

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Charles University in Prague, Faculty of Science



Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis

**ÚLOHA MITOCHONDRIÁLNÍ KREATINKINÁZY A HEXOKINÁZY V MECHANISMECH
KARDIOPROTEKTIVNÍHO PŮSOBNÍ CHRONICKÉ HYPOXIE**

**THE ROLE OF MITOCHONDRIAL CREATINE KINASE AND HEXOKINASE IN
CARDIOPROTECTIVE MECHANISMS INDUCED BY CHRONIC HYPOXIA**

Petra Wasková

Praha/Prague, 2014

Doktorské studijní programy v biomedicině/Biomedicine Ph.D. Study Programmes

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky
Charles University in Prague and Academy of Sciences of the Czech Republic

Program: **Fyziologie živočichů/Animal Physiology**

Předseda oborové rady/Chairman of Ph.D. committee: **Doc. RNDr. Stanislav Vybíral, CSc.**

Školící pracoviště/Department where the Dissertation was carried out: **Katedra fyziologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze/Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague**

Autor/Author: **M.Sc. Petra Wasková**

Školitel/Supervisor: **RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.**

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

The dissertation is available at libraries of Faculty of Science, Charles University in Prague.

OBSAH/CONTENT

1. SOURHN.....	4
2. ÚVOD.....	5
3. CÍLE PRÁCE	6
4. METODIKA	6
5. VÝSLEDKY	9
6. DISKUSE	9
7. ZÁVĚRY	12
8. SUMMARY.....	13
9. INTRODUCTION	14
10. AIMS OF THE STUDY	15
11. METHODS	15
12. RESULTS	18
13. DISCUSSION	19
14. CONCLUSIONS.....	22
15. POUŽITÁ LITERATURA/REFERENCES	22
16. PŘÍLOHA/SUPPLEMENT.....	29
17. SEZNAM PUBLIKACÍ/LIST OF PUBLICATIONS	33
18. CURRICULUM VITAE	34

1. SOURHN

Ischemicko-reperfúzní (I/R) poškození, které je důsledkem infarktu myokardu, představuje hlavní příčinu úmrtí po celém světě. Jedním z neúčinnějších kardioprotektivních intervencí zvyšujících odolnost srdce k I/R poškození je adaptace na chronickou hypoxii (CH). Avšak molekulární mechanismy CH nejsou zcela objasněny. Mezi nejdůležitější faktory zodpovědné za I/R poškození patří reaktivní formy kyslíku (ROS) produkované komplexy I a III mitochondriálního elektronového transportního řetězce. Potenciálními kandidáty udržující ROS na nízké úrovni jsou mitochondriální kreatinkináza (mtCKs) a dvě isoformy hexokinázy (HK1 a HK2). Tyto enzymy významně podporují mitochondriální oxidativní fosforylaci tím, že zvyšují dostupnost ADP pro komplex V dýchacího řetězce. Navíc HK navázaná na mitochondrie blokuje navázání pro-apoptotického proteinu BAX, čímž zabraňuje vzniku apoptózy. Kromě mitochondriální isoformy CK jsou v kardiomyocytech také přítomny dvě cytosolické isoformy CK (CKM a CKB), které pomáhají udržovat energetickou homeostázu. Na základě známých anatomických a fyziologických rozdílů mezi pravou (RV) a levou (LV) komorou se první studie zaměřila na porovnání těchto komor z hlediska energetického metabolismu a ko-lokalizace isoform HK s mitochondriemi. Dále byla také stanovena hladina aktivované formy AKT kinázy, která napomáhá interakci HK s mitochondriální membránou. Výsledky této studie ukázaly, že RV má vyšší aktivitu aerobního glykolytického metabolismu a je tedy schopna reagovat rychleji a silněji na stresující podněty než LV. Dále bylo zjištěno, že aktivace AKT je nutnou, nikoli však postačující, podmínkou pro stimulaci interakce HK s mitochondriemi a že je zde pravděpodobně zapojen ještě jiný mechanismus. Dalším cílem studie bylo stanovit vliv normobarické hypoxie na expresi a enzymatickou aktivitu CK a HK a ko-lokalizaci isoform HK s mitochondriemi v obou komorách. Potkani byly adaptováni po dobu 3 týdnů na protektivní a neprotektivní režimy 10% normobarické hypoxie. Výsledky ukázaly, že adaptace na normobarickou hypoxii vede k aktivaci glykolýzy a kreatinfosfát (PCr)/CK systému udržujícího energetickou homeostázu i za snížené koncentrace kyslíku. Dá se tedy usuzovat na to, že CK a HK by se mohly podílet na stimulaci oxidativní fosforylace a tím na snížení produkce ROS. I když nebyly zjištěny žádné rozdíly mezi protektivními a neprotektivními fenotypy, nelze vyloučit, že CK a HK mohou hrát roli v kardioprotektivních mechanismech vyvolaných adaptací na normobarickou hypoxii. Je zajímavé, že ko-lokalizace HK1 a HK2 s mitochondriemi zůstaly nezměněny v LV stejně jako v RV po adaptaci potkanů na protektivní režim, kontinuální normobarickou hypoxii (CNH), což svědčí o stabilizaci vazby HK s mitochondriemi. Následně byly potkani adaptováni na CNH vystaveni I/R inzultu. Celková aktivita HK se výrazně zvýšila v CNH LV po I/R inzultu, což by mohlo vypovídat o zapojení HK v mechanismech ischemicko-rezistentního fenotypu u chronicky hypoxických srdcí. Posledním cílem této studie bylo určit roli CK a HK enzymů v LV a RV potkanů adaptovaných na hypobarickou hypoxii (7000 m). Hypobarická hypoxie představuje vyšší stres pro myokard ve srovnání s normobarickou hypoxií. Výsledky potvrdily reakci energetického metabolismu na sníženou koncentraci kyslíku nezávisle na míře stresu. Navíc byla pozorována zvýšená vazba HK1 a HK2 s mitochondriemi v obou komorách po adaptaci potkanů na hypobarickou hypoxii, která byla potvrzena jak pomocí imunofluorescenčních technik, tak i pomocí frakcionace a metody Western blot. Závěrem lze říci, že protektivní mechanismus HK, který souvisí s mírou vazby tohoto enzymu na mitochondriích, se zdá být aktivován v hypoxii, která je na hranici poškození buněk, což představuje právě hypobarický model. Tato disertační práce poskytuje nový pohled na funkci CK a HK a jejich vzájemnou spolupráci v adaptaci na různé modely hypoxie. A zároveň přináší nové poznatky mechanismu kardioprotektivního působení hypobarické hypoxie, které zahrnuje zvýšenou vazbu HK s mitochondriemi. Studium vazby HK s mitochondriemi tak představuje potenciální cestu pro budoucí terapeutické využití.

2. ÚVOD

Ischemická choroba srdeční a její akutní forma, infarkt myokardu, je jedno z nejzávažnějších a nejrozšířenějších srdečních onemocnění moderní civilizace, na které ročně umírají statisíce lidí. Toto onemocnění je způsobeno nedostatečným krevním zásobením srdce a tedy nedostatečnou dodávkou kyslíku myokardu, čímž dochází k letálnímu poškození myokardu provázeného poruchami srdečního rytmu, ischemickými arytmiemi. Následné znovuoživení krevního zásobení (reperfúze) je sice pro viabilitu myokardu klíčové, nicméně s sebou nese další komplikace, jako je zhoršení srdeční kontraktility a vznik reperfúzních arytmií. Současný výzkum je proto zaměřen na studium fyziologických kardioprotektivních mechanismů, jejichž poznání by vedlo k prevenci a léčbě ischemicko-reperfúzního (I/R) poškození srdce. Jedním z účinných kardioprotektivních fenoménů je adaptace na chronickou hypoxii (CH) [1]. Ochranné působení CH je známo téměř 50 let, kdy byla publikována populační studie poukazující na snížený výskyt infarktu myokardu u populací žijících ve vysokých nadmořských výškách [2]. Tyto nálezy byly později potvrzeny i experimentálně, a to nejen pro kontinuální, ale i pro intermitentní formy adaptace [3,4]. Z mnoha experimentálních studií vyplývá, že CH snižuje většinu zásadních negativních důsledků infarktu myokardu tak, že redukuje velikost infarktu [5], zlepšuje obnovu post-ischemických kontraktilních funkcí [6] a omezuje výskyt a závažnost ischemických a reperfúzních arytmií [7,8]. Přestože je kardioprotektivní působení CH studováno po mnoho let, nejsou dosud dostatečně objasněny molekulární mechanismy jejího působení [9]. Mezi nejdůležitější faktory zodpovědné za I/R poškození patří reaktivní formy kyslíku (ROS) produkované komplexy I a III mitochondriálního elektronového transportního řetězce. Produkce ROS je přímo úměrná vzestupu membránového potenciálu (tj. méně negativnímu) [10,11], což přímo souvisí se sníženou dostupností ADP v tomto kompartmentu. Proto enzymy zodpovědné za recyklaci ADP mají preventivní úlohu, neboť snižují membránový potenciál, a tím i produkci ROS. Tuto úlohu plní mitochondriální kreatinkináza (mtCKs) a dvě isoformy hexokinázy (HK1 a HK2) [12–14].

MtCKs je součástí vysoce kompartmentalizovaného fosfokreatin/kreatin kinázového (PCr/CK) systému, který řídí tok energie v kardiomyocytech z míst jejího produkce, mitochondrií, do míst její spotřeby, jakými jsou ATPáza v M-linii sarkomery, v sarkoplazmatickém retikulu a na plazmatické membráně, a tím zajišťuje energetickou homeostázu [15–17]. K celkové energetické homeostáze kardiomyocytů také významně přispívají dvě cytosolické isoformy CK (CKM a CKB), které udržují vysoký poměr ATP/ADP a optimální pH v blízkosti ATPáz. MtCKs, která je lokalizovaná v mezimembránovém prostoru a mezi kristy, je aktivní pravděpodobně v oktamerární formě a je funkčně spojena s translokátorem adeninových nukleotidů (ANT) zakotveném ve vnitřní mitochondriální membráně a s napětově závislým aniontovým kanálem (VDAC) [18] na membráně vnější. Vytváří tak funkční celek, který využívá ATP z respiračního řetězce a kreatin (Cr) z cytosolu k obnově zásobního fondu fosfokreatinu (PCr) v cytosolu a zároveň zvyšuje dostupnost ADP pro komplex V respiračního řetězce. Tím stimuluje dýchání mitochondrií, snižuje membránový potenciál a nadměrnou produkci ROS [19–24]. MtCKs zároveň nepřímo inhibuje otevření přechodně propustného mitochondriálního (MTP) póru [25,26], který může být přímo aktivován zvýšenou koncentrací ROS [27], a jeho aktivace se výrazně podílí na apoptóze.

Druhým důležitým enzymem, který významně ovlivňuje produkci ROS v respiračním řetězci, je hexokináza (HK). V srdci se vyskytují dvě isoformy, HK1 a HK2 [28,29], které se od sebe liší afinitou k substrátům (glukóza a ATP), hladinou v dané tkáni [30], lokalizací v buňce a alosterickou regulací [31]. Obě HK fosforylují glukózu na glukózu-6-fosfát (G-6-P) a jsou tedy esenciální pro regulaci utilizace glukózy v kardiomyocytech [32]. Bylo prokázáno, že srdeční isoformy HK přímo spojují metabolismus glukózy s oxidativní fosforylací a přednostně využívají ATP z oxidativní fosforylace ke katalýze klíčového kroku glykolýzy [33]. Vznikající ADP pak podporuje dýchání mitochondrií stimulací aktivity komplexu V respiračního řetězce. HK1 a HK2 pracují tedy stejným mechanismem jako mtCKs, avšak ADP prochází oběma póry, VDAC i ANT. Za fyziologických podmínek je HK1 vázaná na vnější mitochondriální membránu [14,32], zatímco HK2 se převážně vyskytuje v cytosolu [28,34] a její vazba s vnější mitochondriální membránou je zesílena při vyšší koncentraci glukózy, inzulínu, morfia, anebo při

vyšším oxidativním stresu [35–37]. Nedávno bylo publikováno, že AKT kináza fosforyluje HK2 na threoninu 473, a tím stimuluje translokaci HK2 do mitochondrií [38,39]. Interakce HK2 s vnější mitochondriální membránou zvyšuje její vazebnou afinitu k ATP [40], čímž je HK2 více odolná vůči zpětnovazebné inhibici vlastním produktem G-6-P [41,42]. Zvýšená vazba HK2 s mitochondriální membránou zároveň zabraňuje vazbě pro-apoptotického proteinu BAX [43], a tím nepřímo inhibuje dráhu vedoucí k apoptóze. HK1 i HK2 jsou na vnější mitochondriální membránu navázané přes VDAC, který je funkčně spojen s ANT, a tato vzájemná interakce zabraňuje za patofyziologických podmínek otevření MPT póru a uvolnění cytochromu *c* [44,45].

Z uvedeného vyplývá, že mtCKs a isoformy HK ve spojení s VDAC, ANT a ATP syntázou by mohly reprezentovat velmi důležitý a složitý recyklační systém ADP, který využívá glukózu, ATP a kreatin jako hlavní zdroje pro udržení nízkého membránového potenciálu a mohl tak udržovat produkci ROS na nízké úrovni [46,47]. Jaká je ovšem synchronizace obou systémů mtCKs a isoform HK a jak souvisí s energetickým stavem buňky v normoxii a v hypoxii, tedy s poměrem ATP/ADP, ATP/AMP či PCr/ATP, není zcela jasné.

3. CÍLE PRÁCE

- Stanovit expresi isoform CK a HK a poměr fosforylovaných forem AKT ku nefosforylované formě AKT, dále stanovit celkovou enzymatickou aktivitu CK a HK a ko-lokalizaci isoform HK s mitochondriemi v normoxické levé (LV) a pravé (RV) komoře potkana.
- Stanovit vliv protektivních a neprotektivních režimů normobarické hypoxie na expresi isoform CK a HK, celkovou enzymatickou aktivitu CK a HK a ko-lokalizaci isoform HK s mitochondriemi v LV a RV potkana. Zároveň stanovit vliv I/R insultu na celkovou enzymatickou aktivitu CK a HK a expresi isoform HK v LV potkanů adaptovaných na protektivní režim kontinuální normobarické hypoxie.
- Stanovit vliv hypobarické hypoxie na expresi isoform CK a HK, celkovou enzymatickou aktivitu CK a HK a ko-lokalizaci isoform HK s mitochondriemi v LV a RV potkana.

4. METODIKA

Experimentální zvířata

V této disertační práci byli použiti potkani kmene Wistar (Velaz, Ltd. ČR a Charles River Laboratories, Inc., Německo), který byli chováni na světelném režimu 12h tma a 12h světlo a krmeni standardní dietou. Manipulace s pokusnými zvířaty byla v souladu s mezinárodní směrnicí US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996). Experimentální protokol byl schválen Etickou komisí Fyziologického ústavu Akademie věd ČR v.v.i.

Adaptace na normobarickou a hypobarickou hypoxii

Potkani byli adaptováni po dobu 3 týdnů na různé režimy 10% normobarické hypoxie: kontinuální hypoxii 24h/den (CNH) a intermitentní hypoxii 8h/den s 16-h reoxygenací denně (INH-8) představující protektivní režimy a intermitentní hypoxii 23h/den s 1-h reoxygenací denně (INH-23) představující neprotektivní režim. Další skupina potkanů byla adaptována po dobu 5 týdnů na intermitentní hypobarickou hypoxii 8h/den (IHH-8). Kontrolní skupina (N) byla po celou dobu experimentu držena v normoxických podmínkách.

Ischemicko-reperfúzní protokol

Pro I/R protokol byl použit model perfundovaného srdce podle Langendorfa. Kontrolní srdce a srdce potkanů adaptovaných na CNH režim byly rozděleny do 3 skupin: i) srdce perfundováno okysličeným Krebs-Henseleitovým roztokem (118mM NaCl, 4,7mM KCl, 1,2mM MgSO₄, 1,25mM CaCl₂, 1,2mM KH₂PO₄, 25mM NaHCO₃, 11mM glucose, pH 7,4) po dobu 15 min (skupiny KN a KH); ii) srdce, které bylo nejdříve perfundováno a poté vystaveno 10 min ischemii (skupiny IN a IH) a iii) srdce, které bylo perfundováno, vystaveno ischemii a následně reperfúzi po dobu 10 min. Od začátku reperfúze byly po 10 s, 20 s, 30 s, 60 s, 3 min a 10 min odebírány vzorky efluentu pro stanovení uvolněné LDH a tedy míry poškození.

Příprava vzorků

Potkani byli usmrceni cervikální dislokací. Srdce bylo okamžitě vyjmuto, promyto ve vychlazeném fyziologickém roztoku a rozděleno na LV, RV a septum (S). Jednotlivé srdeční oddíly byly zváženy a rychle zamraženy v tekutém dusíku. Stejným postupem byla zpracována perfundovaná srdce. Následně byly LV a RV rozdrčeny v tekutém dusíku a homogenizovány v homogenizačním pufru (12,5mM TRIS, 2,5mM EGTA, 1mM EDTA, 250mM sacharóza, 5mM DL-Dithiothreitol (DTT), inhibitory proteáz (cCOMPLETE, Roche Diagnostics) a inhibitory fosfatáz (PhosSTOP, Roche Diagnostics), pH 7,4) pro proteinové analýzy a v Trizolu pro izolaci RNA (Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR). Výsledné homogenáty byly zamraženy v -80°C.

Izolace RNA a Real-Time qRT-PCR analýza

RNA byla izolována z LV a RV pomocí Trizolu a přečištěna pomocí DNA-free RNA kitu (Ambion, Carlsbad, CA). Čistota a kvantita RNA byla zkontrolována spektrofotometricky na NanoDropu a pomocí agarózové gelové elektroforézy. RNA byla následně konvertována na cDNA s použitím kitu RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania) a oligo(dT) primerů podle návodu výrobce. Pro zaznamenání a kvantifikaci nárůstu příslušné cDNA byly použity specifické próby (Universal Probe, Roche Applied Sciences) anebo barvivo Syber green (Bio-Rad). Specifické primery pro HK1, HK2, CKM, CKB, mtCKs a referenční gen hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) byly navrženy s pomocí online centra Universal Probe Library Assay Design Center (Roche Applied Science): *HK1_F: tctggcttcaccttctcat*, *HK1_R: atcaagattccacagtcagggt* a #121; *HK2_F: ccagcagacagcctagacc*, *HK2_R: agatgccttgaatccctttg* a #101; *CKM_F: ccgcagcatcaagggtta*, *CKM_R: cccgtcaggctgttgaga* a #16; *CKB_F: ccacttctcttcgacaagc*, *CKB_R: ggaacgtctattgtcattgtgc* a #84; *mtCKs_F: gccacccttcattaagactg*, *mtCKs_R: caaaaaggtcagcaaacacct* a #83; *HPRT_F: gaccggttctgcatgtcg*, *HPRT_R: acctggttcatcactaatcac* a #95. Real-Time PCR reakce byla provedena na přístroji LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Hladiny transkriptů byly vztaheny k hladině HPRT1 a vypočteny podle modelu s korekcí efektivity [48].

Izolace mitochondrií

Čerstvě odebraná srdce z normoxických potkanů a z potkanů adaptovaných na IHH-8 byla promyta ve vychlazeném fyziologickém roztoku, rozdělena na LV, RV a S, zvážena a uložena do roztoku BIOPS (10mM Ca-EGTA buffer, 0,1μM volného kalcia, 20 mM imidazolu, 20mM taurinu, 50mM K-MES, 0,5mM DTT, 6,56mM MgCl₂, 5,77mM ATP, 15mM PCr, pH 7.1). LV a RV byly roztrženy na jemné kousky a homogenizovány v homogenizačním pufru (0,25M sacharóza, 10mM TRIS, 2mM EDTA, 2mM EGTA, BSA (0.5mg/mL), pH 7,2). Poté byly homogenáty točeny při 600 g a 4°C po dobu 10 min, supernatanty přefiltrovány a točeny při 10,000 g a 4°C po dobu 10 min. Supernatanty představující cytosolickou frakci byly odebrány a uskladněny v -80°C pro další analýzy. Peletky byly resuspendovány v pufru (pH 7,2), který obsahoval 0,25M sacharózy a 10mM TRIS, a následně točeny při 10,000 g a 4°C po dobu 10 min. Supernatanty byly vyhozeny, peletky opět resuspendovány v tom samém pufru a jemně a krátce zhomogenizovány. Homogenáty byly použity pro SDS-PAGE a Western Blot (WB) analýzy.

SDS-PAGE a Western blot

Homogenáty LV a RV byly separovány pomocí denaturační gelové elektroforézy (SDS-PAGE) na 10% polyakrylamidovém gelu při konstantním napětí 200V. Poté byly proteiny přebíleny na nitrocelulózovou membránu (0.2 μm) pomocí metody WB při konstantním napětí 100 V a proudu 350 mA po dobu 1 h při 4°C (Bio-Rad). Následně byly membrány blokovány v roztoku 5% nízkotučného mléka a Tris pufru s Tween 20 (TTBS) po dobu 1h a inkubovány při 4°C přes noc s primárními polyklonálními protilátkami: anti-HK1, anti-HK2, anti-CKM, anti-CKB, anti-mtCKs, anti-GAPDH, anti-pS-AKT, anti-pT-AKT, anti-AKT, anti-Bcl-2 a anti-BAX (Santa Cruz Biotechnology, Abcam, GenScript, Antibodies-online GmbH, Sigma-Aldrich). Druhý den byly membrány inkubovány s příslušnými sekundárními protilátkami konjugovanými s enzymem křenuv peroxidázou (Santa Cruz Biotechnology, GE Healthcare Amersham). Proteiny byly detekovány pomocí chemiluminiscenčního systému (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific Pierce) a snímány pomocí zobrazovacího systému LAS-4000 (Genetica, Fujifilm). Relativní hladiny proteinů byly kvantifikovány denzitometricky pomocí softwaru Quantity One (Bio-Rad). Stejně množství proteinu (20 μg) bylo nanášeno na každý gel. Na jednom gelu byly současně separovány obě komory a všechny experimentální skupiny. Imunodetekční analýza pro každou protilátku byla opakována minimálně 4 krát a výsledná hodnota byla vztahena na koncentraci proteinu ve vzorku. Koncentrace proteinu byla měřena pomocí Bradford činidla (Sigma-Aldrich).

Enzymatické analýzy

Specifické aktivity CK and HK byly stanoveny spektrofotometricky při vlnové délce 339 nm pomocí enzymaticky zpřažených reakcí v 96-ti jamkových destičkách na multifunkčním systému SynergyTM HT (Biotek Instruments). Enzymatická aktivita HK byla stanovena podle lehce upraveného Worthingtonova protokolu (www.worthington-biochem.com/HK/; Worthington Biochemical Corporation). Reakce běžela při 30°C po dobu 15 min. Enzymatická aktivita CK byla stanovena pomocí komerčně dostupného kitu (CK NAC liq. SYS 1, Roche Diagnostics) a měřena při 37°C po dobu 10 min. Specifické aktivity CK a HK byly vyjádřeny jako jednotky na gram proteinu (U/g) [49]. Enzymatická aktivita uvolněné LDH byla stanovena také pomocí komerčního kitu LDH Liqui-UV kit (Stanbio, Boerne, TX, USA) podle návodu výrobce a vyjádřena jako jednotky na litr (U/L).

Příprava preparátů pro imunofluorescenci

Pro přípravu nativních preparátů byla použita srdce normoxických potkanů a potkanů adaptovaných na CNH. Srdce byla perfundována Krebs-Henseleitovým roztokem s 20mM 2,3-butandionem monoximem po dobu 2 min. Pro přípravu formaldehydem fixovaných nativních preparátů byly použity srdce z normoxických potkanů a z potkanů adaptovaných na IHH-8. Srdce byla perfundována Tyrode roztokem (140mM NaCl, 5,4mM KCl, 1mM Na₂HPO₄, 1mM MgCl₂·6H₂O, 10mM glukóza, 5 mM HEPES, pH 7,4) bez kalcia po dobu 2 min. Poté byla srdce perfundována 4% methanol-free formaldehydem (Polysciences, Inc.) po dobu 3 min. Následně byla srdce uchována ve 20% sacharóze přes noc. Dále byly odstředěny přes síť a komory, rozstříženy transverzálně v jedné třetině od apexu, rychle zamrazeny a uskladněny v tekutém dusíku. Zmražené komory byly nakrájeny na jednotlivé řezy (5 až 7 μm) pomocí přístroje cryocut (Leica 1800) a sbírány na sklíčka se Super-Frost povrchem. Osm zmražených řezů z každého normoxického a hypoxického srdce bylo použito pro imunodetekci specifickými protilátkami a také jako pozitivní a negativní kontroly.

Imunofluorescenční značení

Zmražené řezy LV a RV byly fixovány 4% methanol-free formaldehydem (Polysciences, Inc.) po dobu 5 min a permeabilizovány 100% methanolem při -20°C po dobu 10 min. Následně byly preparáty inkubovány s blokačním médiem, které obsahovalo příslušné sérum, fosfátový pufr (PBS), 0,3% Triton X-100 a 0,3M glycine, po dobu 1 h. Poté byly preparáty incubovány po dobu 1h s primárními polyklonálními protilátkami proti HK1 and HK2 od firmy Santa Cruz Biotechnology a Abcam. Následně byly preparáty inkubovány po dobu 45 min s příslušnou sekundární protilátkou konjugovanou s fluoroforem Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Molecular Probes). Kompartmenty mitochondriálního respiračního řetězce a ATP syntáza byly značeny pomocí MitoProfile BlueNative OXPHOS Antibody Cocktail (Abcam) přes noc při 4°C a následně inkubovány po dobu 45 min s příslušnou sekundární protilátkou konjugovanou s fluoroforem Alexa Fluor 647 (Invitrogen, Molecular Probes). Nakonec byly preparáty zakryty reagenty ProLong Gold Antifade Reagent obsahující jaderný marker 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen, Molecular Probes) a uskladněny ve 4°C.

Kvantitativní fluorescenční mikroskopie

Reprezentativní kvalitativní obrázky byly pořízeny na konfokálním mikroskopu (Leica TCS SP2). Pro kvantitativní analýzy byl použit widefield fluorescenční mikroskop (Olympus Cell[^]R) a kamera Hamamatsu ORCA. Intenzita fluorescenčního signálu byla zaznamenána v 8 pozicích z každé komory a snímána 10 krát pomocí time-lapse scanning módu a kvantifikována pomocí softwaru Fiji ImageJ open source [50]. Ko-lokalizace HK s mitochondriemi byla opět zaznamenána v 8 pozicích z každé komory a snímána sekvenčně pro červený (AlexaFluor 647) a zelený (AlexaFluor 488) kanál. Každá pozice byla navíc snímána 2 krát a v Z rovině. Ko-lokalizace byla vypočtena jako Pearsonův korelační koeficient pomocí softwaru ICA plugin of Fiji ImageJ [51] a RBNCC metody [52]. Tento koeficient vyjadřuje korelaci mezi zeleným fluorescenčním signálem isoformem HK a červeným signálem mitochondriálního OXPHOS komplexu.

Statistické hodnocení

Pro první studii bylo použito 10 normoxických LV a RV pro stanovení exprese a enzymatické aktivity a 6 normoxických LV a RV pro fluorescenční analýzy. Pro stanovení statistické významnosti ($P < 0.05$ or $P < 0.001$) mezi naměřenými hodnotami byl použit nepárový Mann Whitney test. Pro druhou studii bylo použito 5 srdcí od každé experimentální skupiny pro stanovení exprese a enzymatické aktivity a 6 normoxických a CNH srdcí na fluorescenční analýzy a I/R protokol. Statistická významnost ($P < 0.05$) byla určena pomocí testu One-way ANOVA s *post hoc* Dunett's multiple comparison testem anebo s *post hoc* Tukey's multiple comparison testem. V případě fluorescenčních analýz byl použit Mann Whitney test. V rámci poslední studie bylo použito 5 srdcí z každé experimentální skupiny pro stanovení exprese a enzymatické aktivity a 6 srdcí na fluorescenční analýzy. Statistická

významnost ($P < 0.05$) byla určena pomocí Mann Whitney testu. Veškerá statistická vyhodnocení byla prováděna pomocí programu GraphPad Prism 5.00 software. Všechna data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM. Stupeň imunoreaktivita, relativní exprese mRNA a fluorescenční intenzita jsou vyjádřeny jako procento z celku. Ko-lokalizace isoformem HK s mitochondriemi je vyjádřena jako Pearsonův korelační koeficient a enzymatická aktivita je vyjádřena jako U/g nebo U/L.

5. VÝSLEDKY

Výsledky první studie ukázaly, že ačkoliv hladiny mRNA isoformem CK byly významně vyšší v RV než v LV, tak hladiny proteinů isoformem CK a celková aktivita CK zůstaly beze změny (**Obr. 1**). Expres HK1 a HK2 byly jak na úrovni mRNA, tak i na úrovni proteinu, významně vyšší v RV ve srovnání s LV (**Obr. 2**). Tyto nálezy byly následně potvrzeny pomocí imunofluorescenčního značení, které odhalilo podstatně vyšší fluorescenční signály obou HK v RV než v LV (**Obr. 2**). Nicméně celková aktivita HK byla v LV i RV stejná (**Obr. 2**). Stejně tak ko-lokalizace obou isoformem HK s mitochondriemi se mezi komorami nelišily (**Obr. 3**) i přesto, že poměry phospho-Ser473-AKT/ne-phospho-AKT a phospho-Thr308-AKT/ne-phospho-AKT byly výrazně vyšší v RV než v LV (**Obr. 4**).

Výsledky druhé studie ukázaly, že celkové aktivity CK a HK se zvýšily v LV u všech hypoxických režimů (**Obr. 5**), což bylo v souladu se zvýšenými proteinovými hladinami isoformem mtCKs, CKB (**Obr. 6**), HK1 a HK2 (**Obr. 7**). Enzymatické aktivity CK a HK se také zvýšily v hypoxické RV (**Obr. 5**), ale pouze hladina proteinu CKB byla zvýšena (**Obr. 6**). Ko-lokalizace HK1 a HK2 s mitochondriemi zůstaly nezměněny v LV, stejně jako v RV po adaptaci potkanů na protektivní režim CNH (**Obr. 8**). Po I/R insultu se aktivita CK nezměnila (**Obr. 9**), zatímco aktivita HK se v CNH LV výrazně zvýšila (**Obr. 9**). Hladiny HK1 a HK2 proteinů zůstaly nezměněny, HK2 protein měl tendenci k růstu pouze po ischemii v CNH LV (**Obr. 10**).

Výsledky poslední studie ukázaly, že celková aktivita CK a HK se významně zvýšila v LV potkanů adaptovaných na IHH-8 (**Obr. 11**), což je opět v souladu se zvýšenou hladinou proteinů mtCKs, CKB (**Obr. 12**), HK1 a HK2 (**Obr.13**). Zvýšená aktivita HK v RV (**Obr. 11**) je spíše spojena s hladinou proteinu HK2, která měla tendenci k růstu, než s hladinou HK1, která v RV klesá (**Obr. 13**). Ko-lokalizace HK1 a HK2 s mitochondriemi se výrazně zvýšila v obou komorách po adaptaci potkanů na hypobarickou hypoxii (**Obr. 14**). Zvýšená vazba HK1 a HK2 s mitochondriemi byla také potvrzena pomocí frakcionace a metody WB (**Obr.15**).

Veškeré obrázky jsou součástí 16. kapitoly Příloha/Supplement.

6. DISKUSE

První studie ukázala významně vyšší expresi isoformem HK1 a HK2 jak na úrovni mRNA, tak i na úrovni proteinu v RV ve srovnání s LV. Tyto nálezy byly potvrzeny pomocí imunofluorescenčních analýz, které ukázaly podstatně vyšší fluorescenční signály obou HK v RV než v LV. Dosud nebyly publikovány žádné údaje, které by se týkaly porovnání exprese a subcelulární lokalizace isoformem HK v mezi komorami. Vyšší obsah isoformem HK v RV může poukazovat na vyšší aktivitu aerobního glykolytického metabolismu v této komoře, což může vést ke stimulaci oxidativní fosforylace, a tím k zabránění oxidačního stresu. Tato domněnka je podpořena výsledky, které ukázaly vyšší expresi inzulinu podobného růstového faktoru 1 (IGF1) v RV oproti LV [53], který reguluje transport glukózy do buněk, spotřebu glukózy [54,55] a také indukuje expresi genu HK [56]. Kromě toho RV vykazuje sníženou expresi obou isoformem proteinu vázajícího mastné kyseliny a vyšší expresi enzymu rozvětřujícího glykogen [57], což upřednostňuje vyšší využití glukózy v RV. Aktivita glukózového metabolismu je

spojena s expresí kontraktálních proteinů, jako je například těžký řetězec myosinu (MyHC) α a β . MyHC α má vyšší ATPázovou aktivitu, což vede k rychlejší kontrakci, zatímco MyHC β s nižší ATPázovou aktivitou je spojen s nižší kontrakcí [58–60]. Je zajímavé, že nižší exprese MyHC β a vyšší exprese MyHC α byla pozorována v RV ve srovnání s LV [61,62], což naznačuje, že RV má rychlejší svalový fenotyp. Hexokináza představuje zásadní glycolytický enzym hrající důležitou roli v přežití buňky. Některé studie ukázaly, že zvýšená exprese HK je spojena se zvýšenou odolností buněk, včetně kardiomyocytů, proti ischemickému poškození [63] a apoptóze [38,43,44,64–66]. Anti-apoptotický význam HK spočívá v její asociaci s mitochondrií. V poslední době bylo zjištěno, že plně aktivovaná fosforylovaná AKT stimuluje translokaci HK2 do vnější mitochondriální membrány [38,39], kde HK2 inhibuje vazbu pro-apoptotického proteinu BAX [43] a otevření MPT póru [44,45]. Plná aktivace AKT vyžaduje fosforylaci na Ser a Thr zbytku [67]. V přítomné studii byla exprese fosfo-Ser-AKT, stejně jako fosfo-Thr-AKT, v RV výrazně vyšší než v LV. Kromě toho byly také výrazně vyšší poměry fosfo-Ser-AKT/nefosforylované AKT a fosfo-Thr-AKT/nefosforylované AKT v RV než v LV. Přesto vyšší hladina aktivované AKT nevedla v RV k vyšší ko-lokalizaci HK2 s mitochondriemi. Ko-lokalizace HK1 s mitochondriemi se také nelišila mezi komorami. Tyto nálezy naznačují, že aktivace AKT je nutnou, nikoli však postačující, podmínkou pro zvýšení interakce HK2 s mitochondriemi a že může být zapojen ještě další mechanismus, jako je zvýšená koncentrace glukózy a inzulínu [35,36]. Zvýšená vazba HK s mitochondriemi obecně vede ke zvýšení aktivity HK z důvodu sníženého inhibičního účinku G-6-P [68]. V přítomné studii se celková aktivita HK nelišila mezi LV a RV, což je v souladu s výsledky ko-lokalizačních experimentů a s jinými studiemi [69–71].

Druhá studie ukázala, že adaptace potkanů na různé režimy mírné normobarické hypoxie výrazně zvyšuje celkovou aktivitu CK v LV, což je v souladu se zvýšenou expresí isoformem mtCKs a CKB. Vzhledem k tomu, že CKB představuje méně zastoupenou isoformu v dospělém srdci, můžeme předpokládat, že zvýšení celkové aktivity CK za hypoxických podmínek lze přičíst zejména mtCKs. To naznačuje, že up-regulace mtCKs a zvýšení její aktivity vyvolané normobarickou hypoxií může představovat adaptační mechanismus zlepšující oxidační energetický metabolismus. Adaptace na hypoxii vede k mitochondriální biogenezi, která se projevuje zvýšeným počtem a sníženou velikostí mitochondrií [72]. Tento proces je kontrolován mitochondriálním transkripčním faktorem A (mtTFA) za podmínek zhoršené dodávky energie do mitochondrií [73]. Dá se tedy předpokládat, že mtTFA také hraje roli v regulaci transkripce mtCKs vedoucí ke stimulaci oxidativní fosforylace [74,75]. Up-regulace CKB poukazuje na aktivaci fetálního programu, což je v souladu s metabolickými změnami indukovanými hypoxií [76]. Zvýšená exprese CKB a zvýšená celková aktivita CK byla pozorována také v RV, kde exprese mtCKs zůstala nezměněna. To může znamenat, že zvýšení celkové aktivity CK částečně souvisí s fosforylací CKB zprostředkovanou například protein kinázou C (PKC), která vede ke zvýšené aktivitě CKB [77,78] a ke zvýšené afinitě pro PCr [79]. Zdá se tedy, že fosforylovaná CKB je schopna zajistit vyšší přísun ATP pro energeticky náročné procesy při nízké koncentraci PCr [78], což může pravděpodobně nastat i při hypoxii. Výsledky ukázaly nesouhlasný trend v expresi mezi dvěma hlavními isoformami mtCKs a CKM v LV všech hypoxických skupin, což naznačuje různé regulační mechanismy, které kontrolují expresi těchto genů při hypoxii, i když je známo, že exprese mtCKs je kontrolována stejnými transkripčními faktory z MyoD a MEF2 rodin proteinů jako CKM [80]. Adaptace na normobarickou hypoxii vede ke zvýšené glykolýze [81], což potvrzují uvedené výsledky. Celková aktivita HK se v LV, stejně jako v RV, výrazně zvýšila u všech hypoxických režimů, což je v souladu s jinými studiemi [70,71]. To může souviset se zvýšenou expresí HK1 a HK2, která byla pozorována pouze v LV. Další možné vysvětlení je, že zvýšená aktivita HK může být spojena s post-translačními modifikacemi zprostředkovanými AMP-dependentní protein kinázou (AMPK) [82] nebo že dochází ke změnám v terciární struktuře enzymu [83]. AMPK je aktivována hypoxickými podněty [84] a vedle regulace HK2 [85] také inhibuje aktivitu CKM tím, že jí fosforyluje [86]. Navíc, zvýšení aktivity HK může být dosaženo zvýšenou interakcí HK s mitochondriemi. Bylo prokázáno, že AKT kináza fosforyluje HK2 a stimuluje její translokaci do mitochondrií [38]. Nicméně se zdá, že tento mechanismus nehraje roli při stimulaci aktivity HK za uvedených experimentálních podmínek, protože nebyla pozorována žádná zvýšená ko-lokalizace isoformem HK s mitochondriemi po adaptaci na hypoxii. Nicméně je třeba uvést, že

test pro stanovení aktivity HK mohl určit maximální specifickou aktivitu obou isoformů HK nezávisle na lokalizaci molekuly enzymu. Z tohoto důvodu může nepoměrně menší zvýšení aktivity HK, ve srovnání s vyšším zvýšením exprese HK v této studii, spíše poukazovat na post-translační modifikace než na změny v interakci HK s mitochondrií. Zdá se, že přítomné režimy mírné normobarické hypoxie, stejně jako “ischemický preconditioning”, by mohly stabilizovat vazbu HK s mitochondrií. Nedávno Pasdois a spol. (2013) uvedli, že “ischemický preconditioning” nezvyšuje asociaci HK2 s mitochondrií, ale snižuje její disociaci z mitochondriální membrány během prodlouženého ischemického inzultu [87]. Současná studie prokázala signifikantně zvýšenou aktivitu HK v hypoxické LV po I/R inzultu ve srovnání s neischemickými srdečními komorami. Tyto výsledky mohou naznačovat, že adaptace na režim kontinuální normobarické hypoxie může stabilizovat vazbu HK s mitochondrií v průběhu I/R poškození, čímž se snižuje pravděpodobnost navázání BAX na mitochondrie a aktivace apoptózy. Překvapivě bylo zjištěno, že exprese HK1 a HK2 na úrovni mRNA se za hypoxických podmínek liší. Exprese HK2 se výrazně zvýšila, zatímco exprese HK1 zůstala nezměněna. Již dříve bylo zjištěno, že adaptace na hypoxii stabilizuje hypoxií indukovaný faktor 1, který potencuje transkripci HK2 [88]. Experimenty na *Saccharomyces cerevisiae* ukázaly, že HK2 může aktivovat vlastní transkripci a zároveň potlačovat transkripci HK1 [89], nicméně tento regulační mechanismus nebyl dosud popsán u savčích buněk. Adaptace na hypoxii vedla k výrazným změnám mezi komorami na úrovni exprese mtCKs a obou isoformů HK. Zatímco zvýšená exprese byla pozorována v LV, RV zůstala beze změny. To může souviset s tím, že HK1 a HK2 vykazovaly vyšší hladiny exprese v RV než v LV již za normoxických podmínek [90]. Na rozdíl od LV je RV vystavena zvýšené pracovní zátěži v důsledku hypoxické plicní hypertenze, která vede k hypertrofii, což může vysvětlovat absenci nárůstu těchto enzymů.

Třetí studie prokázala významně vyšší celkovou aktivitu CK a zvýšené hladiny proteinů mtCKs a CKB v LV potkanů adaptovaných na drsnější intermitentní hypobarickou hypoxii (IHH-8). Stejně výsledky byly získány i po adaptaci potkanů na méně závažný model intermitentní normobarické hypoxie, INH-8. Tato zjištění ukazují, že silnější hypoxický podnět, kterým je právě IHH-8, stále udržuje aktivní PCr/CK systém pro optimální energetickou homeostázu a recyklaci ADP v mitochondriích. Vzhledem k RV byly změny v expresi CKB podobné, ale exprese mtCKs a CKM se výrazně snížily po IHH-8 ve srovnání s INH-8 režimem. Tyto progresivní změny pozorované u IHH-8 skupiny mohou být v důsledku většího zatížení RV kvůli plicní hypertenzi. Porovnání současných dat s jinými studiemi je velmi složité vzhledem k různým modelům a adaptačním režimům hypoxie. Navíc ostatní studie se zabývaly enzymatickou aktivitu isoformů CK, přičemž přítomná studie demonstruje expresi isoformů CK. Například Letout a spol. (2005) uvádějí podobné výsledky týkající se celkové aktivity CK a aktivit CKB a mtCKs v LV, ale pozorovali opačné změny v aktivitě CKM v LV a v celkové aktivitě CK a aktivitě isoformů CK v RV [91]. To lze vysvětlit tím, že autoři adaptovali potkany na mnohem mírnější stupeň hypoxie ve srovnání s přítomnou studií, což se může odrazit v odlišné buněčné odpovědi a stupni tlakového přetížení RV. Kromě toho studovali vliv hypoxie na Sprague-Dawley potkanech ve srovnání s uvedenou studií na potkanech kmene Wistar, což opět může mít vliv na výsledky. Další studie ukázala pokles celkové aktivity CK a aktivity mtCKs v LV potkanů adaptovaných na hypobarickou hypoxii [92]. V tomto případě autoři použili model kontinuální hypobarické hypoxie s pouhou 30-45 min reoxygenací denně, což představuje větší oxidační stres než současný model intermitentní hypobarické hypoxie. Jak se dalo očekávat, celková aktivita HK byla výrazně zvýšena v LV potkanů adaptovaných na IHH-8, což je v souladu se zvýšenou hladinou proteinů HK1 a HK2. Up-regulace HK1 a HK2 proteinů a zvýšená celková aktivita HK v LV může být spojena s ochrannými metabolickými mechanismy hypobarické hypoxie zvyšující oxidativní fosforylací. Kromě toho ko-lokalizace HK1 a HK2 s mitochondriemi se výrazně zvýšila po adaptaci na IHH-8, což může vést k aktivaci drah vedoucích k přežití kardiomyocytů. Současný model hypobarické hypoxie, který simuluje nadmořskou výšku 7000 m, se zdá být už docela extrémní, pokud jde o adaptivní potenciál. Specifický ochranný účinek HK spočívá v její zvýšené vazbě s mitochondriemi, což vede k inhibici vazby pro-apoptické proteinu BAX a otevření MPT póru, čímž se zabrání buněčné smrti. Z tohoto důvodu se dá usuzovat, že adaptace na IHH-8 je spojena s ROS-dependentní signalizací, což vede k aktivaci drah důležitých k přežití, které mohou případně zahrnovat i vazbu HK s mitochondriemi. Jedna z důležitých drah pro přežití buněk, která stimuluje navázání HK na

mitochondrie, je fosfatidylinozitol 3-kináza (PI3K)/AKT dráha, neboť bylo zjištěno, že aktivovaná AKT stimuluje translokaci HK2 do mitochondrií [38,39]. Bylo také zjištěno, že IHH-8 režim indukuje aktivaci AKT pomocí fosforylace v LV, ale ne v RV [93]. Nicméně prezentované výsledky ukazují výrazně zvýšenou ko-lokalizaci HK1 a HK2 s mitochondriemi i v RV. To ukazuje, že zvýšená ko-lokalizace isoform HK s mitochondriemi je přímo vyvolána adaptací na hypoxii v obou komorách, a podporují názor, že stimulace ko-lokalizace HK s mitochondriemi je zprostředkována odlišnou dráhou nezávislou na aktivaci AKT.

7. ZÁVĚRY

Výsledky této práce ukazují, že normoxická RV má vyšší aktivitu aerobního glykolytického metabolismu a může být tedy schopna reagovat rychleji a silněji na stresující podněty než LV. Navíc tato práce demonstruje, že adaptace na normobarickou hypoxii, jakož i na drsnější hypobarickou hypoxii, zvyšuje expresi mtCKs, CKB, HK1 a HK2 a celkovou aktivitu CK a HK v LV, což vypovídá o přizpůsobení energetického metabolismu na sníženou koncentraci kyslíku ve tkáních nezávisle na modelu a typu hypoxie. Tyto výsledky dále naznačují, že CK a HK společně spolupracují na udržení energetické homeostázy a zajištění odpovídající produkce a transportu ATP v LV za hypoxie. Adaptace na hypoxii vyvolává zjevně odlišné metabolické reakce v LV a RV, které by mohly souviset s hypertrofií RV. Na základě výsledků z ko-lokalizačních experimentů je možné se domnívat, že kardioprotektivní role HK spočívá v její interakci s mitochondriemi, která závisí na stupni oxidačního stresu. HK může hrát zejména klíčovou úlohu v kardioprotektivním mechanismu vyvolaném drsnější hypobarickou hypoxií, která představuje extrémní model adaptace.

8. SUMMARY

Ischemia-reperfusion (I/R) injury, which is a consequence of myocardial infarction, represents a major cause of death worldwide. One of the most effective cardioprotective interventions increasing the resistance of hearts to the I/R injury is adaptation to chronic hypoxia (CH). However, the molecular mechanisms of CH action are still not well known. The most important factors responsible for the I/R injury are reactive oxygen species (ROS) produced by complexes I and III within the mitochondrial electron transport chain. Potential candidates maintaining ROS at a low level are mitochondrial creatine kinase (mtCK) and two hexokinase isoforms (HK1 and HK2). These enzymes highly support mitochondrial oxidative phosphorylation by increasing the availability of ADP for complex V of the respiratory chain. In addition, HK binding to mitochondria inhibits binding of pro-apoptotic protein BAX, thereby protecting cardiac cells against death. Besides the mitochondrial CK isoform, there are two cytosolic CK (CKM and CKB) present in cardiomyocytes that help to maintain energy homeostasis. Based on the known anatomical and physiological differences between left (LV) and right (RV) ventricles, the first study focused on comparing the ventricles in terms of energy metabolism and HK co-localization with mitochondria. Moreover, the level of activated AKT kinase, which facilitates interaction of HK2 with mitochondrial membrane, was also determined. The results of this study showed that the RV has a higher activity of aerobic glycolytic metabolism and may be able to respond faster and more powerfully to stressful stimuli than the LV. It has been also suggest that AKT activation is a necessary but not a sufficient condition for the enhancement of the interaction of HKs with mitochondria and that yet another mechanism may be involved. Further, this study aimed at the effect of normobaric hypoxia on the CK and HK expressions and enzyme activities and HK co-localization with mitochondria in both ventricles. Rats were adapted for 3 weeks to protective and non-protective regimens of 10% normobaric hypoxia. The results showed that the adaptation to normobaric hypoxia leads to the activation of glycolysis and phosphocreatine (PCr)/CK system to maintain energy homeostasis under the reduced oxygen concentration. It can thus suggest that CK and HK could be involved in the stimulation of oxidative phosphorylation and thereby reducing the production of ROS. Although no differences were found between protective and non-protective phenotypes, it cannot be ruled out that CK and HK may play a role in the cardioprotective mechanisms induced by normobaric hypoxia. Interestingly, HK1 and HK2 co-localizations with mitochondria remained unchanged in the LV as well as in the RV after adaptation of rats to a protective regimen, continuous normobaric hypoxia (CNH), suggesting a stabilization of the HK binding with mitochondria. Then, rats adapted to CNH were subjected to the I/R insult. The HK activity significantly increased in the CNH LV after I/R insult, which could suggest that HK can possibly participate in the establishment of ischemia-resistant phenotype of chronically hypoxic hearts. Finally, the last objective of the study was to investigate the role of CK and HK enzymes in the LV and RV of rats adapted to hypobaric hypoxia (7000 m). The hypobaric hypoxia represents a higher level of stress for the myocardium compared to normobaric hypoxia. The results verified the response of energy metabolism to the reduced oxygen level independently on the degree of stress. In addition, the HK1 and HK2 co-localizations with mitochondria markedly increased in both ventricles after adaptation of rats to hypobaric hypoxia, which was confirmed by immunofluorescence technique as well as by fractionation and Western blot method. In conclusion, the protective mechanism of both HKs, which lies in their binding with mitochondria, seems to be activated under the hypoxia, which is marginal for the fatal cell damage, represented by present hypobaric model. This dissertation study provides a novel insight in the CK and HK function and co-operation under different hypoxic adaptations. And it also provides new information related to cardioprotective mechanisms of adaptation to hypobaric hypoxia, which includes increased binding of HK with mitochondria. Targeting the HK binding with mitochondria thus represents a potential approach for future therapeutic uses.

9. INTRODUCTION

Ischemic heart disease and its acute form, myocardial infarction, are one of the most serious and most common heart disorders of modern civilization. The ischemic heart disease is caused by an insufficient blood supply to the myocardium and therefore inadequate myocardial oxygen supply, leading to a lethal myocardial injury accompanied by cardiac arrhythmias called ischemic arrhythmias. The subsequent restoration of blood supply (reperfusion) is indeed crucial for a myocardial viability, however, raises further complications, such as deterioration of cardiac contractility and the formation of reperfusion arrhythmias. Current research is thus focused on the study of the physiological cardioprotective mechanisms whose knowledge would lead to the prevention and treatment of cardiac ischemia-reperfusion (I/R) injury. One of the effective cardioprotective interventions is the adaptation to chronic hypoxia (CH) [1]. The protective effect of CH is known for almost 50 years, when population studies were published showing a reduced incidence of myocardial infarction in people living at high altitudes [2]. These findings were subsequently confirmed experimentally not only for continuous but also for intermittent forms of adaptation [3,4]. Many experimental studies indicate that CH reduces most significant negative consequences of myocardial infarction by reducing infarct size [5], improving recovery of post-ischemic contractile function [6], and by reducing the incidence and severity of ischemic and reperfusion arrhythmias [7,8]. Although the cardioprotective effect of CH has been studied for many years, the molecular mechanisms of CH action are not yet sufficiently clarified [9]. One of the main factors responsible for the I/R injury are reactive oxygen species (ROS) produced by complexes I and III of the mitochondrial electron transport chain. ROS production is directly proportional to the rise of membrane potential (i.e., less negative) [10,11], which is directly related to the limited availability of ADP in this compartment. Therefore, the enzymes responsible for the recycling of ADP have a preventive role, since they reduce the membrane potential and thereby the production of ROS. This role is fulfilled by mitochondrial creatine kinase (mtCKs) and two isoforms of hexokinase (HK1 and HK2) [12–14].

The mtCKs is part of a highly compartmentalized phosphocreatine/creatine kinase (PCr/CK) system that controls the energy flow within cardiomyocytes from the sites of production, mitochondria, to the sites of utilization, such as ATPases in the M-line of the sarcomere, the sarcoplasmic reticulum, and the plasma membrane, and thus maintains energy homeostasis [15–17]. Two cytosolic CK isoforms (CKM and CKB) also contribute to maintaining the energy homeostasis in cardiomyocytes by keeping a high ATP/ADP ratio and the optimal pH in the close proximity of ATPases. The mtCKs, which is localized in the intermembrane space and between cristae, is probably active in octameric form and is functionally associated with adenine nucleotide translocator (ANT), anchored in the inner mitochondrial membrane and with voltage-dependent anion channel (VDAC) [18] located in the outer membrane. It creates a functional unit that uses ATP from the respiratory chain and creatine (Cr) from the cytosol to restore the phosphocreatine (PCr) pool in the cytosol and increases the availability of ADP for complex V of the respiratory chain. This stimulates respiration of mitochondria, decreases membrane potential and reduces the excessive production of ROS [19–24]. The mtCKs also indirectly inhibits opening of the mitochondrial permeability transition (MTP) pore [25,26], which may be directly activated by an increased concentration of ROS [27], and its activation significantly participates in apoptosis.

Another important enzyme, which significantly affects the ROS production by the respiratory chain, is hexokinase (HK). The heart express two HK isoforms, HK1 and HK2 [28,29], which differ in their affinity for substrates (glucose and ATP) in tissues [30], localization in the cell, and in the allosteric regulation [31]. Both HK phosphorylate glucose to glucose-6-phosphate (G-6-P) and therefore they are essential for the regulation of glucose utilization in cardiomyocytes [32]. It has been shown that cardiac HK isoforms directly couple the glucose metabolism with oxidative phosphorylation and preferably use the ATP from the oxidative

phosphorylation to catalyze the key step of glycolysis [33]. The produced ADP further promotes the mitochondrial respiration by stimulation of the activity of complex V of the respiratory chain. The HK1 and HK2 thus function by the same mechanism as mtCKs, however the ADP is passed through both pores, VDAC and ANT. Under physiological conditions, HK1 binds into the outer mitochondrial membrane [14,32], while HK2 occurs predominantly in the cytosol [28,34] and its binding with the outer mitochondrial membrane is enhanced by a higher concentration of glucose, insulin, morphine, or under oxidative stress [35–37]. Recently it has been reported that the AKT kinase phosphorylates HK2 at threonine 473 and thus stimulates HK2 translocation into mitochondria [38,39]. The HK2 interaction with the outer mitochondrial membrane increases its binding affinity for ATP [40], which increases the resistance of the HK2 to the feedback inhibition by its own product G-6-P [41,42]. The increased binding of HK2 with mitochondrial membrane also prevents the binding of pro-apoptotic protein BAX [43], and thus indirectly inhibits the pathway leading to apoptosis. The HK1 and HK2 are on the outer mitochondrial membrane bound *via* VDAC, which is functionally connected to ANT, and this interaction prevents the MPT pore opening and cytochrome *c* release under pathophysiological conditions [44,45].

Taken together, mtCKs and HK isoforms coupled with VDAC, ANT and ATP synthase could represent a very important and complicated ADP recycling system that utilizes glucose, ATP and creatine as a main sources for maintaining a low membrane potential and thus can maintain the production of ROS at low level [46,47]. However, what is the synchronization of both systems mtCKs and HK isoforms and how it relates to the energy state of the cell in normoxia and hypoxia, i.e. the ratio of ATP/ADP, ATP/AMP or PCr/ATP, is still not elucidated.

10. AIMS OF THE STUDY

- To determine the expression of CK and HK isoforms and the ratio of phosphorylated forms of AKT to non-phosphorylated AKT form, next to examine total CK and HK enzyme activities and the co-localization of HK isoforms with mitochondria in normoxic rat left (LV) and right (RV) ventricles.
- To determine the effect of protective and non-protective regimens of normobaric hypoxia on the expression of CK and HK isoforms, total CK and HK enzyme activities and the co-localization of HK isoforms with mitochondria in rat LV and RV. Next to examine the effect of the I/R insult on total CK and HK enzyme activities and HK isoform expressions in the LV of rats adapted to a protective regimen of continuous normobaric hypoxia.
- To determine the effect of hypobaric hypoxia on the expression of CK and HK isoforms, total CK and HK enzyme activities and the co-localization of HK isoforms with mitochondria in rat LV and RV.

11. METHODS

Animals

Adult male Wistar rats (Velaz, Ltd., Czech Republic and Charles River Laboratories, Inc., Germany) were kept at a 12/12-h light/dark cycle and fed a standard laboratory diet. The maintenance and handling of the experimental animals were in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996). The experimental protocol was approved by the Animal Care and Use Committee of the Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic.

Adaptation to normobaric and hypobaric hypoxia

Animals were exposed to 10% normobaric hypoxia for 3 weeks under the following three regimens: continuous hypoxia for 24 h/day (CNH) and intermittent hypoxia for 8 h/day with a single 16-h normoxic period per day (INH-8) representing protective regimens and intermittent hypoxia for 23 h/day with a single 1-h normoxic period per day (INH-23) representing a non-protective regimen. Other animals were exposed for 5 weeks to intermittent hypobaric hypoxia 8h/day (IHH-8). A control group (N) was kept under normoxic conditions for the same period of time.

Ischemia-reperfusion protocol

The normoxic hearts and hearts from rats adapted to CNH were placed on the Langendorff apparatus and perfused by Krebs-Henseleit solution (118mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.2mM MgSO₄, 1.25mM CaCl₂, 1.2mM KH₂PO₄, 25mM NaHCO₃, 11mM glucose, pH 7.4). The Langendorff hearts were divided into 3 groups: i) hearts stabilized for 15 min (KN, KH); ii) hearts stabilized for 15 min and subjected to ischemia for 10 min (IN, IH); iii) hearts stabilized for 15 min, subjected to ischemia for 20 min and then subjected to reperfusion for 10 min (IRN, IRH). After the start of reperfusion, the effluent samples were collected at intervals: 10 s, 20 s, 30 s, 60 s, 3 min, and 10 min to determine the LDH release as an indicator of degree of cell damage.

Tissue preparation

All rats were sacrificed by decapitation and the hearts were rapidly excised and washed in ice-cold saline. The LV and RV were dissected, immediately frozen in liquid nitrogen and weighed. The Langendorff hearts were prepared by same procedure. Frozen tissue pieces were pulverized in liquid nitrogen and subsequently homogenized either in homogenization buffer (12.5mM TRIS, 2.5mM EGTA, 1mM EDTA, 250mM sucrose, 5mM DL-Dithiothreitol (DTT), protease inhibitor cocktail (cCOMPLETE, Roche Diagnostics), and phosphatase inhibitor cocktail (PhosSTOP, Roche Diagnostics), pH 7.4) for protein analyses or in Trizol Reagent (Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR) for isolation of RNA. Homogenates were stored at -80°C.

RNA isolation and Real-Time qRT-PCR analyses

The total cellular RNA was extracted from each LV and RV using Trizol Reagent and cleaned up by DNA-free RNA kit (Ambion, Carlsbad, CA). The purity and integrity of the RNA preparations was checked spectroscopically using NanoDrop and by agarose gel electrophoresis. RNA was converted to cDNA using a RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania) with oligo(dT) primers according to the manufacturer's instructions. PCR amplification was analyzed using the mono color hydrolysis probe method (Universal Probe, Roche Applied Sciences) or SyberGreen protocol (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Specific primers for HK1, HK2, CKM, CKB, mtCKs, and the reference gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) were designed using the Universal Probe Library Assay Design Center (Roche Applied Science): *HK1_F*: *tctggcctcacccttctcat*, *HK1_R*: *atcaagattccacagtcagggt* and #121; *HK2_F*: *ccagcagaacagcctagacc*, *HK2_R*: *agatgccttgaatccctttg* and #101; *CKM_F*: *cgcagcatcaagggtta*, *CKM_R*: *cccgtcaggctgttgaga* and #16; *CKB_F*: *ccacttcctcttcgacaagc*, *CKB_R*: *ggaacgtctattgtcattgtgc* and #84; *mtCKs_F*: *gccacccttcattaagactg*, *mtCKs_R*: *caaaaaggtcagcaaacacct* and #83; *HPRT_F*: *gaccggttctgtcatgtcg*, *HPRT_R*: *acctgggtcatcatcactaatcac* and #95. The Real-time PCR reaction was performed on a LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Transcript levels were normalized to the level of the reference gene HPRT1 transcript. The expression level of mRNA was normalized with regard to specific PCR efficiency for each gene [48].

Isolation of mitochondria

Normoxic hearts and hearts from rats adapted to IHH-8 were washed in ice-cold saline buffer. The LV, RV, and S were separated, weighed, and immediately placed in the BIOPS buffer (10mM Ca-EGTA buffer, 0.1μM free calcium, 20mM imidazole, 20mM taurine, 50mM K-MES, 0.5mM DTT, 6.56mM MgCl₂, 5.77mM ATP, 15mM PCr, pH 7.1). The tissue were cut to pieces and homogenized with homogenization buffer (0.25M sucrose, 10mM TRIS, 2mM EDTA, 2mM EGTA, BSA (0.5mg/mL), pH 7.2) After that, homogenates were centrifuge at 600 g and 4°C for 10 min. The supernatants were filtered and centrifuge at 10,000 g and 4°C for 10 min. Supernatants representing the cytosol were stored at -80°C for further analyses. Pellets were resuspended in the buffer (pH 7.2) containing 0.25 M sucrose and 10 mM TRIS and centrifuge at 10,000 g and 4°C for 10 min. Supernatants were discard, pellets were resuspended in the same

buffer and gently shortly homogenized. Homogenates were used for SDS-PAGE and Western Blot (WB) analyses.

SDS-PAGE and Western blotting

Individual homogenates from LV and RV samples were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 10% polyacrylamide gels at constant voltage of 200 V (Mini-PROTEAN TetraCell, Bio-Rad). The gel-resolved proteins were electrotransferred onto the nitrocellulose membrane (0.2 μ m) at a constant voltage of 100 V and 350 mA current for 1 h at 4°C using a WB method (Bio-Rad). Membranes were blocked for 1 h with 5% non-fat dry milk in TRIS-buffered saline solution containing Tween 20 (TTBS) and incubated overnight at 4°C with the primary polyclonal antibodies: anti-HK1, anti-HK2, anti-CKM, anti-CKB, anti-mtCKs, anti-GAPDH, anti-pS-AKT, anti-pT-AKT, anti-AKT, anti-Bcl-2, and anti-BAX (Santa Cruz Biotechnology, Abcam, GenScript, Antibodies-online GmbH, Sigma-Aldrich). Next day, the membranes were incubated for 1 h with appropriate secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, GE Healthcare Amersham). Proteins were detected by enhanced chemiluminescence (ECL) substrate (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific Pierce) and visualized by a LAS-4000 imaging system (Genetica, Fujifilm). Changes in the relative protein levels were quantified using Quantity One Software (Bio-Rad). The same amount of protein (20 μ g) was loaded on the gels. Samples from each experimental group and from both ventricles were always run on the same gel and quantified on the same membrane. The analysis was repeated minimally four times for each antibody and the results normalized to the total protein. The total protein concentration was measured using the Bradford dye binding assay (Sigma-Aldrich).

Enzyme analyses

Specific CK and HK enzyme activities were assessed by an enzyme-coupled assays and determined in 96-well plates by measuring the increase in absorbance at 339 nm using a multireader system SynergyTM HT (Biotek Instruments). Enzyme activity of HK was assessed according to a slightly modified Worthington protocol (<http://www.worthington-biochem.com/HK/>; Worthington Biochemical Corporation). The reaction was run at 30°C for 15 min. The CK activity was measured at 37°C for 10 min using a commercial kit (CK NAC liq. SYS 1, Roche Diagnostics). Specific enzyme CK and HK activities were expressed as units per gram protein (U/g) [49]. The LDH release was determined using the LDH Liqui-UV kit (Stanbio, Boerne, TX, USA) according to manufacturer's instructions and expressed as units per liter (U/L).

Frozen section preparation for immunofluorescence

Normoxic hearts and hearts from rats adapted to CNH were used for the preparation of native frozen sections. Hearts were perfused by Krebs-Henseleit solution with 20mM 2,3-butanedione monoxime for 2 minutes. Hearts from rats adapted to IHH-8 and appropriate normoxic controls were used for preparation of formaldehyde perfused frozen sections. Hearts were perfused by Tyrode solution (140mM NaCl, 5.4mM KCl, 1mM Na₂HPO₄, 1mM MgCl₂.6H₂O, 10mM glucose, 5mM HEPES, pH 7.4) without calcium for 2 min. After that, hearts were perfused by 4% methanol-free formaldehyde (Polysciences, Inc.) for 3 minutes. Then, hearts were incubated in 20% sucrose overnight. After perfusion, atria were cut out, ventricles were cut transversally in one third from apex and snap-frozen and stored in liquid nitrogen. Frozen ventricles were cut to cryosections (5 to 7 μ m) using a cryocut (Leica 1800) and collected on the Super-Frost slides. Eight cryosections from each normoxic or hypoxic heart were used for antibodies staining and as negative and positive controls.

Immunofluorescence staining

Cryosections were fixed in 4% methanol-free formaldehyde (Polysciences, Inc.) for 5 min and permeabilized in 100% ice-cold methanol for 10 min. Then, cryosections were incubated for 1 h with a blocking solution containing an appropriate serum, Phosphate-buffered saline (PBS), 0.3% Triton X-100, and 0.3M glycine. Next, Cryosections were incubated for 1 h with primary polyclonal antibodies against HK1 and HK2 from Santa Cruz Biotechnology and from Abcam or, alternatively, with Alexa Fluor 488 conjugated monoclonal antibody against rat HK1 (Cell Signaling Technology). Sections stained with polyclonal sera were subsequently incubated for 45 min with secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Molecular Probes). The mitochondrial compartment was stained with MitoProfile BlueNative OXPHOS Antibody Cocktail (Abcam) overnight at 4°C and subsequently with Alexa Fluor 647

secondary antibody for 45 min (Invitrogen, Molecular Probes). Sections were mounted in ProLong Gold Antifade Reagent containing a nuclei marker 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen, Molecular Probes) and stored at 4°C.

Quantitative fluorescence microscopy

Representative qualitative images were captured by confocal microscopy (Leica TCS SP2). For the purpose of quantitative analyses, images were acquired using a widefield fluorescence microscope (Olympus Cell[^]R) and Hamamatsu ORCA camera. For the quantification of fluorescence intensity eight positions (four for each ventricle) on every section were captured and scanned 10 times using a time-lapse scanning mode and quantified using Fiji ImageJ open source software [50]. For the co-localization screenings eight positions on each cryosection (four for each ventricle) were sequentially acquired for a red (AlexaFluor 647) and green (AlexaFluor 488) channel. Each position captured twice and scanned in Z axis. The co-localization was calculated as the Pearson's correlation coefficients using ICA plugin of Fiji ImageJ software [51] and RBNCC method [52]. This coefficient represents a correlation between the green fluorescence signal of HK1 or HK2 isoforms and the red signal of mitochondrial OXPHOS complex.

Statistical analyses

In the first study 10 normoxic LV and RV were used for expression and enzyme analyses and 6 normoxic LV and RV were used for quantitative fluorescence analyses. The statistical differences ($P < 0.05$ or $P < 0.001$) between ventricles were determined by the unpaired Mann Whitney test. For next study 5 hearts from each experimental group were used for expression and enzyme analyses and 6 normoxic and CNH hearts were used for quantitative fluorescence analyses and I/R protocol. Statistical evaluation ($P < 0.05$) was performed using One-way ANOVA followed by a *post hoc* Dunnett's multiple comparison test or by a *post hoc* Tukey's multiple comparison test. The fluorescence analyses were tested by the Mann Whitney test. And for last study 5 hearts from each experimental group were used for expression and enzyme analyses and 6 hearts were used for quantitative fluorescence analyses. The statistical differences ($P < 0.05$) were determined by the unpaired Mann Whitney test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.00 software. All data are expressed as mean \pm SEM. The degree of immunoreactivity, relative mRNA expression, and fluorescence intensity are expressed as a percentage of total. The co-localization of HK with mitochondria is expressed as the Pearson's correlation coefficient and enzyme activities are expressed as U/g or as U/L.

12. RESULTS

The results of the first study showed that mRNA levels of CK isoforms were significantly higher in the RV than in the LV, although the protein levels of CK isoforms and the total CK activity remained unchanged (**Fig. 1**). However, the expression of both HK1 and HK2 at mRNA and protein levels were significantly higher in the RV as compared to the LV (**Fig. 2**). These findings were corroborated by immunofluorescence staining which revealed substantially higher fluorescence signals of both HKs in the RV than in the LV (**Fig. 2**). On the other hand, the total HK activity did not differ between ventricles (**Fig. 2**). The co-localization of both HK isoforms also did not differ between LV and RV (**Fig. 3**) despite the higher ratios of phospho-Ser473-AKT/non-phospho-AKT and phospho-Thr308-AKT/non-phospho-AKT in the RV than in the LV (**Fig. 4**).

The results of the second study showed that the total CK and HK activities increased in the LV at all hypoxic regimens (**Fig. 5**), which was consistent with elevated protein levels of mtCKs, CKB (**Fig. 6**), HK1, and HK2 (**Fig. 7**) isoforms in the LV. The CK and HK enzyme activities also increased in hypoxic RV (**Fig. 5**), but only CKB protein was elevated (**Fig. 6**). The HK1 and HK2 co-localizations with mitochondria remained unchanged in the LV as well as in the RV after adaptation of rats to a protective regimen CNH (**Fig. 8**). The I/R insult did not alter the total CK activity (**Fig. 9**), while significantly increased the HK activity in the CNH LV (**Fig. 9**). The HK1

and HK2 protein levels remained unchanged, only HK2 protein tended to increase after ischemia in the CNH LV (**Fig. 10**).

The results of the last study demonstrate that the total CK and HK activities significantly increased in the LV of rats adapted to IHH-8 (**Fig. 11**), which is again in line with the elevation of mtCKs, CKB (**Fig. 12**), HK1, and HK2 (**Fig. 13**) proteins in the LV. The increased HK activity in the RV (**Fig. 11**) is rather associated with HK2 protein, which tended to growth, than with HK1 protein, which decreased in the RV (**Fig. 13**). The HK1 and HK2 co-localizations with mitochondria markedly increased in both ventricles after adaptation of rats to hypobaric hypoxia (**Fig. 14**). The elevated binding of HK1 and HK2 with mitochondria was also confirmed using the fractionation and WB method (**Fig. 15**).

All figures are included in Chapter 16 Příloha/Supplement.

13. DISCUSSION

The first study demonstrated a significantly higher expression of HK1 and HK2 isoforms at mRNA as well as protein level in the RV as compared to the LV. These findings were confirmed by immunofluorescence analyses, which revealed substantially higher fluorescence signals of both HKs in the RV than in the LV. To our knowledge, no data have been published to date comparing the expression and subcellular localization of HK isoforms in the RV and LV. The higher content of HK isoforms in the RV may suggest a higher activity of aerobic glycolytic metabolism in this ventricle, which can enhance oxidative phosphorylation and consequently attenuate oxidative stress. This notion is supported by findings of the higher expression of insulin-like growth factor 1 (IGF1) in the RV than in the LV [53], which regulates the glucose transport into the cells, glucose utilization [54,55] and also induces the HK gene expression [56]. Besides that, the RV shows a lower expression of both fatty acid binding protein isoforms and a higher expression of glycogen debranching enzyme [57], which may favor a higher glucose utilization in the RV. The activity of glucose metabolism is associated with the expression of contractile proteins, such as myosin heavy chain (MyHC) α and β . The MyHC α possesses a higher ATPase activity leading to a faster contraction, whereas MyHC β with a lower ATPase activity is associated with a slower contraction [58–60]. Interestingly, a lower expression of MyHC β and a higher expression of MyHC α has been observed in the RV as compared to the LV [61,62], indicating that the RV exhibits a faster muscle phenotype. Hexokinase represents an essential glycolytic enzyme playing an important role in survival pathways. Several reports have shown that an increased expression of HK is associated with an improved resistance of cells, including cardiomyocytes, against ischemic injury [63] and apoptosis [38,43,44,64,65,66]. The anti-apoptotic importance of HK lies to its association with mitochondria. Recently, it has been reported that fully activated phospho-AKT stimulated HK2 translocation to the outer mitochondrial membrane [38,39] where HK2 inhibited the binding of the pro-apoptotic BAX protein [43] and the opening of the MPT pore [44,45]. The full activation of AKT requires phosphorylation at both Ser and Thr residues [67]. In the present study, the expression of phospho-Ser-AKT as well as phospho-Thr-AKT was significantly higher in the RV than in the LV. In addition, both ratios of phospho-Ser-AKT/non-phosphorylated AKT and phospho-Thr-AKT/non-phosphorylated AKT were markedly higher in the RV than in the LV. Nevertheless, the higher level of activated AKT in the RV did not lead to an increased co-localization of HK2 with the mitochondria. The co-localization of HK1 with mitochondria also did not differ between ventricles. These findings suggest that AKT activation is a necessary but not a sufficient condition for the enhancement of the interaction of HK2 with mitochondria and that yet another mechanism may be involved, such as an increased concentrations of glucose or insulin [35,36].

The increased binding of HK with mitochondria generally results in an increased HK activity because of the reduction of G-6-P inhibitory effect [68]. In this study, the total HK activity did not differ between LV and RV, which is in line with the co-localization findings and other papers [69–71].

The second study demonstrated that adaptation of rats to different regimens of moderate normobaric hypoxia significantly increased the total CK activity in the LV, which is in accordance with an increased expression of mtCKs and CKB isoforms. In view of the fact, that CKB represents a minor isoform in the mature heart, we can assume that the increase of the total CK activity under hypoxic conditions can be attributed mainly to mtCKs. This suggests that the up-regulation of mtCKs and increase of its activity induced by normobaric hypoxia may represent a compensatory mechanism engaged in improving oxidative energy metabolism. Adaptation to hypoxia leads to a mitochondrial biogenesis manifested by the increased number and decreased size of mitochondria [72]. This process is regulated by mitochondrial transcription factor A (TFAM) under conditions of impaired mitochondrial energy supply [73]. It can be assumed, that TFAM also plays a role in transcriptional regulation of mtCKs leading to stimulation of oxidative phosphorylation [74,75]. The up-regulation of CKB points to the activation of fetal gene expression program, which is in line with the abundant evidence of hypoxia-induced metabolic changes resembling early developmental stages [9]. The increased expression of CKB together with the elevated total CK activity was observed also in the RV, where mtCKs expression remained unchanged. This may imply that the increase of total CK activity is at least partially related to the phosphorylation of CKB mediated, for example, by protein kinase C (PKC), which leads to increased CKB activity [77,78] and affinity for PCr [79]. Apparently, phosphorylated CKB is able to provide a higher ATP supply for energy-requiring processes at low PCr levels [78], which may be likely required also during hypoxia. The results showed a discordant trend in the expression between two major isoforms mtCKs and CKM in the LV of all hypoxic groups, suggesting different regulatory mechanisms controlling the expression of these genes during hypoxia, although it is known that mtCKs is regulated by the same transcription factors from the MyoD and Mef2 family of proteins as CKM [80]. Adaptation to normobaric hypoxia causes a shift from lipid oxidation to glycolysis [81], which was also reflected in the results. The HK activity significantly increased in the LV as well as in the RV under all hypoxic regimens, which is in line with other studies [70,71]. This can be related to an increased expression of HK1 and HK2, which was observed only in the LV. Another possible explanation of enhancing HK activity can lie in the post-translation modifications mediated by AMP-dependent protein kinase (AMPK) [82] or in changes in the enzyme tertiary structure [83]. AMPK is activated by hypoxic stimuli [84] and, beside of regulating HK2 [85], it also inhibits CKM activity by phosphorylation [86]. In addition, the enhancement of HK activity can be achieved by its greater association with mitochondria. It has been shown that AKT kinase phosphorylates HK2 and stimulates its translocation to the mitochondria [38]. However, this mechanism does not seem to play a role in the stimulation of HK activity in present experimental conditions, because no increase in mitochondrial co-localization of HK isoforms after adaptation to hypoxia was observed. Nevertheless, it should be mentioned that the present HK assay allowed to determine the maximal specific activity of both HK isoforms independently of the localization of the enzyme molecules. Therefore, the disproportionately smaller increase of HK activity as compared to the higher increase of HK expression in this study may rather indicate the effect of post-translational modifications than changes in interactions of HK with mitochondria. It seems that the present regimens of moderate normobaric hypoxia, similarly as the ischemic preconditioning, could stabilize the binding of HK with mitochondria. Recently, Pasdois et al. (2013) have reported that ischemic preconditioning does not increase the HK2 association with mitochondria but reduces its loss from mitochondrial membrane during prolonged ischemic insult [87]. The present study showed a significantly increased HK activity in the hypoxic LV after I/R insult as compared to non-ischemic ventricles. These results may suggest that adaptation to continuous normobaric

hypoxic regimen can preserve the binding of HK with mitochondria during I/R injury, thereby reducing the probability of BAX binding into mitochondria to activate apoptosis. Surprisingly, discordant changes in the expression of HK1 and HK2 at mRNA level under hypoxic conditions were found. HK2 significantly increased, whereas HK1 remained unchanged. It has previously been observed that adaptation to hypoxia stabilizes the hypoxia inducible factor 1, which potentiates HK2 transcription [88]. Experiments on *Saccharomyces cerevisiae* revealed that HK2 can activate its own transcription and repress transcription of HK1 [89], but this regulatory mechanism has not yet been described in mammalian cells. Adaptation to hypoxia led to significant right-to-left ventricular differences in the expression of mtCKs and both HK isoforms. While the increased expression was observed in the LV, the RV myocardium remained unaffected. This may be related to the fact that both HK1 and HK2 exhibited higher expression levels in the RV than in the LV already under normoxic conditions [90]. Unlike the LV, the RV is exposed to an increased workload due to hypoxic pulmonary hypertension leading to hypertrophy, which may account for the absence of any up-regulation of these enzymes.

The third study demonstrated the significantly increased total CK activity and elevated protein levels of mtCKs and CKB in the LV of rats adapted to severe intermittent hypobaric hypoxia (IHH-8). The same results have been also obtained after adaptation of rats to a less severe model of intermittent normobaric hypoxia, INH-8. These findings show that a stronger hypoxic stimulus, which is just IHH-8, still maintains active PCr/CK system for optimal energy homeostasis and ADP recycling in mitochondria. With respect to RV, changes in the CKB expression were similar, but the expression of mtCKs and CKM significantly decreased after IHH-8 as compared to INH-8 regimens. These progressive changes observed in the IHH-8 group can be due to a greater RV afterload imposed by pulmonary hypertension. Comparing present data with other studies is very complicated due to different models and adaptation regimens of hypoxia. In addition, other studies have determined the enzyme activity of CK isoforms, while the present study demonstrated the expression of CK isoforms. For example, Letout et al. (2005) have reported similar results related to the total CK activity and CKB and mtCKs activities in the LV, but they have observed an opposite results for CKM activity in the LV and for the total CK activity and CK isoforms activities in the RV [91]. This can be explained by the fact that the authors have adapted rats to much lower degree of hypoxia compared to the present study, which can be reflected in distinct cellular responses and the degree of RV pressure overload. Moreover, they have studied the effect of hypoxia on Sprague-Dawley rats, as compared to the present study on Wistar rats, which may also affect the results. Another study has reported a decrease of the total CK activity and mtCKs activity in the LV of rats adapted to hypobaric hypoxia [92]. In this case, the authors used a model of continuous hypobaric hypoxia with only 30-45 min of reoxygenation per day, which may be associated with a greater oxidative stress than the present model of intermittent hypobaric hypoxia. As expected, the total HK activity also markedly increased in the LV of rats adapted to IHH-8, which is in line with elevated HK1 and HK2 protein levels. The up-regulation of HK1 and HK2 proteins and increased total HK activity in the LV can be related to the protective metabolic mechanisms of hypobaric hypoxia enhancing the oxidative phosphorylation. In addition, HK1 and HK2 co-localizations with mitochondria significantly increased after adaptation to IHH-8, which can result in the activation of survival pathways in cardiomyocytes. The present model of hypobaric hypoxia, which simulates an altitude of 7000 m seems to be already quite extreme in terms of adaptive potential. The specific protective effect of HK lies in its increased binding with mitochondria, which results in the inhibition of binding of pro-apoptotic protein BAX and opening of MPT pore, thereby preventing cell death. Therefore, it seems that adaptation to IHH-8 is associated with ROS-dependent signaling, which leads to activation of pro-survival pathways that may possibly involve the HK binding to mitochondria. One of the important pro-survival pathways resulting in the stimulation of HK association with mitochondria is PI3K/AKT pathway because it has been found that activated AKT can stimulate HK2 translocation into mitochondria [38,39]. It has been reported

that IHH-8 regimen induced the activation of AKT mediated by its phosphorylation in the LV but not in the RV [93]. However, the present results showed substantially increased HK1 and HK2 co-localizations with mitochondria also in the RV. This shows that the increased co-localization of HK isoforms with mitochondria is directly induced by hypoxia in both ventricles and supports the view that the stimulation of HK co-localization with mitochondria is mediated by a distinct pathway independent on the AKT activation.

14. CONCLUSIONS

The results of the present study indicate that the normoxic RV has a higher activity of aerobic glycolytic metabolism and may be able to respond faster and more powerfully to stressful stimuli than the LV. Furthermore, the study demonstrates that adaptation to normobaric hypoxia as well as to more severe hypobaric hypoxia increases mtCKs, CKB, HK1, and HK2 expressions and total CK and HK activities in the LV, which reflects the adaptation of energy metabolism to a decreased tissue oxygen concentration regardless the model and type of hypoxia. These results also suggest that CK and HK co-operate together to maintain energy homeostasis and provide an adequate ATP production and transfer in the LV under hypoxia. Adaptation to hypoxia evokes apparently dissimilar metabolic responses in the LV and RV, which could be related to RV hypertrophy. Based on the results from co-localization experiments, it can be assumed that the cardioprotective role of HK lies in its interaction with mitochondria, which depends on the degree of oxidative stress. In particular, HK may play a crucial role in the cardioprotective mechanism induced by severe hypobaric hypoxia, which represents an extreme model of adaptation.

15. POUŽITÁ LITERATURA/REFERENCES

1. Kolar F, Ostadal B: Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res Acad Sci Bohemoslov* 2004;53 Suppl 1:S3–13.
2. HURTADO A: Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann Intern Med* 1960 Aug;53:247–258.
3. Poupa O, Krofta K, Prochazka J, Turek Z: Acclimation to simulated high altitude and acute cardiac necrosis. *Fed Proc* 1966 Aug;25:1243–1246.
4. Widimsky J, Urbanova D, Ressler J, Ostadal B, Pelouch V, Prochazka J: Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat. *Cardiovasc Res* 1973 Nov;7:798–808.
5. Turek Z, Kubát K, Ringnalda BE, Kreuzer F: Experimental myocardial infarction in rats acclimated to simulated high altitude. *Basic Res Cardiol* 1980 Aug;75:544–554.
6. Baker JE, Curry BD, Olinger GN, Gross GJ: Increased tolerance of the chronically hypoxic immature heart to ischemia. Contribution of the KATP channel. *Circulation* 1997 Mar 4;95:1278–1285.
7. Asemu G, Papousek F, Ostádal B, Kolár F: Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K(ATP) channel. *J Mol Cell Cardiol* 1999 Oct;31:1821–1831.
8. Meerson FZ, Gomzakov OA, Shimkovich MV: Adaptation to high altitude hypoxia as a factor preventing development of myocardial ischemic necrosis. *Am J Cardiol* 1973 Jan;31:30–34.

9. Ostadal B, Kolar F: Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respir Physiol Neurobiol* 2007 Sep 30;158:224–236.
10. Boveris A, Chance B: The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973 Jul;134:707–716.
11. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA: High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 1997 Oct 13;416:15–18.
12. Bessman SP, Geiger PJ: Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science* 1981 Jan 30;211:448–452.
13. Rosenshtraukh LV, Saks VA, Undrovinas AI, Chazov EI, Smirnov VN, Sharov VG: Studies of energy transport in heart cells. The effect of creatine phosphate on the frog ventricular contractile force and action potential duration. *Biochem Med* 1978 Apr;19:148–164.
14. Wilson JE: An introduction to the isoenzymes of mammalian hexokinase types I-III. *Biochem Soc Trans* 1997 Feb;25:103–107.
15. Saks VA, Ventura-Clapier R, Aliev MK: Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochim Biophys Acta* 1996 Jun 13;1274:81–88.
16. Ventura-Clapier R, Veksler V, Hoerter JA: Myofibrillar creatine kinase and cardiac contraction. *Mol Cell Biochem* 1994 May;133-134:125–144.
17. Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM: Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the “phosphocreatine circuit” for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 1992 Jan 1;281 (Pt 1):21–40.
18. Brdiczka DG, Zorov DB, Sheu S-S: Mitochondrial contact sites: their role in energy metabolism and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2006 Feb;1762:148–163.
19. Jacobus WE, Lehninger AL: Creatine kinase of rat heart mitochondria. Coupling of creatine phosphorylation to electron transport. *J Biol Chem* 1973 Jul 10;248:4803–4810.
20. Jacobus WE, Saks VA: Creatine kinase of heart mitochondria: changes in its kinetic properties induced by coupling to oxidative phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* 1982 Nov;219:167–178.
21. Kernef F, Le Tallec N, Nadal L, Bégué JM, Le Rumeur E: Phosphocreatine synthesis by isolated rat skeletal muscle mitochondria is not dependent upon external ADP: a ³¹P NMR study. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 Aug 23;225:819–825.
22. O’Gorman E, Beutner G, Wallimann T, Brdiczka D: Differential effects of creatine depletion on the regulation of enzyme activities and on creatine-stimulated mitochondrial respiration in skeletal muscle, heart, and brain. *Biochim Biophys Acta* 1996 Sep 12;1276:161–170.
23. Saks VA, Belikova YO, Kuznetsov AV: In vivo regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP. *Biochim Biophys Acta* 1991 Jul 8;1074:302–311.
24. Wyss M, Smeitink J, Wevers RA, Wallimann T: Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1992 Sep 25;1102:119–166.

25. Dolder M, Wendt S, Wallimann T: Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage. *Biol Signals Recept* 2001 Apr;10:93–111.
26. Dolder M, Walzel B, Speer O, Schlattner U, Wallimann T: Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J Biol Chem* 2003 May 16;278:17760–17766.
27. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE: Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 2001 Apr 20;495:12–15.
28. Aubert-Foucher E, Font B, Gautheron DC: Rabbit heart mitochondrial hexokinase: solubilization and general properties. *Arch Biochem Biophys* 1984 Jul;232:391–399.
29. Burcelin R, Printz RL, Kande J, Assan R, Granner DK, Girard J: Regulation of glucose transporter and hexokinase II expression in tissues of diabetic rats. *Am J Physiol* 1993 Sep;265:E392–401.
30. Ritov VB, Kelley DE: Hexokinase isozyme distribution in human skeletal muscle. *Diabetes* 2001 Jun;50:1253–1262.
31. White TK, Wilson JE: Binding of nucleoside triphosphates, inorganic phosphate, and other polyanionic ligands to the N-terminal region of rat brain hexokinase: relationship to regulation of hexokinase activity by antagonistic interactions between glucose 6-phosphate and inorganic phosphate. *Arch Biochem Biophys* 1990 Feb 15;277:26–34.
32. Wilson JE: Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol* 2003 Jun;206:2049–2057.
33. Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N: Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev* 2001 Jun 1;15:1406–1418.
34. Lawrence GM, Trayer IP: The localization of hexokinase isoenzymes in red and white skeletal muscles of the rat. *Histochem J* 1985 Mar;17:353–371.
35. John S, Weiss JN, Ribalet B: Subcellular localization of hexokinases I and II directs the metabolic fate of glucose. *PLoS One* 2011;6:e17674.
36. Southworth R, Davey KAB, Warley A, Garlick PB: A reevaluation of the roles of hexokinase I and II in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 Jan;292:H378–386.
37. Zuurbier CJ, Eerbeek O, Meijer AJ: Ischemic preconditioning, insulin, and morphine all cause hexokinase redistribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 Jul;289:H496–499.
38. Miyamoto S, Murphy AN, Brown JH: Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ* 2008 Mar;15:521–529.
39. Roberts DJ, Tan-Sah VP, Smith JM, Miyamoto S: Akt phosphorylates HK-II at Thr-473 and increases mitochondrial HK-II association to protect cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2013 Aug 16;288:23798–23806.
40. Bustamante E, Pedersen PL: Mitochondrial hexokinase of rat hepatoma cells in culture: solubilization and kinetic properties. *Biochemistry (Mosc)* 1980 Oct 28;19:4972–4977.
41. Bustamante E, Pedersen PL: High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977 Sep;74:3735–3739.

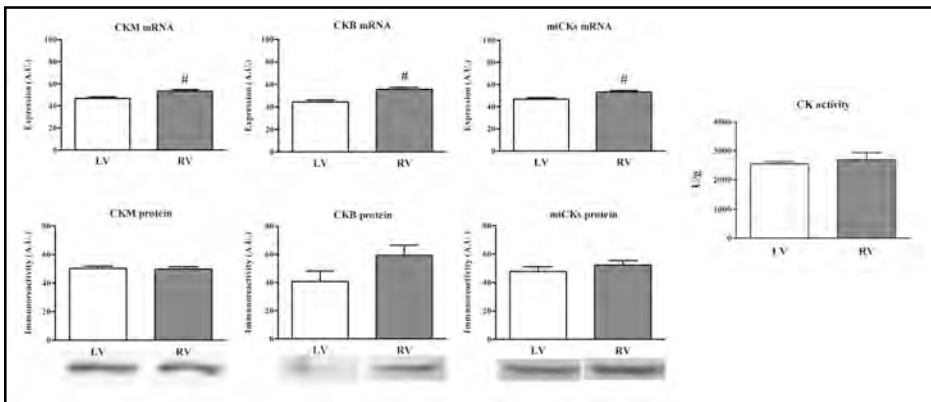
42. Bustamante E, Morris HP, Pedersen PL: Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. *J Biol Chem* 1981 Aug 25;256:8699–8704.
43. Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB: Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 2002 Mar 1;277:7610–7618.
44. Azoulay-Zohar H, Israelson A, Abu-Hamad S, Shoshan-Barmatz V: In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem J* 2004 Jan 15;377:347–355.
45. Beutner G, Rück A, Riede B, Brdiczka D: Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta* 1998 Jan 5;1368:7–18.
46. da-Silva WS, Gómez-Puyou A, de Gómez-Puyou MT, Moreno-Sanchez R, De Felice FG, de Meis L, et al.: Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *J Biol Chem* 2004 Sep 17;279:39846–39855.
47. Meyer LE, Machado LB, Santiago APSA, da-Silva WS, De Felice FG, Holub O, et al.: Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity. *J Biol Chem* 2006 Dec 8;281:37361–37371.
48. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001 May 1;29:e45.
49. Units of Enzyme Activity. *Eur J Biochem* 1979;97:319–320.
50. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al.: Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012 Jul;9:676–682.
51. Li Q, Lau A, Morris TJ, Guo L, Fordyce CB, Stanley EF: A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2004 Apr 21;24:4070–4081.
52. Adler J, Pagakis SN, Parmryd I: Replicate-based noise corrected correlation for accurate measurements of colocalization. *J Microsc* 2008 Apr;230:121–133.
53. Drake JI, Bogaard HJ, Mizuno S, Clifton B, Xie B, Gao Y, et al.: Molecular signature of a right heart failure program in chronic severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011 Dec;45:1239–1247.
54. Bondy CA, Cheng CM: Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *Eur J Pharmacol* 2004 Apr 19;490:25–31.
55. Cheng CM, Reinhardt RR, Lee WH, Joncas G, Patel SC, Bondy CA: Insulin-like growth factor 1 regulates developing brain glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Aug 29;97:10236–10241.
56. Sebastian S, Kenkare UW: Insulin-like growth factor I induces tumor hexokinase RNA expression in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Jun 18;235:389–393.
57. Phillips D, Aponte AM, Covian R, Neufeld E, Yu Z-X, Balaban RS: Homogenous protein programming in the mammalian left and right ventricle free walls. *Physiol Genomics* 2011 Nov 7;43:1198–1206.

58. Ebrecht G, Rupp H, Jacob R: Alterations of mechanical parameters in chemically skinned preparations of rat myocardium as a function of isoenzyme pattern of myosin. *Basic Res Cardiol* 1982 Apr;77:220–234.
59. Pope B, Hoh JF, Weeds A: The ATPase activities of rat cardiac myosin isoenzymes. *FEBS Lett* 1980 Sep 8;118:205–208.
60. Schwartz K, Lompre AM, Bouveret P, Wisnewsky C, Whalen RG: Comparisons of rat cardiac myosins at fetal stages in young animals and in hypothyroid adults. *J Biol Chem* 1982 Dec 10;257:14412–14418.
61. Brooks WW, Bing OH, Blaustein AS, Allen PD: Comparison of contractile state and myosin isozymes of rat right and left ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1987 May;19:433–440.
62. Sharma S, Razeghi P, Shakir A, Keneson BJ 2nd, Clubb F, Taegtmeier H: Regional heterogeneity in gene expression profiles: a transcript analysis in human and rat heart. *Cardiology* 2003;100:73–79.
63. Zuurbier CJ, Smeele KMA, Eerbeek O: Mitochondrial hexokinase and cardioprotection of the intact heart. *J Bioenerg Biomembr* 2009 Apr;41:181–185.
64. Ahmad A, Ahmad S, Schneider BK, Allen CB, Chang L-Y, White CW: Elevated expression of hexokinase II protects human lung epithelial-like A549 cells against oxidative injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002 Sep;283:L573–584.
65. Chiara F, Castellaro D, Marin O, Petronilli V, Brusilow WS, Juhaszova M, et al.: Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels. *PLoS One* 2008;3:e1852.
66. Sun L, Shukair S, Naik TJ, Moazed F, Ardehali H: Glucose phosphorylation and mitochondrial binding are required for the protective effects of hexokinases I and II. *Mol Cell Biol* 2008 Feb;28:1007–1017.
67. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, et al.: Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 1996 Dec 2;15:6541–6551.
68. Parra J, Brdiczka D, Cusso R, Pette D: Enhanced catalytic activity of hexokinase by work-induced mitochondrial binding in fast-twitch muscle of rat. *FEBS Lett* 1997 Feb 24;403:279–282.
69. Bass A, Stejskalová M, Ostádal B, Samánek M: Differences between atrial and ventricular energy-supplying enzymes in five mammalian species. *Physiol Res Acad Sci Bohemoslov* 1993;42:1–6.
70. Daneshrad Z, Garcia-Riera MP, Verdys M, Rossi A: Differential responses to chronic hypoxia and dietary restriction of aerobic capacity and enzyme levels in the rat myocardium. *Mol Cell Biochem* 2000 Jul;210:159–166.
71. Rumsey WL, Abbott B, Bertelsen D, Mallamaci M, Hagan K, Nelson D, et al.: Adaptation to hypoxia alters energy metabolism in rat heart. *Am J Physiol* 1999 Jan;276:H71–80.
72. Nouette-Gaulain K, Malgat M, Rocher C, Savineau J-P, Marthan R, Mazat J-P, et al.: Time course of differential mitochondrial energy metabolism adaptation to chronic hypoxia in right and left ventricles. *Cardiovasc Res* 2005 Apr 1;66:132–140.
73. Wiesner RJ, Hornung TV, Garman JD, Clayton DA, O’Gorman E, Wallimann T: Stimulation of mitochondrial gene expression and proliferation of mitochondria following

- impairment of cellular energy transfer by inhibition of the phosphocreatine circuit in rat hearts. *J Bioenerg Biomembr* 1999 Dec;31:559–567.
74. Kay L, Nicolay K, Wieringa B, Saks V, Wallimann T: Direct evidence for the control of mitochondrial respiration by mitochondrial creatine kinase in oxidative muscle cells in situ. *J Biol Chem* 2000 Mar 10;275:6937–6944.
 75. Saks VA, Kuznetsov AV, Kupriyanov VV, Miceli MV, Jacobus WE: Creatine kinase of rat heart mitochondria. The demonstration of functional coupling to oxidative phosphorylation in an inner membrane-matrix preparation. *J Biol Chem* 1985 Jun 25;260:7757–7764.
 76. Essop MF: Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *J Physiol* 2007 Nov 1;584:715–726.
 77. Chida K, Tsunenaga M, Kasahara K, Kohno Y, Kuroki T: Regulation of creatine phosphokinase B activity by protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 Nov 30;173:346–350.
 78. Hemmer W, Riesinger I, Wallimann T, Eppenberger HM, Quest AF: Brain-type creatine kinase in photoreceptor cell outer segments: role of a phosphocreatine circuit in outer segment energy metabolism and phototransduction. *J Cell Sci* 1993 Oct;106 (Pt 2):671–683.
 79. Quest AF, Soldati T, Hemmer W, Perriard JC, Eppenberger HM, Wallimann T: Phosphorylation of chicken brain-type creatine kinase affects a physiologically important kinetic parameter and gives rise to protein microheterogeneity in vivo. *FEBS Lett* 1990 Sep 3;269:457–464.
 80. Qin W, Khuchua Z, Cheng J, Boero J, Payne RM, Strauss AW: Molecular characterization of the creatine kinases and some historical perspectives. *Mol Cell Biochem* 1998 Jul;184:153–167.
 81. Holden JE, Stone CK, Clark CM, Brown WD, Nickles RJ, Stanley C, et al.: Enhanced cardiac metabolism of plasma glucose in high-altitude natives: adaptation against chronic hypoxia. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 1995 Jul;79:222–228.
 82. Holmes BF, Kurth-Kraczek EJ, Winder WW: Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 1999 Nov;87:1990–1995.
 83. Hoggett JG, Kellett GL: Kinetics of the monomer-dimer reaction of yeast hexokinase PI. *Biochem J* 1992 Oct 15;287 (Pt 2):567–572.
 84. Mungai PT, Waypa GB, Jairaman A, Prakriya M, Dokic D, Ball MK, et al.: Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species-mediated activation of calcium release-activated calcium channels. *Mol Cell Biol* 2011 Sep;31:3531–3545.
 85. Stoppani J, Hildebrandt AL, Sakamoto K, Cameron-Smith D, Goodyear LJ, Neuffer PD: AMP-activated protein kinase activates transcription of the UCP3 and HKII genes in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002 Dec;283:E1239–1248.
 86. Ponticos M, Lu QL, Morgan JE, Hardie DG, Partridge TA, Carling D: Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *EMBO J* 1998 Mar 16;17:1688–1699.
 87. Pasdois P, Parker JE, Halestrap AP: Extent of mitochondrial hexokinase II dissociation during ischemia correlates with mitochondrial cytochrome c release, reactive oxygen species production, and infarct size on reperfusion. *J Am Heart Assoc* 2013 Feb;2:e005645.

88. Riddle SR, Ahmad A, Ahmad S, Deeb SS, Malkki M, Schneider BK, et al.: Hypoxia induces hexokinase II gene expression in human lung cell line A549. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000 Feb;278:L407–416.
89. Rodriguez A, De La Cera T, Herrero P, Moreno F: The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 2001 May 1;355:625–631.
90. Waskova-Arnostova P, Elsnicova B, Kasparova D, Sebesta O, Novotny J, Neckar J, et al.: Right-to-left ventricular differences in the expression of mitochondrial hexokinase and phosphorylation of Akt. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 2013;31:66–79.
91. Letout A, Solares-Espinoza M, Mateo P, Koulmann N, Bahi L, Serrurier B, et al.: Adaptive changes in cardiac myosin heavy chain and creatine kinase isozymic profiles in rats native of altitude. *Acta Physiol Scand* 2005 Jun;184:95–104.
92. Pissarek M, Bigard X, Mateo P, Guezennec CY, Hoerter JA: Adaptation of cardiac myosin and creatine kinase to chronic hypoxia: role of anorexia and hypertension. *Am J Physiol* 1997 Apr;272:H1690–1695.
93. Strniskova M, Ravingerova T, Neckar J, Kolar F, Pastorekova S, Barancik M: Changes in the expression and/or activation of regulatory proteins in rat hearts adapted to chronic hypoxia. *Gen Physiol Biophys* 2006 Mar;25:25–41.

16. PŘÍLOHA/SUPPLEMENT

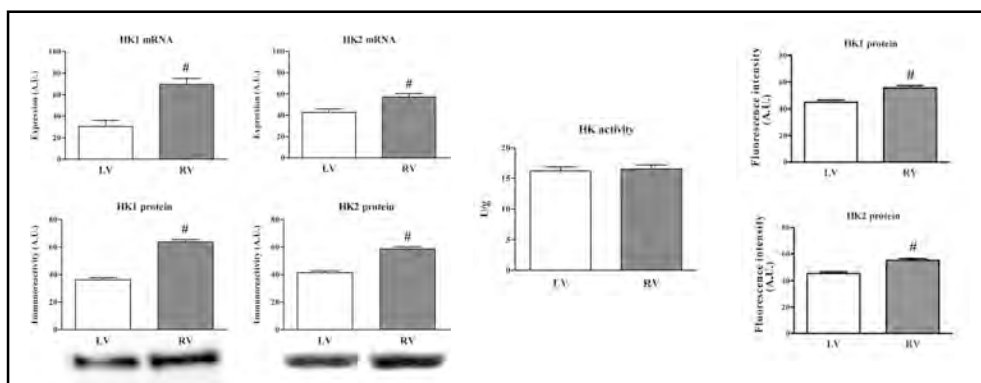


Obr. 1: Hladiny mRNA a proteinů isoformů CK a celková aktivita CK v levé (LV) a pravé (RV) normoxické komoře. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm S.E.M. ($n=5$). # $P < 0.05$ vs. LV.

Fig. 1: The expression of CK isoforms and the total CK activity in the normoxic left (LV) and right (RV) ventricles. Values are mean \pm S.E.M. ($n=5$). # $P < 0.05$ vs. LV.

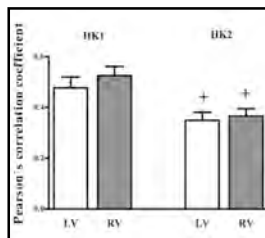
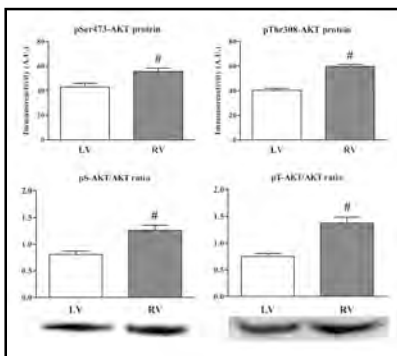
Obr. 2: Hladiny mRNA a proteinů isoformů HK ($n=10$), celková aktivita HK ($n=5$) a intenzita fluorescenčního signálu isoformů HK ($n=6$) v levé (LV) a pravé (RV) normoxické komoře. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm S.E.M. # $P < 0.05$ vs. LV.

Fig. 2: The expression of HK isoforms ($n=10$), the total HK activity ($n=5$), and the fluorescence intensity of HK isoforms ($n=6$) in the normoxic left (LV) and right (RV) ventricles. Values are mean \pm S.E.M. # $P < 0.05$ vs. LV.



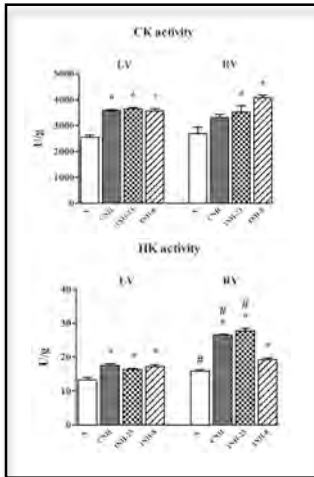
Obr. 3: Hladiny proteinů fosforylovaných AKT (Ser473 a Thr308) a poměr fosforylovaných forem AKT ku nefosforylovaným v levé (LV) a pravé (RV) normoxické komoře. Hodnoty jsou vyjádřeny jako \pm S.E.M. ($n=10$). # $P < 0.05$ vs. LV.

Fig. 3: The protein levels of phosphorylated AKT (Ser473 and Thr308) and the ratio of phosphorylated to non-phosphorylated AKT in the normoxic left (LV) and right (RV). Values are mean \pm S.E.M. ($n=10$). # $P < 0.05$ vs. LV.



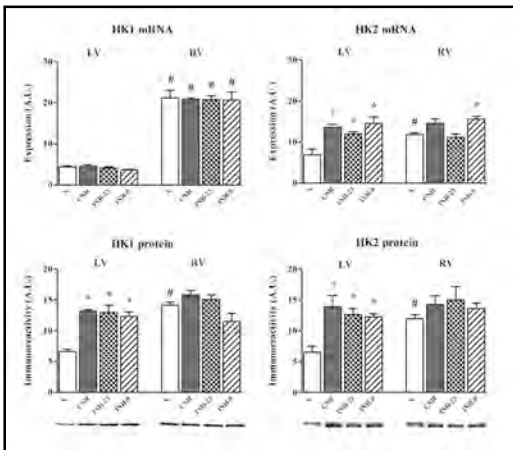
Obr. 4: Pearsonův korelační koeficient vyjadřující míru kolokalizace HK1 a HK2 s mitochondriemi v levé (LV) a pravé (RV) normoxické komoře. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm S.E.M. + $P < 0.05$ vs. HK1.

Fig. 4: The Pearson's correlation coefficient indicating the co-localization of HK1 and HK2 with mitochondria in the normoxic left (LV) and right (RV) ventricles. Values are mean \pm S.E.M. + $P < 0.05$ vs. HK1.



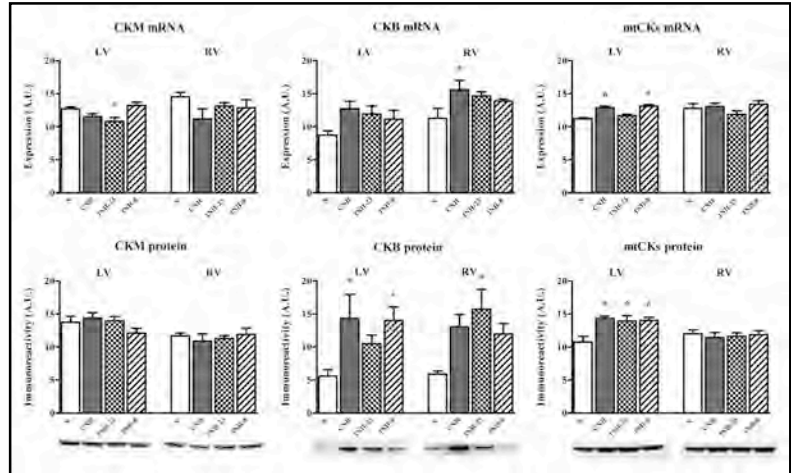
Obr. 5: Celková aktivita CK a HK v levé (LV) a pravé (RV) komoře normoxických (N) potkanů a potkanů adaptovaných na kontinuální normobarickou hypoxii (CNH), na intermitentní normobarickou hypoxii 23h denně (INH-23) a intermitentní normobarickou hypoxii 8h denně (INH-8). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm S.E.M. ($n=5$). * $P < 0.05$ vs. N, # $P < 0.05$ vs. odpovídající LV.

Fig. 5: The total CK and HK activity in the left (LV) and right (RV) ventricles from normoxic (N) rats and rats adapted to continuous normobaric hypoxia (CNH), intermittent normobaric hypoxia 23h/day (INH-23), and intermittent normobaric hypoxia 8h/day (INH-8). Values are mean \pm S.E.M. ($n=5$). * $P < 0.05$ vs. N, # $P < 0.05$ vs. corresponding LV.



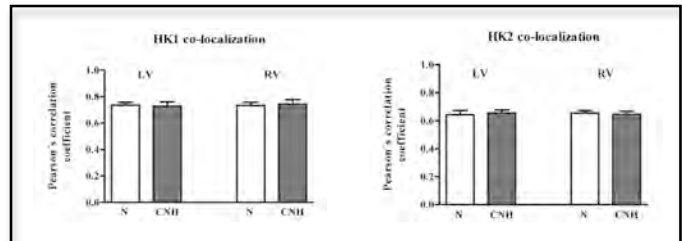
Obr. 7: Hladiny mRNA a proteinů isoforem HK v levé (LV) a pravé (RV) komoře normoxických (N) potkanů a potkanů adaptovaných na kontinuální normobarickou hypoxii (CNH), na intermitentní normobarickou hypoxii 23h denně (INH-23) a intermitentní normobarickou hypoxii 8h denně (INH-8). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm S.E.M. ($n=5$). * $P < 0.05$ vs. N, # $P < 0.05$ vs. odpovídající LV.

Fig. 7: The expression of HK isoforms in the left (LV) and right (RV) ventricles from normoxic (N) rats and rats adapted to continuous normobaric hypoxia (CNH), intermittent normobaric hypoxia 23h/day (INH-23), and intermittent normobaric hypoxia 8h/day (INH-8). Values are mean \pm S.E.M. ($n=5$). * $P < 0.05$ vs. N, # $P < 0.05$ vs. corresponding LV.



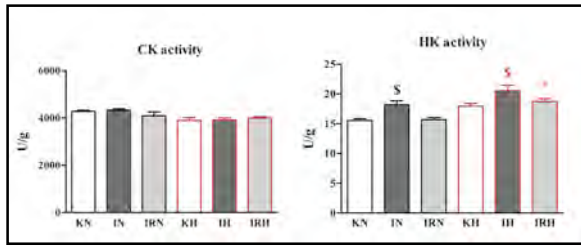
Obr. 6: Hladiny mRNA a proteinů isoforem CK v levé (LV) a pravé (RV) komoře normoxických (N) potkanů a potkanů adaptovaných na kontinuální normobarickou hypoxii (CNH), na intermitentní normobarickou hypoxii 23h denně (INH-23) a intermitentní normobarickou hypoxii 8h denně (INH-8). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm S.E.M. ($n=5$). * $P < 0.05$ vs. N, # $P < 0.05$ vs. odpovídající LV.

Fig. 6: The expression of CK isoforms in the left (LV) and right (RV) ventricles from normoxic (N) rats and rats adapted to continuous normobaric hypoxia (CNH), intermittent normobaric hypoxia 23h/day (INH-23), and intermittent normobaric hypoxia 8h/day (INH-8). Values are mean \pm S.E.M. ($n=5$). * $P < 0.05$ vs. N, # $P < 0.05$ vs. corresponding LV.



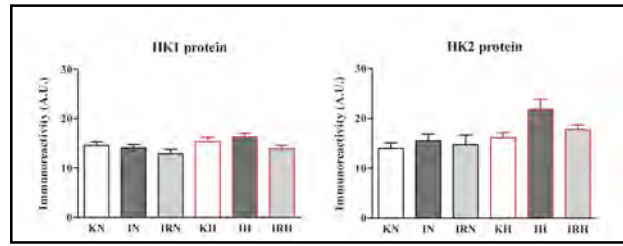
Obr. 8: Pearsonův korelační koeficient vyjadřující míru kolokalizace HK1 a HK2 s mitochondriemi v levé (LV) a pravé (RV) komoře normoxických (N) potkanů a potkanů adaptovaných na kontinuální normobarickou hypoxii (CNH). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm S.E.M. ($n=6$).

Fig. 8: The Pearson's correlation coefficient indicating the co-localization of HK1 and HK2 with mitochondria in the left (LV) and right (RV) ventricles from normoxic (N) rats and rats adapted to continuous normobaric hypoxia (CNH). Values are mean \pm S.E.M. ($n=6$).



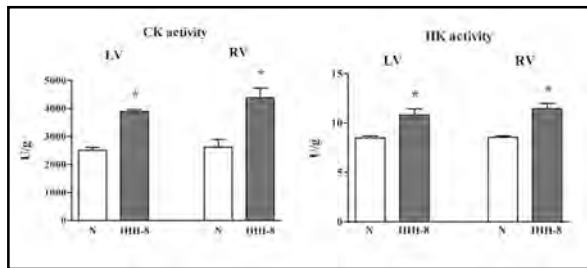
Obr. 9: Celková aktivita CK a HK v levé (LV) komoře srdce z normoxických (N) potkanů a potkanů adaptovaných na kontinuální hypoxii (CNH), které bylo perfundováno (KN, KH), vystaveno ischemii (IN, IH) a I/R inzultu (IRN, IRH). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M. (n=6). ^S $P < 0.05$ vs. KN, ^S $P < 0.05$ vs. KH, * $P < 0.05$ vs. odpovídající normoxická skupina.

Fig. 9: The total CK and HK activity in the left (LV) ventricle myocardium from normoxic (N) rats and rats adapted to continuous hypoxia (CNH), which was perfused (KN, KH), subjected to ischemia (IN, IH) and I/R insult (IRN, IRH). Values are mean ± S.E.M. (n=6). ^S $P < 0.05$ vs. KN, ^S $P < 0.05$ vs. KH, * $P < 0.05$ vs. corresponding normoxic group.



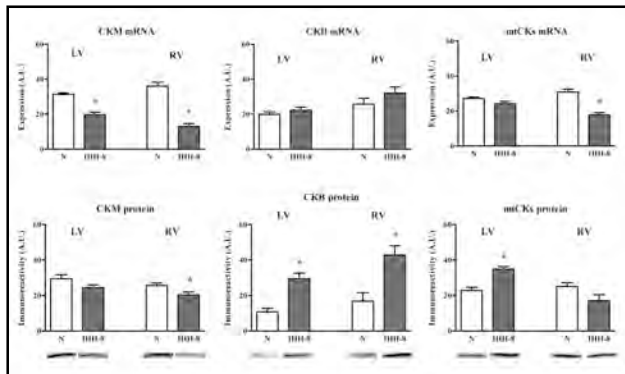
Obr. 10: Hladiny proteinů isoformů HK v levé (LV) komoře srdce z normoxických (N) potkanů a potkanů adaptovaných na kontinuální hypoxii (CNH), které bylo perfundováno (KN, KH), vystaveno ischemii (IN, IH) a I/R inzultu (IRN, IRH). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M. (n=6).

Fig. 10: The expression of HK isoforms in the left (LV) ventricle myocardium from normoxic (N) rats and rats adapted to continuous hypoxia (CNH), which was perfused (KN, KH), subjected to ischemia (IN, IH) and I/R insult (IRN, IRH). Values are mean ± S.E.M. (n=6).



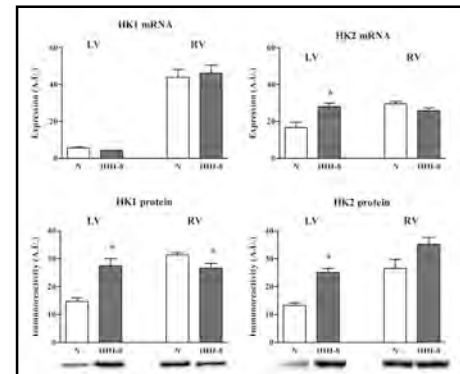
Obr. 11: Celková aktivita CK a HK v levé (LV) a pravé (RV) komoře normoxických (N) potkanů a potkanů adaptovaných na intermitentní hypobarickou hypoxii 8h denně (IHH-8). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M. (n=5). * $P < 0.05$ vs. N.

Fig. 11: The total CK and HK activity in the left (LV) and right (RV) ventricles from normoxic (N) rats and rats adapted to intermittent hypobaric hypoxia 8h/day (IHH-8). Values are mean ± S.E.M. (n=5). * $P < 0.05$ vs. N.



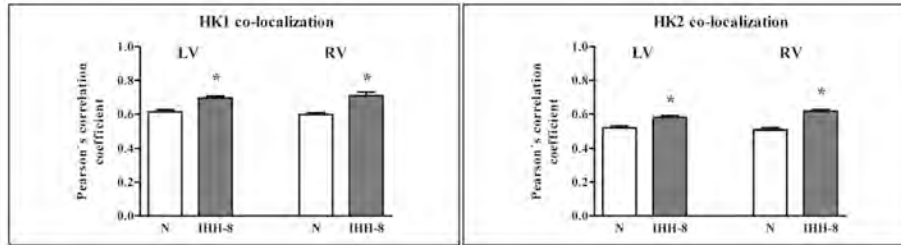
Obr. 12: Hladiny mRNA a proteinů isoformů CK v levé (LV) a pravé (RV) komoře normoxických (N) potkanů a potkanů adaptovaných na intermitentní hypobarickou hypoxii 8h denně (IHH-8). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M. (n=5). * $P < 0.05$ vs. N.

Fig. 12: The expression of CK isoforms in the left (LV) and right (RV) ventricles from normoxic (N) rats and rats adapted to intermittent hypobaric hypoxia 8h/day (IHH-8). Values are mean ± S.E.M. (n=5). * $P < 0.05$ vs. N.



Obr. 13: Hladiny mRNA a proteinů isoformů HK v levé (LV) a pravé (RV) komoře normoxických (N) potkanů a potkanů adaptovaných na intermitentní hypobarickou hypoxii 8h denně (IHH-8). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M. (n=5). * $P < 0.05$ vs. N.

Fig. 13: The expression of HK isoforms in the left (LV) and right (RV) ventricles from normoxic (N) rats and rats adapted to intermittent hypobaric hypoxia 8h/day (IHH-8). Values are mean ± S.E.M. (n=5). * $P < 0.05$ vs. N.

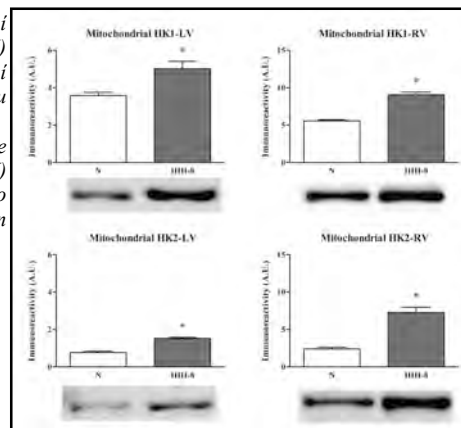


Obr. 14: Pearsonův korelační koeficient vjadřující míru kolokalizace HK1 a HK2 s mitochondriemi v levé (LV) a pravé (RV) komoře normoxických (N) potkanů a potkanů adaptovaných na intermitentní hypobarickou hypoxii 8h denně (IHH-8). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M. (n=6). * $P < 0.05$ vs. N.

Fig. 14: The Pearson's correlation coefficient indicating the co-localization of HK1 and HK2 with mitochondria in the left (LV) and right (RV) ventricles from normoxic (N) rats and rats adapted to intermittent hypobaric hypoxia 8h/day (IHH-8). Values are mean ± S.E.M. (n=6). * $P < 0.05$ vs. N.

Obr. 15: Hladiny proteinů HK1 a HK2 v mitochondriální frakci z levé (LV) a pravé (RV) komory normoxických (N) potkanů a potkanů adaptovaných na intermitentní hypobarickou hypoxii 8h denně (IHH-8). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M. (n=5). * $P < 0.05$ vs. N.

Fig. 15: The protein levels of HK1 and HK2 in the mitochondrial fraction from the left (LV) and right (RV) ventricles of normoxic (N) rats and from rats adapted to intermittent hypobaric hypoxia (IHH-8). Values are mean ± S.E.M. (n = 5). * $P < 0.05$ vs. N.



17. SEZNAM PUBLIKACÍ/LIST OF PUBLICATIONS

1. Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace/Publications *in extenso* related to the Dissertation

a) s impakt faktorem/with an impact factor

Waskova-Arnostova P, Kasparova D, Elsnicova B, Novotny J, Neckar J, Kolar F, Zurmanova J. Chronic hypoxia enhances expression and activity of mitochondrial creatine kinase and hexokinase in the rat ventricular myocardium. *Cell Physiol Biochem*. 2014;33(2):310-20. doi: 10.1159/000356671. Epub 2014 Jan 31. (IF = 3.415)

Waskova-Arnostova P, Elsnicova B, Kasparova D, Sebesta O, Novotny J, Neckar J, Kolar F, Zurmanova J. Right-to-left ventricular differences in the expression of mitochondrial hexokinase and phosphorylation of Akt. *Cell Physiol Biochem*. 2013;31(1):66-79. doi: 10.1159/000343350. Epub 2013 Jan 22. (IF = 3.415)

2. Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace/Publications *in extenso* unrelated to the Dissertation

a) s impakt faktorem/with an impact factor

Radosinska J, Bacova B, Knezi V, Benova T, Zurmanova J, Soukup T, **Arnostova P**, Slezak J, Gonçalvesova E, Tribulova N. Dietary omega-3 fatty acids attenuate myocardial arrhythmogenic factors and propensity of the heart to lethal arrhythmias in a rodent model of human essential hypertension. *J Hypertens*. 2013;31(9):1876-85. doi: 10.1097/HJH.0b013e328362215d. (IF = 3.806)

Arnostova P, Jedelsky PL, Soukup T, Zurmanova J. Electrophoretic mobility of cardiac myosin heavy chain isoforms revisited: application of MALDI TOF/TOF analysis. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:634253. doi: 10.1155/2011/634253. Epub 2011 Nov 30. (IF = 2.88)

18. ŽIVOTOPIS/CURRICULUM VITAE

Mgr. Petra Wasková

Email: petra.waskova@gmail.com

VZDĚLÁNÍ

- 2008 – dosud Univerzita Karlova – Přírodovědecká fakulta, postgraduální studium (**Ph.D.**), obor Fyziologie živočichů, téma **disertační práce**: *Úloha mitochondriální kreatinkinázy a hexokinázy v mechanismech kardioprotektivního působení chronické hypoxie*. Školitel: RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.
- 2006 – 2008 Univerzita Karlova – Přírodovědecká fakulta, magisterský obor Fyziologie živočichů, **diplomová práce**: *Identifikace a kvantifikace těžkých řetězců myosinu v srdci u samců a samic potkana pod vlivem tyroidních hormonů*. Školitel: RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.
- 2003 – 2006 Univerzita Karlova – Přírodovědecká fakulta, bakalářský obor Biologie, **bakalářská práce**: *Vliv tyroidních hormonů na fenotyp kosterní a srdeční svaloviny u samců a samic potkana*. Školitel: RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

VÝZKUMNÁ ČINNOST

- 2014 – dosud **Vědecký pracovník** na oddělení Vývojové kardiologie, Fyziologický ústav, Akademie věd ČR, Prof. František Kolář, C.Sc.
- 2009 – 2013 **Vědecký pracovník** na Katedře fyziologie, Přírodovědecká fakulta UK, doc. Jiří Novotný, D.Sc.
- 2011– 2011 **Výzkumná stáž** zaměřená na studium funkce Mitochondriální kreatinkinázy metodou RNA interference (RNAi) na americké univerzitě Northern Illinois University (USA), Department of Biological Sciences, Prof. Barrie P. Bode, Ph.D.
- 2010 – 2010 **Výzkumná stáž** zaměřená na metodu RNA interference (RNAi) na americké univerzitě Northern Illinois University (USA), Plant Molecular Biology Center, Prof. Thomas L. Sims, Ph.D.
- 2008 – 2008 **Odborná spolupráce** (vědecká posila) s Northern Illinois University (USA), Plant Molecular Biology Center, Prof. Thomas L. Sims, Ph.D.
- 2004 – 2008 **Odborná spolupráce** (studentská posila) s Fyziologickým ústavem Akademie věd ČR, oddělení Funkční morfologie, RNDr. Tomáš Soukup, C.Sc.

GRANTOVÉ PROJEKTY

Hlavní řešitel:

- 2013 – 2013 GA UK 349211 – Úloha isoformů hypoxií indukovaného faktoru HIF α a jejich regulačních proteinů v kardioprotektivním působení akutní a chronické hypoxie.
- 2010 – 2012 GA UK 19010 – Úloha mitochondriální kreatinkinázy a hexokinázy v mechanismech kardioprotektivního působení chronické hypoxie.

Člen řešitelských kolektivů:

- 2013 – dosud GA UK 542113 – Úloha Akt kinázy v kardioprotektivních mechanismech chronické hypoxie.
- 2009 – 2013 GA AV ČR IAAX01110901 – Úloha adrenergní signalizace a oxidativního stresu v molekulárních mechanismech kardioprotektivního působení chronické hypoxie.
- 2009 – 2013 GA AV ČR IAA601110908 – Genová exprese a počet genových kopií u etologicky významných savčích genů.

OCENĚNÍ A STIPENDIA

- 2013 Katedra fyziologie, PřF UK: **Cena za nejlepší výsledky a aktivitu v rámci doktorského programu fyziologie živočichů** v akademickém roce 2013/2014.
- 2012 Nadace „Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových“: **Cestovní stipendium** na mezinárodní konferenci 5th MiP Summer School meeting, Cambridge, Velká Británie.
- 2012 České fyziologická společnost: **Cena za 2. místo v soutěži o nejlepší přednášku** v rámci konference 88. Fyziologické dny, Hradce Králové.
- 2011 Fond mobility UK: **Stipendium na výzkumný pobyt na zahraniční univerzitě** Northern Illinois University, Illinois, USA.
- 2011 International Society for Heart Research European Section Council: **Stipendium** k účasti na mezinárodní konferenci XXX ISHR European Section Meeting, Haifa, Izrael.
- 2011 Nadace „Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových“: **Cestovní stipendium** na mezinárodní konferenci XXX ISHR European Section Meeting, Haifa, Izrael.
- 2011 Katedra fyziologie, PřF UK: **Cena za nejlepší výsledky a aktivitu v rámci doktorského programu fyziologie živočichů** v akademickém roce 2010/2011.
- 2010 Fond mobility UK: **Stipendium na výzkumný pobyt na zahraniční univerzitě** Northern Illinois University, Illinois, USA.

PEDAGOGICKÁ ČINNOST

- 2010 – 2013 **výuka předmětů** *Praktikum z fyziologie živočichů a člověka (pro učitelské kombinace); Praktikum z fyziologie živočichů a člověka; Practical course in animal and human physiology*; Katedra fyziologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze.
- 2012 – 2013 **konzultant** diplomové práce *Úloha metabolismu laktátu v ischemicko-reperfučním poškození srdce potkana adaptovaného na chronickou hypoxii* (Bc. David Kolář).
- 2013 **oponent** bakalářské práce *Úloha RhoA/Rho kinázové signální dráhy v regulaci krevního tlaku u normotenzních a hypertenzních potkanů* (Aneta Brunová).
- 2010 **oponent** bakalářské práce *Úloha transportéru FAT/CD36 v patofyziologii srdce* (Jana Kovalčíková).

KONFERENCE

- 2014 The 11th New Frontiers in Basic Cardiovascular Research: France–New EU Members International meeting – poster: ***Effect of hypobaric hypoxia on mitochondrial hexokinases in the rat heart***, Smolenice (SK)
- 2013 KEK – konference Komise experimentální kardiologie – přednáška: ***Ischemic Insult Activates AKT/HK Signaling Pathway in Chronically Hypoxic Myocardium***, Valča (SK)
- 2012 The 5th MiP Summer School meeting – přednáška: ***Comparison of hexokinase expression in the left and right ventricle of male Wistar rats***, Cambridge (UK)
- 2012 Fyziologické dny – přednáška: ***Determination of Creatine Kinase and Hexokinase in the Rat Heart Ventricles: Effect of Chronic Hypoxia and Periodical Reoxygenation***, Hradec Králové
- 2011 XXX ISHR European Section Meeting – poster: ***Expression of mitochondrial creatine kinase and hexokinase is amplified in the rat heart adapted to chronic hypoxia***, Haifa (IL)
- 2011 Fyziologické dny – poster: ***Mitochondrial Creatine Kinase Expression is Amplified in the Rat Heart Adapted to Chronic Hypoxia***, Bratislava (SK)

- 2010 MouseGene konference – přednáška: *Expression and Enzymatic Activity of Creatine Kinase in the Rat Heart Adapted to Chronic Hypoxia*, Hrubá Skála
- 2010 KEK–konference Komise experimentální kardiologie – přednáška: *Expresa enzymatická aktivita kreatin kinázy v chronicky hypoxickém myokardu potkana: vliv délky denní expozice*, Dunajská Streda (SK)

M.Sc. Petra Wasková

Email: petra.waskova@gmail.com

EDUCATION

- Since 2008 Charles University in Prague – Faculty of Science, specialization in Animal Physiology – **Ph.D. Thesis:** *The role of mitochondrial creatine kinase and hexokinase in mechanisms of cardioprotection induced by chronic hypoxia.*
Supervisor: Dr. Jitka Zurmanova, Ph.D.
- 2006 – 2008 Charles University in Prague – Faculty of Science, specialization in Animal Physiology – **Diploma Thesis:** *Cardiac Myosin Heavy Chain Transition under Altered Thyroid Status.*
Supervisor: Dr. Jitka Zurmanova, Ph.D.
- 2003 – 2006 Charles University in Prague – Faculty of Science, specialization in Biology – **Bachelor Thesis:** *Phenotype Changes of Skeletal and Cardiac Muscle under Influence of Thyroid Hormones, at Male and Female Rats.*
Supervisor: Dr. Jitka Zurmanova, Ph.D.

RESEARCH EXPERIENCE

- Since 2014 **Student Researcher** at the Department of Developmental Cardiology, Institute of Physiology, Academy of Science of the Czech Republic, Department chair Prof. Frantisek Kolar, C.Sc.
- 2009 – 2013 **Student Researcher** at the Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Department chair Dr. Jiri Novotny, D.Sc.
- 2011 – 2011 **Research Internship:** Gene Silencing Project - siRNA experiments focused on the mitochondrial creatine kinase knockdown in L6 cells.
Northern Illinois University (IL, USA), Department of Biological Sciences, Supervisor Prof. Barrie P. Bode, Ph.D.
- 2010 – 2010 **Research Internship:** Gene Silencing Project – Cloning Methodology.
Northern Illinois University (IL, USA), Plant Molecular Biology Center, Supervisor Prof. Thomas L. Sims, PhD.
- 2008 – 2008 **Research Assistantship** at Northern Illinois University (IL, USA), Plant Molecular Biology Center, Supervisor Prof. Thomas L. Sims, PhD.
- 2004 – 2008 **Student Researcher** at Institute of Physiology, Academy of Science of the Czech Republic, Department of Functional Morphology, Supervisor Dr. Tomas Soukup, Ph.D.

GRANTS

Principal investigator:

- 2013 – 2013 Grant Agency of Charles University, CZ: no. 349211 – The role of hypoxia inducible factor isoforms HIF α and its regulating proteins in cardioprotective effect of acute and chronic hypoxia.

2010 – 2012 Grant Agency of Charles University, CZ: no. 19010 – The role of mitochondrial creatine kinase and hexokinase in mechanisms of cardioprotection induced by chronic hypoxia.

Team member:

Since 2013 Grant Agency of Charles University, CZ: no. 542113 – The role of Akt kinase in cardioprotective mechanisms of chronic hypoxia.

2009 – 2013 Grant Agency of Academy of Science, CZ: no. IAAX01110901 – The role of adrenergic signaling and oxidative stress in the molecular mechanisms of cardioprotective effects of chronic hypoxia.

2009 – 2013 Grant Agency of Academy of Science, CZ: no. IAA601110908 – Gene expression and gene copy number of the significant behavioral mammalian genes.

AWARDS

2013 Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague: **Best Results and Research Activity in the Doctorate Program Award.**

2012 Czech Physiological Society: **Top Three Presentations Award** (at the Physiological Days Conference, Hradec Kralove, CZE).

2012 Foundation of Josef, Marie and Zdenka Hlavka: **Travel Grant** for the 5th MiP Summer School Meeting held in Cambridge (UK).

2011 Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague: **Best Results and Research Activity in the Doctorate Program Award.**

2011 Mobility Fund of Charles University in Prague: **Funding Support** for the Internship at Northern Illinois University (DeKalb, IL, USA).

2011 International Society for Heart Research European Section Council: **Meeting Attendance Stipend** for the XXX ISHR European Section Meeting held in Haifa (IL).

2011 Foundation of Josef, Marie and Zdenka Hlavka: **Travel Grant** for the XXX ISHR European Section Meeting held in Haifa (IL).

2010 Mobility Fund of Charles University in Prague: **Funding Support** for the Internship at Northern Illinois University (DeKalb, IL USA).

ACADEMIC RELATED EXPERIENCE

2010 – 2013 **Teacher** of the *Practical course in animal and human physiology (in Czech and English)*, Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague.

2012 – 2013 **Adviser** of the Diploma thesis: *The role of lactate shuttle in ischemic-reperfusion injury of rat heart adapted to chronic hypoxia* (B.Sc. David Kolar)

2013 **Opponent** of the Bachelor thesis: *The role of RhoA/Rho kinase signaling pathway in the regulation of blood pressure in normotensive and in hypertensive rats* (Anta Brunova).

2010 **Opponent** of the Bachelor thesis: *The role of FAT/CD36 transporter in the pathophysiology of heart* (Jana Kovalcikova).

CONFERENCES

2014 The 11th New Frontiers in Basic Cardiovascular Research: France–New EU Members International meeting – poster: ***Effect of hypobaric hypoxia on mitochondrial hexokinases in the rat heart***, Smolenice (SK)

2013 KEK–Meeting of the Experimental Cardiology Working Group – talk: ***Ischemic Insult Activates AKT/HK Signaling Pathway in Chronically Hypoxic Myocardium***, Valca (SK)

- 2012 The 5th MiP Summer School meeting –talk: *Comparison of hexokinase expression in the left and right ventricle of male Wistar rats*, Cambridge (UK)
- 2012 Physiological Days – talk: *Determination of Creatine Kinase and Hexokinase in the Rat Heart Ventricles: Effect of Chronic Hypoxia and Periodical Reoxygenation*, Hradec Kralove (CZ)
- 2011 XXX ISHR European Section Meeting – poster: *Expression of mitochondrial creatine kinase and hexokinase is amplified in the rat heart adapted to chronic hypoxia*, Haifa (IL)
- 2011 Physiological Days – talk: *Mitochondrial Creatine Kinase Expression is Amplified in the Rat Heart Adapted to Chronic Hypoxia*, Bratislava (SVK)
- 2010 MouseGene Conference – talk: *Expression and Enzymatic Activity of Creatine Kinase in the Rat Heart Adapted to Chronic Hypoxia*, Hrubá Skála (CZ)
- 2010 KEK–Meeting of the Experimental Cardiology Working Group – talk: *Expression and Enzymatic Activity of Creatine Kinase in the Rat Heart Adapted to Chronic Hypoxia: Effect of Daily Exposure*, Dunajská Streda (SK)