyhodnocení jednotlivých skvrn zastupujících daný vzorek (Obrázek 9 a 10) jsme použili program Image J, který rozeznal kvantitativní zastoupení β -adrenergických receptorů v jednotlivých bodech. Výsledky jsme zanesli do grafů 8 a 9. Ukázalo se, že β_1 -ARs jsou více zastoupené v pravých komorách, zatímco β_2 -ARs v levých, s výjimkou u skupiny adaptované na CNH. Při porovnávání jednotlivých skupin adaptovaných na daný model hypoxie s kontrolou jsme zjistili, že zastoupení β_1 -ARs se u nich v pravé ani levé komoře nijak zvlášť nezměnilo. Také u β_2 -ARs v levých komorách nedošlo k velkým změnám. Pouze při porovnávání zastoupení β_2 -ARs u jednotlivých skupin v pravých komorách se prokázal signifikantní rozdíl oproti kontrole u adaptace na INH/R a CNH (Graf 9).



Obrázek 9: Distribuce β_1 -ARs u jednotlivých vzorků v levé a pravé komoře

čísla po stranách představují molekulové hmotnosti (M_r) standardu v kDa.

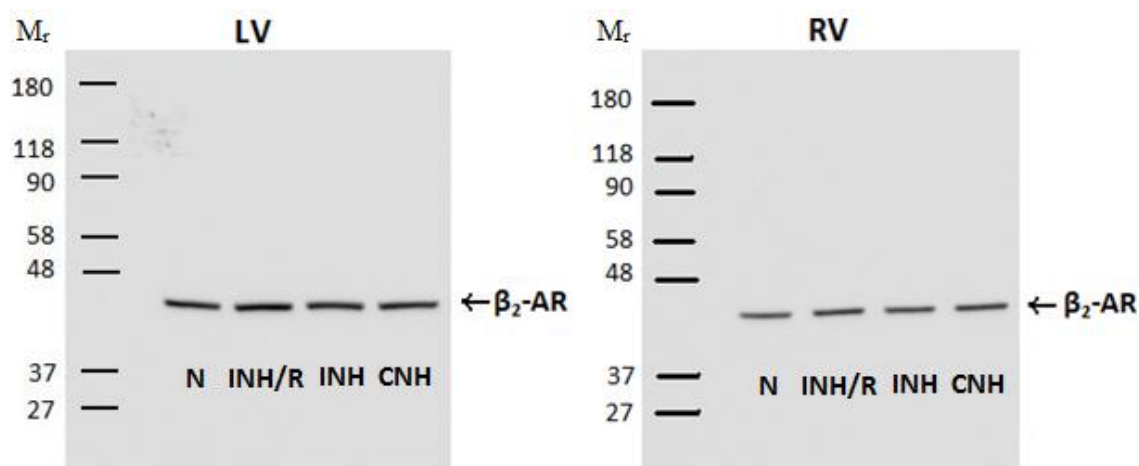
LV - levá komora, RV - pravá komora, N - normoxie, INH/R - intermitentní normobarická hypoxie, INH - intermitentní normobarická hypoxie, CNH - chronická normobarická hypoxie



Graf . 8: Distribuce β_1 -ARs u jednotlivých vzorků v levé a pravé komoře

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr \pm S.E.M ze tří nezávislých pokusů provedených v triplicátech.

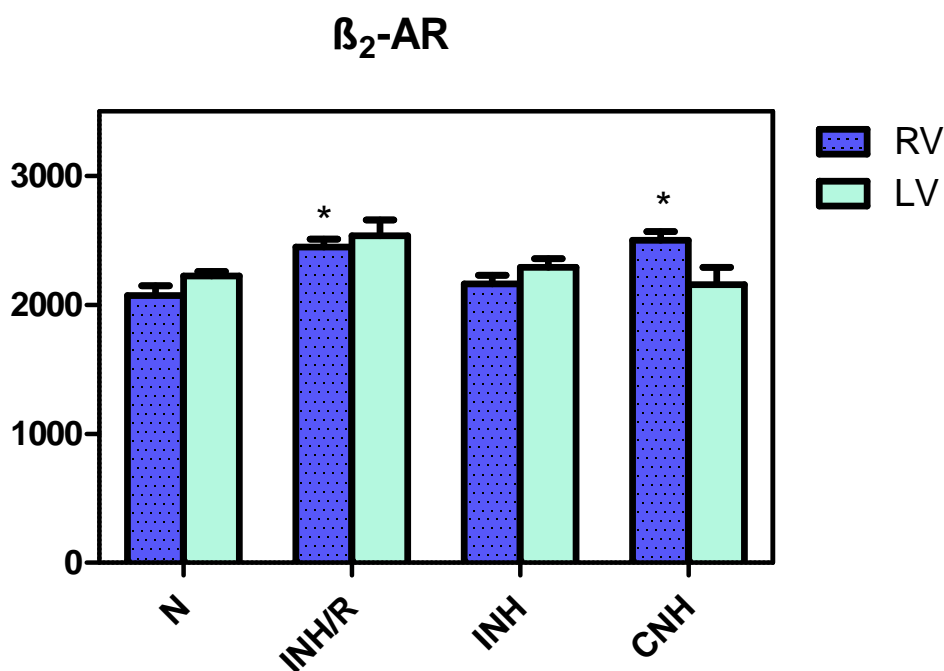
LV - levá komora, RV - pravá komora, N - normoxie, INH/R - intermitentní normobarická hypoxie, INH - intermitentní normobarická hypoxie, CNH - chronická normobarická hypoxie



Obrázek . 10: Distribuce β_2 -ARs u jednotlivých vzorků v levé a pravé komoře

čísla po stranách představují molekulové hmotnosti (M_r) standardu v kDa.

LV - levá komora, RV - pravá komora, N - normoxie, INH/R - intermitentní normobarická hypoxie, INH - intermitentní normobarická hypoxie, CNH - chronická normobarická hypoxie



Graf .9: Distribuce β_2 -ARs u jednotlivých vzorků v levé a pravé komoře

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr \pm S.E.M. ze tří nezávislých pokusů provedených v triplikátech.

LV - levá komora, RV - pravá komora, N - normoxie, INH/R - intermitentní normobarická hypoxie, INH - intermitentní normobarická hypoxie, CNH - chronická normobarická hypoxie

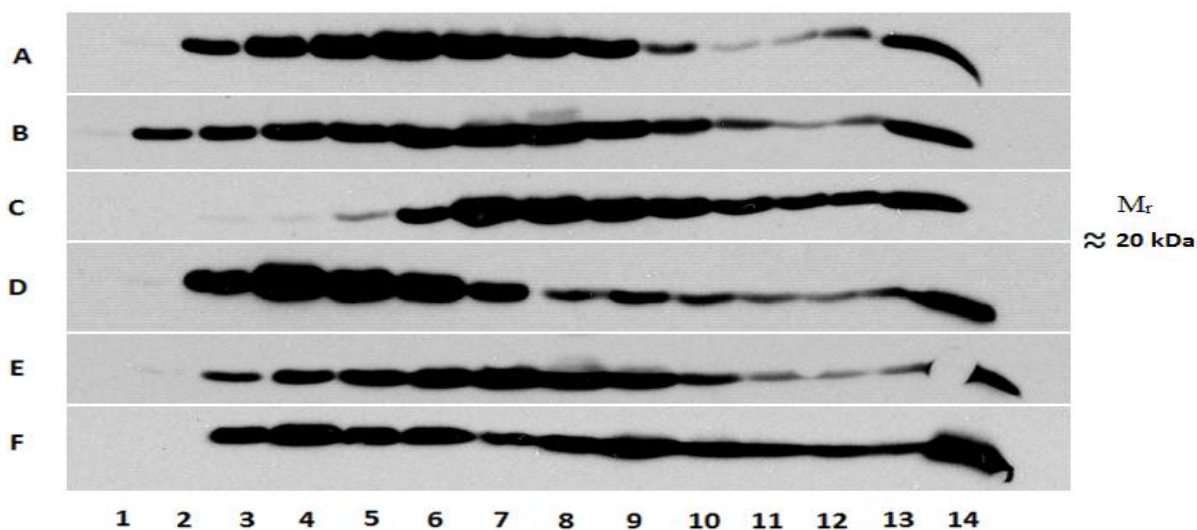
* signifikantní rozdíl mezi daným hypoxickým modelem a kontrolou ($p < 0,05$)

11.5 Membránové mikrodomény (rafty)

Obecně je známo, že membránové rafty představují část membrány s jedinečným složením lipidů a proteinů, kde dochází ke koncentraci velkého množství molekul různých signálních kaskád. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli pro jejich izolaci a prozkoumání toho, zda také β -adrenergní receptory patří mezi signální molekuly, které se zde soustřeďují. Pro izolaci membránových raftů jsme použili metodu založenou na solubilizaci membrán pomocí neiontového detergentu Tritonu X-100. V našem experimentu jsme se zaměřili na porovnání úrovně solubilizace membrán při použití různých koncentrací Tritonu X-100 (0,1%, 0,2%, 0,5% a 1%) při teplotě 4 °C a dvou koncentrací Tritonu X-100 (0,1% a 1%) při laboratorní teplotě (~ 25 °C). Takto získané fragmenty plazmatických membrán jsme rozdělili na základě jejich vzájemné hustoty flotací na sacharózovém hustotním gradientu. Profil rozdělení jednotlivých membránových fragmentů podél flotacího sacharózového gradientu jsme určili

použitím SDS-PAGE elektroforézy, Western blottingu a následné imunodetekce membránových proteinů.

Mezi typické proteiny neboli tzv. markery membránových raftů patří kaveolin. Distribuci kaveolinu v jednotlivých frakcích odebraných ze sacharózového gradientu jsme tedy použili jako výchozí bod při porovnávání distribuce námi dále zvolených proteinů – β_1 -AR, β_2 -AR, G, Na^+/K^+ -ATPáza, adenosinový A₁-receptor a KOR-1 (Obrázky . 11 - 14). Na základě distribuce kaveolinu jsme usoudili, že k optimální solubilizaci membrány a tudíž izolaci membránových raftů došlo při použití 1% Tritonu X-100 při 4 °C. Při tomto způsobu solubilizace byl kaveolin detekován především ve frakcích 3-6 (22-26% sacharóza), s nejvyšším zastoupením ve frakci 4, zatímco u ostatních koncentrací Tritonu X-100, a ufl při 4 °C nebo 25 °C, nebylo jeho zastoupení tak vymezeno (Obrázek . 11). Při porovnávání distribuce námi dále vybraných membránových proteinů s distribucí kaveolinu u způsobu solubilizace membrán, který jsme zvolili za nejvhodnější, se ukázalo, že se tyto proteiny nevyskytují v membránových raftech.



Obrázek . 11: Profil distribuce kaveolinu podél flota ního sacharózového gradientu

1 - 14 : ísla frakcí odebraných ze sacharózového gradientu,

A - F : podmínky solubilizace membrán

A - 0,1% Triton X-100, 4 °C

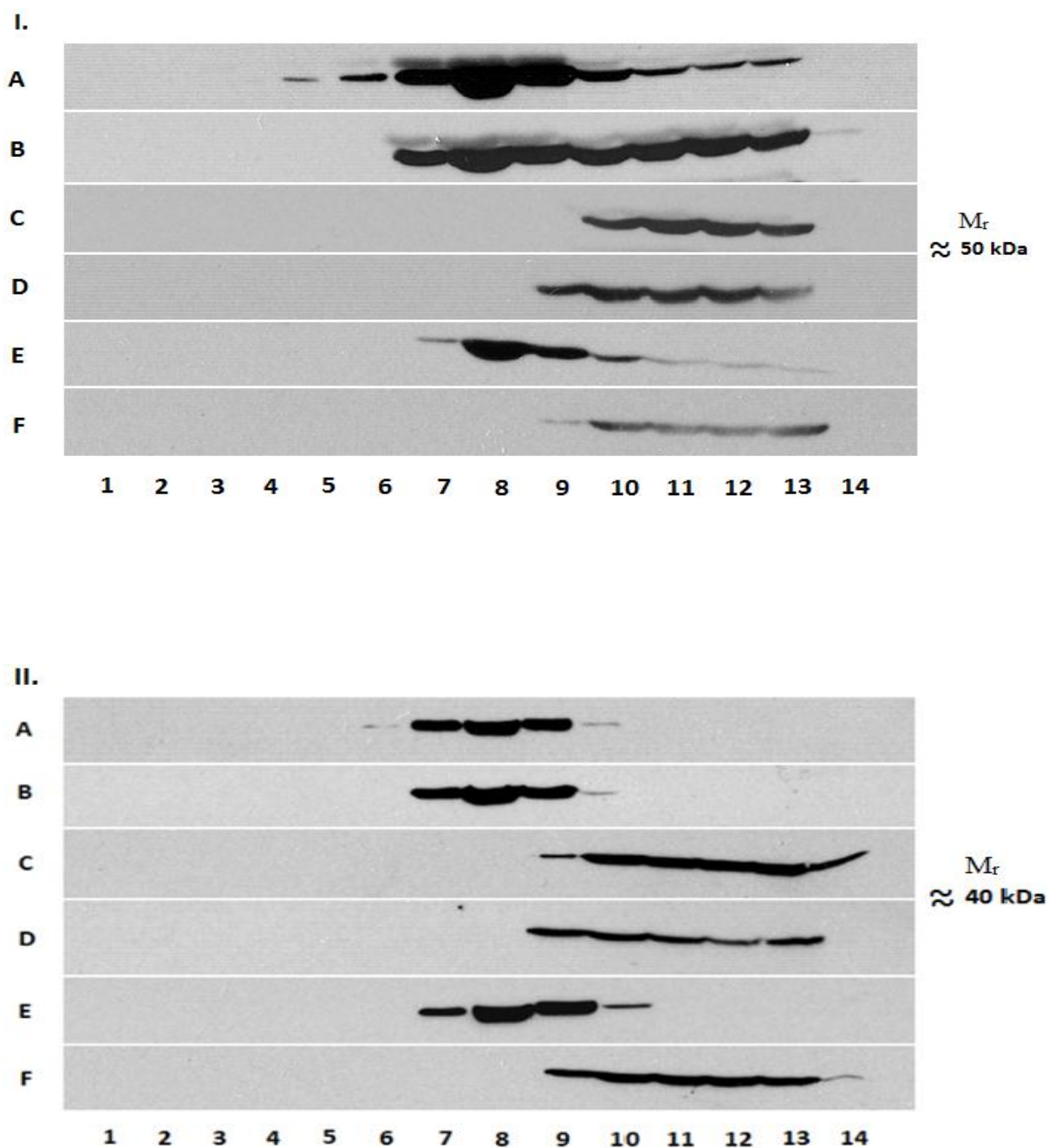
B - 0,2% Triton X-100, 4 °C

C - 0,5% Triton X-100, 4 °C

D - 1% Triton X-100, 4 °C

E - 0,1% Triton X-100, 25 °C

F - 1% Triton X-100, 25 °C



Obrázek . 12: Profil distribuce α_1 -AR (I.) a α_2 -AR (II.) podél flota ního sacharózového gradientu

1 - 14 : ísla frakcí odebraných ze sacharózového gradientu,

A - F : podmínky solubilizace membrán

A - 0,1% Triton X-100, 4 °C

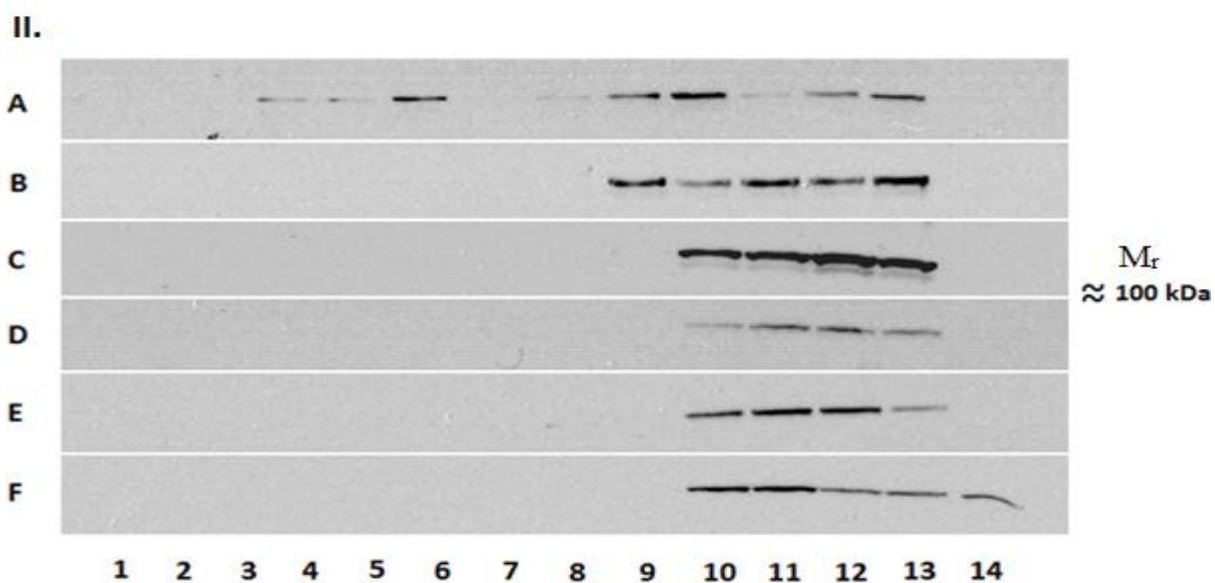
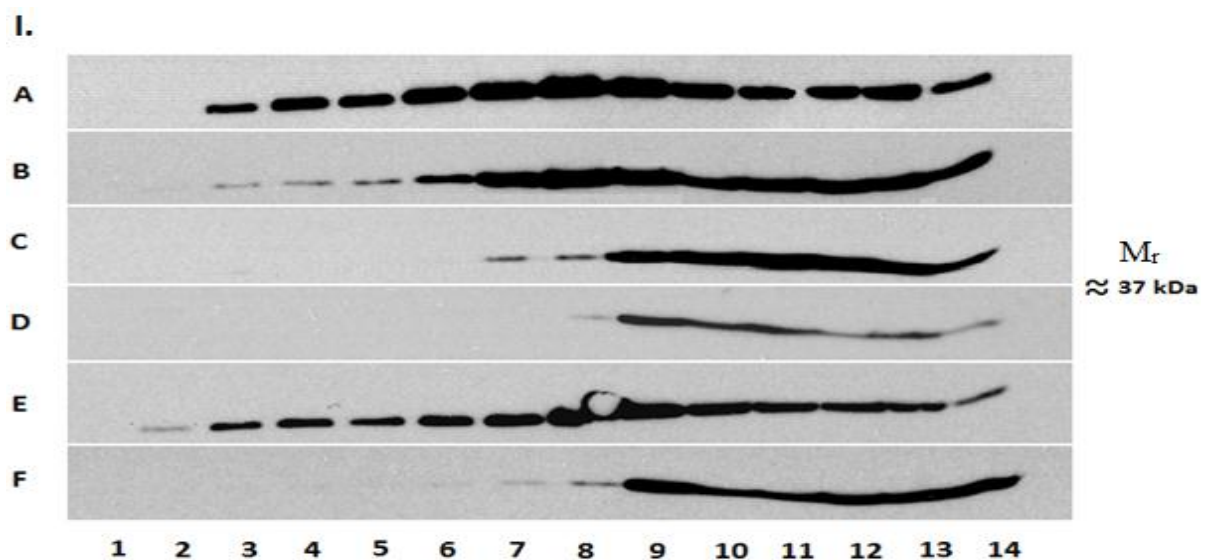
B - 0,2% Triton X-100, 4 °C

C - 0,5% Triton X-100, 4 °C

D - 1% Triton X-100, 4 °C

E - 0,1% Triton X-100, 25 °C

F - 1% Triton X-100, 25 °C



Obrázek . 13: Profil distribuce G (I.) a Na/K-ATPázy (II.) podél flota ního sacharózového gradientu

1 - 14 : ísla frakcí odebraných ze sacharózového gradientu,

A - F : podmínky solubilizace membrán

A - 0,1% Triton X-100, 4 °C

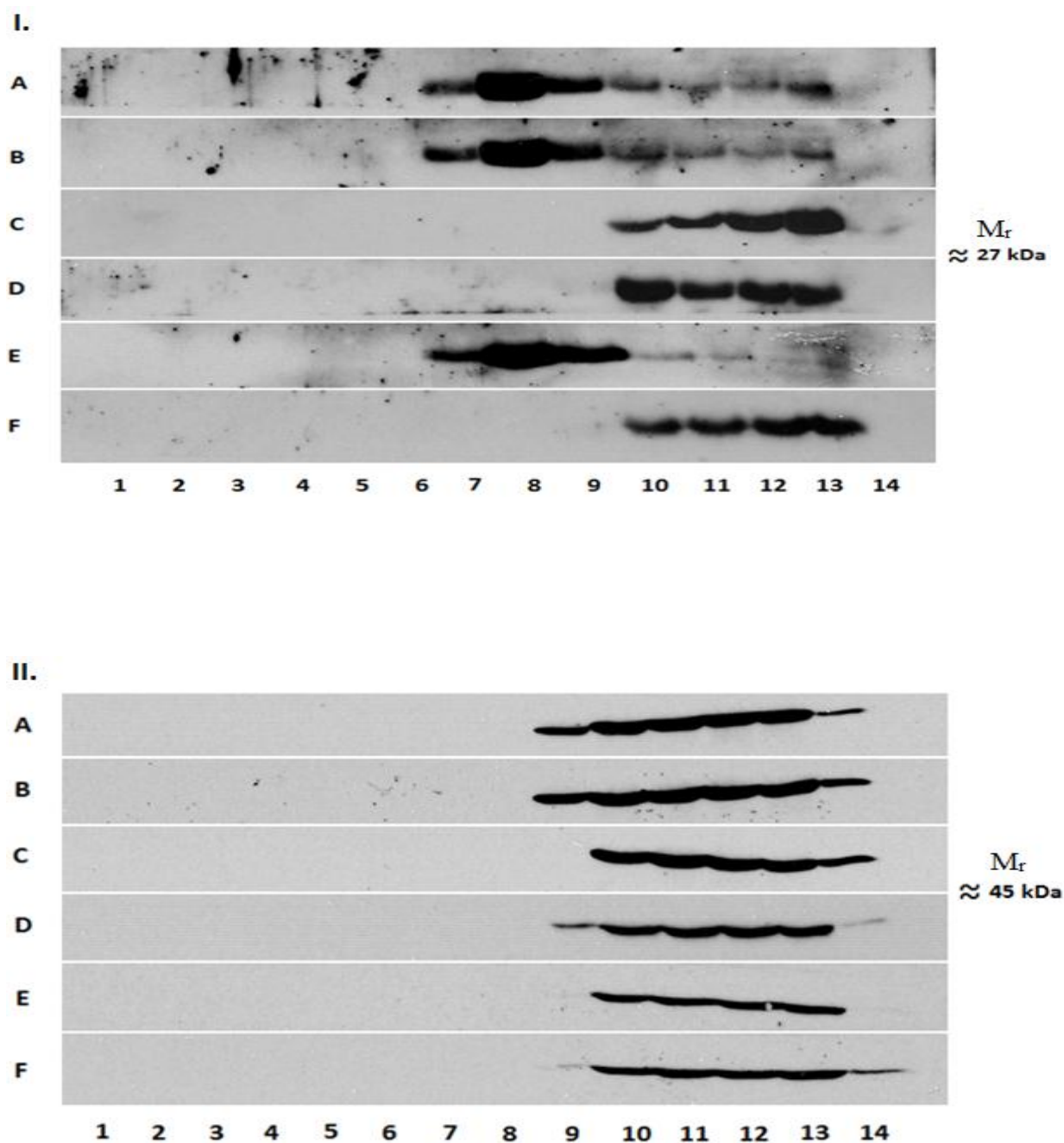
B - 0,2% Triton X-100, 4 °C

C - 0,5% Triton X-100, 4 °C

D - 1% Triton X-100, 4 °C

E - 0,1% Triton X-100, 25 °C

F - 1% Triton X-100, 25 °C



Obrázek . 14: Profil distribuce adenosinového A1-receptoru (I.) a KOR-1 (II.) podél flota ního sacharózového gradientu

1 - 14 : ísla frakcí odebraných ze sacharózového gradientu,

A - F : podmínky solubilizace membrán

A - 0,1% Triton X-100, 4 °C

B - 0,2% Triton X-100, 4 °C

C - 0,5% Triton X-100, 4 °C

D - 1% Triton X-100, 4 °C

E - 0,1% Triton X-100, 25 °C

F - 1% Triton X-100, 25 °C

12 Diskuze

Hlavním cílem této diplomové práce, bylo zjistit, zda dochází ke změnám v β -adrenergní signalizaci v myokardu potkana během adaptace na chronickou hypoxii. V posledních letech se ukázalo, že adaptace na chronickou hypoxii může být vedle preconditioningu další jev vedoucí ke zlepšení srdeční ischemické tolerance. Je známo, že právě ischemické/reperfúzní poškození srdce je jednou z nejčastějších příčin úmrtí obyvatel rozvinutých zemí. Proto se studium kardioprotektivních mechanismů, včetně adaptace na chronickou hypoxii, stalo v dnešní době hlavním cílem řady klinických a experimentálních laboratoří. Bylo prokázáno, že adaptace na chronickou hypoxii zvyšuje srdeční toleranci ke většině hlavních škodlivých následků akutní kyslíkové deprivace, jako je infarkt myokardu, kontraktilní dysfunkce a komorové arytmie (Kolar and Ostadal, 2004). A kolik bylo navrženo mnoho faktorů hrajících potenciální roli v kardioprotekci navozené adaptací na chronickou hypoxii, podrobný mechanismus této protekce nebyl ještě stále pochopen.

Ostadal a spol. v roce 1984 ukázali, že během adaptace potkanů na intermitentní chronickou hypoxii dochází zpočátku ke zvýšení adrenergní stimulace v důsledku zvýšení hladiny katecholaminů (Ostadal et al., 1984). Zdá se ale, že zvýšení sympatické aktivity indukované hypoxií závisí na experimentálním modelu chronické hypoxie. Také délka stimulace adrenergních receptorů rozhoduje o tom, zda bude docházet k přenosu signálu či ne. Omezené údaje týkající se intermitentní formy chronické hypoxie (hlavně u modelů adaptace, kdy docházelo k rychlému stídání hypoxie a normoxie) uvádí, že tento typ adaptace je spojen s výrazným zvýšením plasmatické hladiny katecholaminů (Germack et al., 2002; Zoccal et al., 2007). Přes tyto poznatky, systémové studie zkoumající srdeční adrenergní signalizaci v souvislosti s adaptací modelu (kontinuální vs. intermitentní forma) stále chybí. Proto jsme se v naší laboratoři rozhodli zaměřit na porovnání trvalé a intermitentní hypoxie a jejich vliv na β -adrenergní signalizaci.

K tomuto experimentu jsme použili tři skupiny potkanů kmene Wistar, které jsme po dobu tří týdnů adaptovali na rozdílné hypoxické podmínky v normobarické hypoxické komoře (10% O₂). Výsledné poznatky jsme porovnávali s kontrolní skupinou potkanů, které byla během této doby chována v normoxických podmínkách. Při volbě hypoxických modelů jsme se ohlíželi na předchozí studie. Jak ukázal Milano a spol. v

roce 2002, opakovaná reoxygenace je rozhodující pro navození kardioprotektivní odpovědi. Prokázali, že obnovení kontraktilní funkce bylo lepší v srdcích izolovaných z potkanů, kteří byli během hypoxického adaptačního protokolu vystaveni reoxygenaci po dobu 1 h/den, v porovnání s potkany udržovanými trvale v hypoxickém prostředí (Milano et al., 2002). Také práce Zonga a spol. (2004) prokázala robustní kardioprotekci u psího modelu adaptovaného na intermitentní normobarickou hypoxii, kdy byly psi po dobu 20 dnů každý den vystavováni 5-8 cykly krátké hypoxie (5-10 minut). Tato adaptace vedla k zabránění rozvoje komorové tachykardie a fibrilace po reperfúzi (Zong et al., 2004). Na základě těchto studií, jsme se rozhodli pro následující modely adaptace: 1. intermitentní normobarická hypoxie, kdy byly potkani vystaveni hypoxii po dobu 23 hodin a následně 1 hodinové reoxygenaci (INH/R), 2. intermitentní normobarická hypoxie, kdy byly potkani vystaveni hypoxii po dobu pouhých 8 hodin denně a zbytek dne byly v normoxickém prostředí (INH), 3. kontinuální normobarická hypoxie, kdy byly potkani vystaveni hypoxii po celý den (CNH).

Na začátku experimentu, tedy před adaptací, se průměrná váha všech potkanů pohybovala v rozmezí 250-300 g. Hmotnost kontrolní skupiny potkanů se po uplynutí této týdnu pohybovala průměrně okolo 360 g. V porovnání s kontrolou došlo u všech těchto hypoxických modelů po této týdenní adaptaci k poklesu tělesné hmotnosti, což se shoduje s výsledky ostatních studií (Favret et al., 2001; Germack et al., 2002; Milano et al., 2002). Zatímco u INH modelu to byl pokles o pouhé 4%, u INH/R a CNH, kdy došlo k poklesu asi o 15% (INH/R) a 14% (CNH), se jednalo o signifikantní rozdíl oproti hmotnosti kontroly. Hmotnost srdce u všech hypoxických modelů na rozdíl od tělesné hmotnosti vzrostla. Tyto výsledky jsou odlišné v porovnání s poznatky, které při svém pokusu získal Milano a spol. v roce 2002. Z jejich experimentu se ukázalo, že hmotnost srdce u INH/R modelu se oproti kontrole zvýšila, ale naopak u CNH došlo k jejímu poklesu (Milano et al., 2002). Je známo, že k nárůstu hmotnosti srdce dochází v důsledku zvýšené hmotnosti pravé komory, která v průběhu adaptace hypertrofuje (Voelkel et al., 1981; Ostadal et al., 1984; Kolar et al., 1989). Za hypertrofii pravé komory zodpovídá plicní hypertenze, ke které během adaptace na chronickou hypoxii dochází (Rabinovitch et al., 1979). V našem případě byla hypertrofie oproti znatelnější u INH/R a CNH hypoxického modelu, kde došlo k nárůstu hmotnosti pravé komory v porovnání s kontrolou téměř o 70% u INH/R a dokonce o 86% u CNH. U INH byl tento nárůst podstatně menší (asi o 20%). Na druhou stranu, u hmotnosti levých komor nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl ani u jednoho modelu. Při shrnutí těchto

výsledku je zřejmé, že na rozdíl od INH/R a CNH nemá adaptace na INH žádný velký vliv na hmotnostní parametry zvířat.

Před přípravou vlastních vzorků a následnými experimenty s nimi jsme se zaměřili na optimalizaci způsobu přípravy vzorků a optimalizaci vazebných studií. Pro optimalizaci způsobu přípravy vzorků jsme se rozhodli z důvodu získání co nejvyššího množství tkáně s co nejvyšším množstvím námi sledovaných β -adrenergních receptorů. Porovnávali jsme tyto způsoby přípravy, které se od sebe lišily tím, jak byla srdce rozmělněna pomocí Ultra-turraxu a dobou homogenizace pomocí sklo-teflonového homogenizátoru. Pro následné porovnání jsme použili jednobodové stanovení v přítomnosti neselektivního antagonisty β -adrenergních receptorů [3 H]CGP 12177. Po vyhodnocení se ukázal být jako nejlepší způsob přípravy ten, jak byla tkáň rozmělněna po dobu 30 s pomocí Ultra-turraxu a následně homogenizována po dobu 1 minuty sklo-teflonovým homogenizátorem.

Během optimalizace vazebných studií jsme se zaměřili na určení optimálního množství proteinu pro vazebné pokusy. Zde nám šlo především o to, abychom během našich experimentů neplytvali zbytečně srdcovou tkání. Vazebné studie jsou dosti náročné, což se týká spotřeby tkáně, proto jsme se snažili zvolit takové množství proteinu, které by splňovalo podmínky pro získání co nejlepších výsledků ve vazebných studiích, ale zároveň také umožnilo opakování tohoto pokusu. Pro porovnání námi zvolených typů různých množství proteinu jsme opět použili jednobodové stanovení. Po vyhodnocení se nám nabídla dvě možná množství proteinu, které by splňovali podmínky pro optimální vazebné pokusy, a to 100 μ g a 150 μ g proteinu. Pro následující vazebné pokusy na vlastních vzorcích jsme tedy zvolili jako dostačující 100 μ g proteinu.

K charakterizaci β -adrenergních receptorů po adaptaci potkanů na výše uvedené modely hypoxie jsme použili saturační a kompetitivní vazebné studie. Saturační pokusy jsme zjišťovali celkové množství β -adrenergních receptorů (B_{max}) v jednotlivých vzorcích, které odpovídalo množství specifických vazebných míst pro jejich neselektivního antagonistu [3 H]CGP 12177, a rovnovážnou disociační konstantu tohoto radioligandu (K_d). Pokusy jsme prováděli na vzorcích hrubých membrán získaných izolací z pravých a levých komor kontrolních a ovlivněných zvířat. Množství specificky vázaného radioligandu jsme měřili v závislosti na jeho stoupající koncentraci (od 0,06 nM do 4 nM). Výsledné hodnoty B_{max} se v levých komorách pohybovaly od

24,64 fmol.mg⁻¹ prot. do 27,21 fmol.mg⁻¹ prot. a hodnoty K_d od 0,32 nM do 0,41 nM. Nebyly zde tedy zjištěny žádné signifikantní rozdíly. Tyto hodnoty odpovídají n kterým předchozím studiím jako například práci Hrbasové a spol., Bjornerheima a spol. nebo Wintera a spol. (Winter et al., 1986; Bjornerheim et al., 1991; Hrbasova et al., 2003). Také hodnoty K_d u pravých komor nevykazovaly žádné v t-í rozdíly mezi jednotlivými modely a kontrolou, pohybovaly se v rozmezí od 0,30 nM do 0,35 nM. Naproti tomu, u hodnot B_{max} v pravých komorách se objevil signifikantní rozdíl hned u dvou modelů ve srovnání s kontrolou. Zatímco hodnoty B_{max} u kontroly a INH modelu byly 29,47 fmol.mg⁻¹ prot. (N) a 30,34 fmol.mg⁻¹ prot. (INH), u INH/R a CNH modelu došlo k výraznému snížení, hodnoty odpovídaly 21,17 fmol.mg⁻¹ prot. (INH/R) a 21,68 fmol.mg⁻¹ prot. (CNH). Snížení hustoty β -adrenergních receptorů (B_{max}) prokázali také n které dříve j-í práce. Například Volkel a spol. v roce 1981 zaznamenali pokles B_{max} jak v pravé, tak levé komoře po 5 týdnech adaptace na hypobarickou hypoxii (Voelkel et al., 1981). Naproti tomu Kacimi a spol. (1992) během pokusu zjistili, že do 15 dne adaptace na intermitentní chronickou hypoxii nedochází ke změně B_{max} ani v jedné komoře, zatímco po 21 dnech objevili v levé komoře pokles o 24% (Kacimi et al., 1992). Také další práce ukazují na pokles B_{max} (Antezana et al., 1992; Favret et al., 2001). Rozdílné výsledky mohou být částečně vysvětleny použitím různých vazebných technik, které dané laboratoře využívaly k získání výsledků. Hlavní role však také může být přičítána rozdílným modelům, časovým průběhům a rozdílným hypoxickým podmínkám používaným při experimentech.

Kompetitivními pokusy jsme za fixní koncentrace [³H]CGP 12177 určili procentuální zastoupení β_2 -adrenergních receptorů ve vzorcích hrubých membrán a afinitu β_1 -ARs k použitému kompetitoru (K_i), kterým byl ICI 118 551, což je selektivní antagonist β_2 -adrenergních receptorů. Po vyhodnocení jsme se zaměřili na to, zda došlo ke změně v těchto dvou parametrech během adaptace na výše uvedené modely hypoxie v porovnání s kontrolou. Ukázalo se, že v levých komorách kontrolních potkanů se procentuální zastoupení β_2 -ARs pohybuje přibližně okolo 35%, jejich afinita ke kompetitoru je 3,63 nM a afinita β_1 -ARs ke kompetitoru je 1,29 μ M. Hodnoty těchto parametrů přibližně odpovídají literárním údajům (Muntz, 1992). Při porovnávání hypoxických modelů s kontrolou jsme zjistili, že procentuální zastoupení β_2 -ARs a jejich afinita ke kompetitoru, se v levých komorách významně nezměnila. Signifikantní rozdíl se ale ukázal pouze u afinity β_1 -ARs ke kompetitoru, a to u INH/R a CNH modelu, kde afinita klesla na polovinu oproti kontrole. Tuto změnu je obtížné najít

interpretovat, ale na druhou stranu dvojnásobný rozdíl v afinitě není příliš velký a obecně nijak významný. V pravých komorách kontrolních potkanů bylo procentuální zastoupení α_2 -ARs 32%, jejich afinita ke kompetitoru 2,24 nM a afinita α_1 -ARs ke kompetitoru 0,51 μ M. V porovnání s kontrolou nedošlo u hypoxických modelů ani u jednoho z těchto parametrů k signifikantnímu rozdílu. Přesto se zdá, že procentuální zastoupení α_2 -ARs u INH/R a CNH modelu vzrostlo. Toto je, když vezmeme v úvahu pokles celkového množství α -adrenergních receptorů u těchto dvou modelů, zajímavý výsledek. Mardon a spol. v roce 1998 ve své práci uvedli, že za pokles celkového množství α -adrenergních receptorů může zvýšená sympatická aktivita, která vede k desenzitizaci těchto receptorů, ale také zejména pokles hustoty α_1 -adrenergních receptorů. Své tvrzení dokázali za použití kompetitoru practololu, což je selektivní antagonist α_1 -ARs (Mardon et al., 1998). Tím pouze potvrdili výsledky předchozích studií, které uvádějí, že trvale zvýšená hladina katecholaminů má za následek redukcii α_1 -ARs, zatímco hladina α_2 -ARs zůstává beze změny (Kiuchi et al., 1993; Lohse et al., 2003). Z toho vyplývá, že by INH/R a CNH hypoxický model mohl mít vliv na kardioprotekci zprostředkovanou prostřednictvím α_2 -ARs, které se podílejí na působení kardiomyocytů přes G β -PI3K-akt dráhu, a zároveň prostřednictvím internalizace α_1 -ARs, které se jinak podílejí na apoptotických drahách v kardiomyocytech. Nebylo ale prokázáno, že by jeden z těchto modelů k tomu mohl přispívat více než druhý, jednotlivé hodnoty se u těchto dvou modelů podobaly.

Také následné použití SDS-PAGE elektroforézy, Western blottingu a imunodetekce pro charakterizaci α -adrenergních receptorů ve vzorcích izolovaných z levých a pravých komor kontrolních a ovlivněných zvířat nám potvrdila výsledky získaných z kompetičních pokusů. I když tato metoda není tak citlivá jako vazebné studie, došlo k prokázání zvýšené distribuce α_2 -ARs v pravých komorách u INH/R a CNH hypoxického modelu.

Poslední část této diplomové práce byla věnována izolaci membránových raftů, jejich následné detekci prostřednictvím markeru caveolinu a porovnání profilu distribuce námi zvolených proteinů v plazmatické membráně. Je známo, že membránové rafty jsou bohaté na cholesterol a sfingolipidy, které obsahují zbytky nasycených mastných kyselin, které udávají raftům poměrně velkou rigiditu (London and Brown, 2000). Tak jim umožňuje relativní odolnost vůči solubilizaci neiontovými detergenty při nízkých teplotách, což umožnilo jejich izolaci. Další vlastností membránových raftů je také jejich nízká vzájemná hustota, která vyplývá z jejich

specifického lipidového složení (Simons and Ikonen, 1997). Toho se využívá při izolaci těchto raftů. V současné době se membránovým raftům vnuje zvýšená pozornost v důsledku jejich role v buněčné signalizaci. Objevily se důkazy, že právě membránové rafty tvoří jakási centra v plazmatické membráně, kde dochází k lokalizaci velkého množství signálních molekul, a to především molekul účastnících se drah spojených s G-proteiny (Ohkubo and Nakahata, 2007), což umožní uje urychlení přenosu signálu. V našem experimentu jsme se zaměřili tedy nejen na porovnání několika způsobů izolace raftů, ale také na to, zda se v takto izolovaných raftech vyskytují α -adrenergní receptory a další námi zvolené signální molekuly. K solubilizaci membrán jsme použili 4 různé koncentrace Tritonu X-100 a různé teplotní podmínky, vzniklé fragmenty jsme rozdělili na hustotním sacharózovém gradientu. Pomocí SDS-PAGE elektroforézy, Western blottingu a imunodetekce jsme určili profil distribuce jednotlivých proteinů. K určení nejlepšího způsobu izolace raftů jsme použili caveolin, jakožto marker raftů (Zajchowski and Robbins, 2002). Na základě jeho distribuce jsme určili, že k optimální solubilizaci membrány a tedy izolaci raftů došlo při použití 1% Tritonu X-100 při 4 °C. Při následném porovnávání profilu distribuce zvolených proteinů podél flotačního sacharózového gradientu s distribucí caveolinu se ukázalo, že tyto proteiny nejsou v raftech přítomné. U Na/K-ATPázy se to předpokládalo, jelikož je považována za vnitřinový membránový protein, ale u ostatních proteinů, a to především u β -ARs a adenosinového A1-receptoru, které patří do rodiny GPCRs, se jejich přítomnost v raftech mohla očekávat (Schwencke et al., 1999; Lasley et al., 2000; Ostrom et al., 2001). Nejpravděpodobnějším důvodem, proč se nám je na rozdíl od publikovaných prací nepodařilo v raftech detekovat, může být použití Tritonu X-100 k solubilizaci membrány. Ve většině prací se uvádí, že k degradaci srdečních membrán byla použita metoda tzv. alkalínové izolace membránových domén, která využívá 0,5 M Na_2CO_3 o pH=11. Blíží se prozkoumání této problematiky se jeví jako zajímavý cíl pro naši další výzkumnou práci.

13 Závěr

Hlavním cílem této práce byla charakterizace β_1 -adrenergních receptorů v levé a pravé komoře potkaního myokardu po adaptaci na tři různé typy hypoxických podmínek a porovnání těchto výsledků s výsledky získanými stejným postupem u potkanů chovaných v normoxických podmínkách. Po provedení saturačních a kompetičních experimentů se ukázalo, že intermitentní normobarická hypoxie (8 hodin hypoxie, 16 hodin normoxie) neměla žádný vliv na β_1 -adrenergní receptory. Hodnoty u tohoto modelu byly shodné s hodnotami naměřenými u normoxických potkanů a to jak v levé, tak v pravé komoře. Naproti tomu výsledky ze saturačních pokusů u intermitentní normobarické hypoxie (23 hodin hypoxie, 1 hodina reoxygenace) a kontinuální normobarické hypoxie (24 hodin hypoxie) ukázaly změny v celkovém množství β_1 -adrenergních receptorů (B_{max}) v pravých komorách, kde jejich počet u obou modelů klesl o více než ¼ oproti kontrole. I přes tyto kompetiční pokusy neprokázaly signifikantní změny v procentuálním zastoupení β_1 -adrenergních receptorů u těchto modelů v ani jedné komoře, zdá se být velice pravděpodobné, že u pravých komor obou modelů dochází k poklesu β_1 -adrenergních receptorů oproti normoxickým potkanům. Z toho můžeme usuzovat, že pokud by se β_1 -adrenergní receptory účastnily molekulárních mechanismů kardioprotekce při adaptaci na chronickou hypoxii, mohlo by to být právě touto cestou internalizace β_1 -ARs, které jinak zodpovídají za apoptózu kardiomyocytů, čímž mohou jako potenciální faktor za určitých okolností přispívat k srdečnímu selhání. Protože se naměřené hodnoty nijak zvlášť nelišily, naše výsledky nepostačují pro jednoznačné určení, který z těchto dvou modelů hypoxie by mohl být prospěšnější. Do budoucna by mohlo být zajímavé porovnat vliv těchto dvou modelů hypoxie na β_1 -adrenergní receptory po expozici potkanů delší než tři týdny.

14 Seznam použité literatury

Amin, P., Singh, M. and Singh, K. (2011) 'beta-Adrenergic Receptor-Stimulated Cardiac Myocyte Apoptosis: Role of beta1 Integrins', *Journal of signal transduction* 2011: 179057.

Antezana, A. M., Richalet, J. P., Antezana, G., Spielvogel, H. and Kacimi, R. (1992) 'Adrenergic system in high altitude residents', *International journal of sports medicine* 13 Suppl 1: S96-100.

Asemu, G., Papousek, F., Ostadal, B. and Kolar, F. (1999) 'Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K(ATP) channel', *Journal of molecular and cellular cardiology* 31(10): 1821-31.

Baxter, G. F., Goma, F. M. and Yellon, D. M. (1997) 'Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium', *Basic research in cardiology* 92(3): 159-67.

Beguín, P. C., Joyeux-Faure, M., Godin-Ribuot, D., Levy, P. and Ribuot, C. (2005) 'Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia', *Journal of applied physiology* 99(3): 1064-9.

Björnerheim, R., Golf, S. and Hansson, V. (1991) 'Specific non-beta-adrenergic binding sites for 125I-iodocyanopindolol in myocardial membrane preparations: a comparative study between human, rat, and porcine hearts', *Cardiovascular research* 25(9): 764-73.

Bogoyevitch, M. A., Gillespie-Brown, J., Ketterman, A. J., Fuller, S. J., Ben-Levy, R., Ashworth, A., Marshall, C. J. and Sugden, P. H. (1996) 'Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion', *Circulation research* 79(2): 162-73.

Bristow, M. R. (2000) 'beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure', *Circulation* 101(5): 558-69.

Brodde, O. E., Bruck, H. and Leineweber, K. (2006) 'Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance', *Journal of pharmacological sciences* 100(5): 323-37.

Brodde, O. E. and Michel, M. C. (1999) 'Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart', *Pharmacological reviews* 51(4): 651-90.

Brown, D. A. and Rose, J. K. (1992) 'Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface', *Cell* 68(3): 533-44.

Bylund, D. B. and Toews, M. L. (2011) 'Radioligand binding methods for membrane preparations and intact cells', *Methods in molecular biology* 746: 135-64.

Cameron, J. S. and Baghdady, R. (1994) 'Role of ATP sensitive potassium channels in long term adaptation to metabolic stress', *Cardiovascular research* 28(6): 788-96.

- Communal, C., Colucci, W. S. and Singh, K. (2000) 'p38 mitogen-activated protein kinase pathway protects adult rat ventricular myocytes against beta -adrenergic receptor-stimulated apoptosis. Evidence for Gi-dependent activation', *The Journal of biological chemistry* 275(25): 19395-400.
- Daaka, Y., Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (1997) 'Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A', *Nature* 390(6655): 88-91.
- Datta, S. R., Brunet, A. and Greenberg, M. E. (1999) 'Cellular survival: a play in three Akts', *Genes & development* 13(22): 2905-27.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M. E. (1997) 'Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery', *Cell* 91(2): 231-41.
- Ding, B., Abe, J., Wei, H., Xu, H., Che, W., Aizawa, T., Liu, W., Molina, C. A., Sadoshima, J., Blaxall, B. C. et al. (2005) 'A positive feedback loop of phosphodiesterase 3 (PDE3) and inducible cAMP early repressor (ICER) leads to cardiomyocyte apoptosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(41): 14771-6.
- Ding, H. L., Zhu, H. F., Dong, J. W., Zhu, W. Z. and Zhou, Z. N. (2004) 'Intermittent hypoxia protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by activating protein kinase C', *Life sciences* 75(21): 2587-603.
- Durand J., Physiologic adaptation to altitude and hyperexis. In: W. Brendel and R.A. Zink, Editors, *High Altitude Physiology and Medicine*, Springer-Verlag, New York (1982), pp. 209–211.
- Favret, F., Richalet, J. P., Henderson, K. K., Germack, R. and Gonzalez, N. C. (2001) 'Myocardial adrenergic and cholinergic receptor function in hypoxia: correlation with O₂ transport in exercise', *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 280(3): R730-8.
- Ferguson, S. S. (2001) 'Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling', *Pharmacological reviews* 53(1): 1-24.
- Ferguson, S. S., Barak, L. S., Zhang, J. and Caron, M. G. (1996) 'G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins', *Canadian journal of physiology and pharmacology* 74(10): 1095-110.
- Fielding, C. J. (2001) 'Caveolae and signaling', *Current opinion in lipidology* 12(3): 281-7.
- Freedman, N. J. and Lefkowitz, R. J. (2004) 'Anti-beta(1)-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation', *The Journal of clinical investigation* 113(10): 1379-82.
- Freedman, N. J., Liggett, S. B., Drachman, D. E., Pei, G., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1995) 'Phosphorylation and desensitization of the human beta 1-adrenergic receptor. Involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase', *The Journal of biological chemistry* 270(30): 17953-61.

- Garlid, K. D. (1996) 'Cation transport in mitochondria--the potassium cycle', *Biochimica et biophysica acta* 1275(1-2): 123-6.
- Germack, R., Leon-Velarde, F., Valdes De La Barra, R., Farias, J., Soto, G. and Richalet, J. P. (2002) 'Effect of intermittent hypoxia on cardiovascular function, adrenoceptors and muscarinic receptors in Wistar rats', *Experimental physiology* 87(4): 453-60.
- Grimm, M. and Brown, J. H. (2010) 'Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII', *Journal of molecular and cellular cardiology* 48(2): 322-30.
- Haunstetter, A. and Izumo, S. (1998) 'Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease', *Circulation research* 82(11): 1111-29.
- Hausdorff, W. P., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1990) 'Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function', *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 4(11): 2881-9.
- Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. (2007) 'Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion', *Pharmacology & therapeutics* 116(2): 173-91.
- Hrbasova, M., Novotny, J., Hejnova, L., Kolar, F., Neckar, J. and Svoboda, P. (2003) 'Altered myocardial Gs protein and adenylyl cyclase signaling in rats exposed to chronic hypoxia and normoxic recovery', *Journal of applied physiology* 94(6): 2423-32.
- Huke, S. and Bers, D. M. (2008) 'Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes', *Biochemical and biophysical research communications* 376(1): 80-5.
- Hurtado, A. (1960) 'Some clinical aspects of life at high altitudes', *Annals of internal medicine* 53: 247-58.
- Chesley, A., Lundberg, M. S., Asai, T., Xiao, R. P., Ohtani, S., Lakatta, E. G. and Crow, M. T. (2000) 'The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase', *Circulation research* 87(12): 1172-9.
- Kacimi, R., Richalet, J. P., Corsin, A., Abousahl, I. and Crozatier, B. (1992) 'Hypoxia-induced downregulation of beta-adrenergic receptors in rat heart', *Journal of applied physiology* 73(4): 1377-82.
- Kawamura, S., Yoshida, K., Miura, T., Mizukami, Y. and Matsuzaki, M. (1998) 'Ischemic preconditioning translocates PKC-delta and -epsilon, which mediate functional protection in isolated rat heart', *The American journal of physiology* 275(6 Pt 2): H2266-71.
- Kiuchi, K., Shannon, R. P., Komamura, K., Cohen, D. J., Bianchi, C., Homcy, C. J., Vatner, S. F. and Vatner, D. E. (1993) 'Myocardial beta-adrenergic receptor function during the development of pacing-induced heart failure', *The Journal of clinical investigation* 91(3): 907-14.
- Kobilka, B. (1992) 'Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors', *Annual review of neuroscience* 15: 87-114.

- Kobilka, B. K. (2002) 'Agonist-induced conformational changes in the beta2 adrenergic receptor', *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society* 60(6): 317-21.
- Kobilka, B. K. (2011) 'Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology', *Trends in pharmacological sciences* 32(4): 213-8.
- Kobilka, B. K. and Deupi, X. (2007) 'Conformational complexity of G-protein-coupled receptors', *Trends in pharmacological sciences* 28(8): 397-406.
- Kolar, F., Jezkova, J., Balkova, P., Breh, J., Neckar, J., Novak, F., Novakova, O., Tomasova, H., Srbova, M., Ost'adal, B. et al. (2007) 'Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia', *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 292(1): H224-30.
- Kolar, F., Neckar, J. and Ostadal, B. (2005) 'MCC-134, a blocker of mitochondrial and opener of sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels, abrogates cardioprotective effects of chronic hypoxia', *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 54(4): 467-71.
- Kolar, F. and Ostadal, B. (2004) 'Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia', *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 53 Suppl 1: S3-13.
- Kolar, F., Ostadal, B., Prochazka, J., Pelouch, V. and Widimsky, J. (1989) 'Comparison of cardiopulmonary response to intermittent high-altitude hypoxia in young and adult rats', *Respiration; international review of thoracic diseases* 56(1-2): 57-62.
- Kong, X., Tweddell, J. S., Gross, G. J. and Baker, J. E. (2001) 'Sarcolemmal and mitochondrial K(atp)channels mediate cardioprotection in chronically hypoxic hearts', *Journal of molecular and cellular cardiology* 33(5): 1041-5.
- Lasley, R. D., Narayan, P., Uittenbogaard, A. and Smart, E. J. (2000) 'Activated cardiac adenosine A(1) receptors translocate out of caveolae', *The Journal of biological chemistry* 275(6): 4417-21.
- Lefkowitz, R. J., Rajagopal, K. and Whalen, E. J. (2006) 'New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors', *Molecular cell* 24(5): 643-52.
- Lefkowitz, R. J. and Shenoy, S. K. (2005) 'Transduction of receptor signals by beta-arrestins', *Science* 308(5721): 512-7.
- Lefkowitz, R. J. and Whalen, E. J. (2004) 'beta-arrestins: traffic cops of cell signaling', *Current opinion in cell biology* 16(2): 162-8.
- Lohse, M. J., Engelhardt, S. and Eschenhagen, T. (2003) 'What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?', *Circulation research* 93(10): 896-906.
- London, E. and Brown, D. A. (2000) 'Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts)', *Biochimica et biophysica acta* 1508(1-2): 182-95.

- Mackay, K. and Mochly-Rosen, D. (1999) 'An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia', *The Journal of biological chemistry* 274(10): 6272-9.
- Madamanchi, A. (2007) 'Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure', *McGill journal of medicine : MJM : an international forum for the advancement of medical sciences by students* 10(2): 99-104.
- Malbon, C. C. and Wang, H.-y. 2005. Adrenergic Receptors. eLS
- Mardon, K., Merlet, P., Syrota, A. and Maziere, B. (1998) 'Effects of 5-day hypoxia on cardiac adrenergic neurotransmission in rats', *Journal of applied physiology* 85(3): 890-7.
- Marchese, A., Chen, C., Kim, Y. M. and Benovic, J. L. (2003) 'The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking', *Trends in biochemical sciences* 28(7): 369-76.
- Menon, B., Johnson, J. N., Ross, R. S., Singh, M. and Singh, K. (2007) 'Glycogen synthase kinase-3beta plays a pro-apoptotic role in beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes: Role of beta1 integrins', *Journal of molecular and cellular cardiology* 42(3): 653-61.
- Milano, G., Corno, A. F., Lippa, S., Von Segesser, L. K. and Samaja, M. (2002) 'Chronic and intermittent hypoxia induce different degrees of myocardial tolerance to hypoxia-induced dysfunction', *Experimental biology and medicine* 227(6): 389-97.
- Mitchell, M. B., Meng, X., Ao, L., Brown, J. M., Harken, A. H. and Banerjee, A. (1995) 'Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C', *Circulation research* 76(1): 73-81.
- Molina, C. A., Foulkes, N. S., Lalli, E. and Sassone-Corsi, P. (1993) 'Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor', *Cell* 75(5): 875-86.
- Moret P.R., Hypoxia and the heart. In: G.H. Bourne, Editor, *Heart and Heart-like Organs*, Academic Press, New York (1980), pp. 239–387
- Morris, A. J. and Malbon, C. C. (1999) 'Physiological regulation of G protein-linked signaling', *Physiological reviews* 79(4): 1373-430.
- Muntz, K. H. (1992) 'Autoradiographic characterization of beta-adrenergic receptor subtype in the canine conduction system', *Circulation research* 71(1): 51-7.
- Murray, C. J. and Lopez, A. D. (1997) 'Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study', *Lancet* 349(9064): 1498-504.
- Murry, C. E., Jennings, R. B. and Reimer, K. A. (1986) 'Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium', *Circulation* 74(5): 1124-36.
- Naga Prasad, S. V., Nienaber, J. and Rockman, H. A. (2001) 'Beta-adrenergic axis and heart disease', *Trends in genetics : TIG* 17(10): S44-9.

- Nakanishi, K., Tajima, F., Nakamura, A., Yagura, S., Ookawara, T., Yamashita, H., Suzuki, K., Taniguchi, N. and Ohno, H. (1995) 'Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats', *The Journal of physiology* 489 (Pt 3): 869-76.
- Neckar, J., Markova, I., Novak, F., Novakova, O., Szarszoi, O., Ost'adal, B. and Kolar, F. (2005) 'Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-delta in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection', *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 288(4): H1566-72.
- Neckar, J., Ostadal, B. and Kolar, F. (2004) 'Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery', *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 53(6): 621-8.
- Neckar, J., Papousek, F., Novakova, O., Ost'adal, B. and Kolar, F. (2002a) 'Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive', *Basic research in cardiology* 97(2): 161-7.
- Neckar, J., Szarszoi, O., Herget, J., Ostadal, B. and Kolar, F. (2003) 'Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia', *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 52(2): 171-5.
- Neckar, J., Szarszoi, O., Koteš, L., Papousek, F., Ost'adal, B., Grover, G. J. and Kolar, F. (2002b) 'Effects of mitochondrial K(ATP) modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats', *Cardiovascular research* 55(3): 567-75.
- Nikolaev, V. O., Moshkov, A., Lyon, A. R., Miragoli, M., Novak, P., Paur, H., Lohse, M. J., Korchev, Y. E., Harding, S. E. and Gorelik, J. (2010) 'Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation', *Science* 327(5973): 1653-7.
- Oestreich, E. A., Malik, S., Goonasekera, S. A., Blaxall, B. C., Kelley, G. G., Dirksen, R. T. and Smrcka, A. V. (2009) 'Epac and phospholipase Cepsilon regulate Ca²⁺ release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II', *The Journal of biological chemistry* 284(3): 1514-22.
- Ohkubo, S. and Nakahata, N. (2007) '[Role of lipid rafts in trimeric G protein-mediated signal transduction]', *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 127(1): 27-40.
- Ostadal B. and F. Kolar, *Cardiac Ischemia: From Injury to Protection*, Kluwer Academic Publishers, Boston (1999).
- Ostadal, B. and Kolar, F. (2007) 'Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects', *Respiratory physiology & neurobiology* 158(2-3): 224-36.
- Ostadal, B., Prochazka, J., Pelouch, V., Urbanova, D. and Widimsky, J. (1984) 'Comparison of cardiopulmonary responses of male and female rats to intermittent high altitude hypoxia', *Physiologia Bohemoslovaca* 33(2): 129-38.
- Ostrom, R. S., Gregorian, C., Drenan, R. M., Xiang, Y., Regan, J. W. and Insel, P. A. (2001) 'Receptor number and caveolar co-localization determine receptor coupling efficiency to adenylyl cyclase', *The Journal of biological chemistry* 276(45): 42063-9.

- Rabinovitch, M., Gamble, W., Nadas, A. S., Miettinen, O. S. and Reid, L. (1979) 'Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features', *The American journal of physiology* 236(6): H818-27.
- Remondino, A., Kwon, S. H., Communal, C., Pimentel, D. R., Sawyer, D. B., Singh, K. and Colucci, W. S. (2003) 'Beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in cardiac myocytes is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of the mitochondrial pathway', *Circulation research* 92(2): 136-8.
- Rockman, H. A., Koch, W. J. and Lefkowitz, R. J. (2002) 'Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function', *Nature* 415(6868): 206-12.
- Rona, G. (1985) 'Catecholamine cardiotoxicity', *Journal of molecular and cellular cardiology* 17(4): 291-306.
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. and Kobilka, B. K. (2009) 'The structure and function of G-protein-coupled receptors', *Nature* 459(7245): 356-63.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R. and Anderson, R. G. (1992) 'Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats', *Cell* 68(4): 673-82.
- Sack, S., Mohri, M., Arras, M., Schwarz, E. R. and Schaper, W. (1993) 'Ischaemic preconditioning--time course of renewal in the pig', *Cardiovascular research* 27(4): 551-5.
- Shizukuda, Y. and Buttrick, P. M. (2002) 'Subtype specific roles of beta-adrenergic receptors in apoptosis of adult rat ventricular myocytes', *Journal of molecular and cellular cardiology* 34(7): 823-31.
- Schwencke, C., Okumura, S., Yamamoto, M., Geng, Y. J. and Ishikawa, Y. (1999) 'Colocalization of beta-adrenergic receptors and caveolin within the plasma membrane', *Journal of cellular biochemistry* 75(1): 64-72.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) 'Functional rafts in cell membranes', *Nature* 387(6633): 569-72.
- Skeberdis, V. A. (2004) 'Structure and function of beta3-adrenergic receptors', *Medicina* 40(5): 407-13.
- Starnes, J. W. and Taylor, R. P. (2007) 'Exercise-induced cardioprotection: endogenous mechanisms', *Medicine and science in sports and exercise* 39(9): 1537-43.
- Tajima, M., Katayose, D., Bessho, M. and Isoyama, S. (1994) 'Acute ischaemic preconditioning and chronic hypoxia independently increase myocardial tolerance to ischaemia', *Cardiovascular research* 28(3): 312-9.
- Tomita, H., Nazmy, M., Kajimoto, K., Yehia, G., Molina, C. A. and Sadoshima, J. (2003) 'Inducible cAMP early repressor (ICER) is a negative-feedback regulator of cardiac hypertrophy and an important mediator of cardiac myocyte apoptosis in response to beta-adrenergic receptor stimulation', *Circulation research* 93(1): 12-22.

- Voelkel, N. F., Hegstrand, L., Reeves, J. T., McMurty, I. F. and Molinoff, P. B. (1981) 'Effects of hypoxia on density of beta-adrenergic receptors', *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 50(2): 363-6.
- Wang, X. and Dhalla, N. S. (2000) 'Modification of beta-adrenoceptor signal transduction pathway by genetic manipulation and heart failure', *Molecular and cellular biochemistry* 214(1-2): 131-55.
- Wang, Y., Huang, S., Sah, V. P., Ross, J., Jr., Brown, J. H., Han, J. and Chien, K. R. (1998) 'Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family', *The Journal of biological chemistry* 273(4): 2161-8.
- Wegener, A. D., Simmerman, H. K., Lindemann, J. P. and Jones, L. R. (1989) 'Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation', *The Journal of biological chemistry* 264(19): 11468-74.
- Winter, R. J., Dickinson, K. E., Rudd, R. M. and Sever, P. S. (1986) 'Tissue specific modulation of beta-adrenoceptor number in rats with chronic hypoxia with an attenuated response to down-regulation by salbutamol', *Clinical science* 70(2): 159-65.
- Xiang, Y. K. (2011) 'Compartmentalization of {beta}-Adrenergic Signals in Cardiomyocytes', *Circulation research* 109(2): 231-44.
- Xiao, R. P., Avdonin, P., Zhou, Y. Y., Cheng, H., Akhter, S. A., Eschenhagen, T., Lefkowitz, R. J., Koch, W. J. and Lakatta, E. G. (1999) 'Coupling of beta2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes', *Circulation research* 84(1): 43-52.
- Yamada, E. (1955) 'The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse', *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 1(5): 445-58.
- Yellon, D. M. and Downey, J. M. (2003) 'Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology', *Physiological reviews* 83(4): 1113-51.
- Yoshikawa, T., Furukawa, Y., Wakamatsu, Y., Takemura, S., Tanaka, H. and Kondo, M. (1982) 'Experimental hypoxia and lipid peroxide in rats', *Biochemical medicine* 27(2): 207-13.
- Zajchowski, L. D. and Robbins, S. M. (2002) 'Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains', *European journal of biochemistry / FEBS* 269(3): 737-52.
- Zaugg, M. and Schaub, M. C. (2003) 'Signaling and cellular mechanisms in cardiac protection by ischemic and pharmacological preconditioning', *Journal of muscle research and cell motility* 24(2-3): 219-49.
- Zheng, M., Han, Q. D. and Xiao, R. P. (2004) 'Distinct beta-adrenergic receptor subtype signaling in the heart and their pathophysiological relevance', *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]* 56(1): 1-15.

- Zheng, M., Zhang, S. J., Zhu, W. Z., Ziman, B., Kobilka, B. K. and Xiao, R. P. (2000) 'beta 2-adrenergic receptor-induced p38 MAPK activation is mediated by protein kinase A rather than by Gi or Gbeta gamma in adult mouse cardiomyocytes', *The Journal of biological chemistry* 275(51): 40635-40.
- Zhu, H. F., Dong, J. W., Zhu, W. Z., Ding, H. L. and Zhou, Z. N. (2003a) 'ATP-dependent potassium channels involved in the cardiac protection induced by intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury', *Life sciences* 73(10): 1275-87.
- Zhu, W., Woo, A. Y., Yang, D., Cheng, H., Crow, M. T. and Xiao, R. P. (2007) 'Activation of CaMKII δ is a common intermediate of diverse death stimuli-induced heart muscle cell apoptosis', *The Journal of biological chemistry* 282(14): 10833-9.
- Zhu, W. Z., Wang, S. Q., Chakir, K., Yang, D., Zhang, T., Brown, J. H., Devic, E., Kobilka, B. K., Cheng, H. and Xiao, R. P. (2003b) 'Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II', *The Journal of clinical investigation* 111(5): 617-25.
- Zhu, W. Z., Zheng, M., Koch, W. J., Lefkowitz, R. J., Kobilka, B. K. and Xiao, R. P. (2001) 'Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(4): 1607-12.
- Zoccal, D. B., Bonagamba, L. G., Oliveira, F. R., Antunes-Rodrigues, J. and Machado, B. H. (2007) 'Increased sympathetic activity in rats submitted to chronic intermittent hypoxia', *Experimental physiology* 92(1): 79-85.
- Zong, P., Setty, S., Sun, W., Martinez, R., Tune, J. D., Ehrenburg, I. V., Tkatchouk, E. N., Mallet, R. T. and Downey, H. F. (2004) 'Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction', *Experimental biology and medicine* 229(8): 806-12.