

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie živočichů

Studijní program: Fyziologie živočichu



Mgr. Jana Kohútová

**Kardioprotektivní úloha adaptací na hypoxii a chlad:
Konexín 43 a hexokináza 2
Cardioprotective effect of adaptations to hypoxia and cold:
Connexin 43 and hexokinase 2**

Disertační práce

Vedoucí práce: RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne

.....
Jana Kohútová

Prohlášení

V zastoupení všech autorů prohlašuji, že se Mgr. Jana Kohútová podílela majoritním podílem na publikaci, která je stěžejní částí této disertační práce a odpovídajícím podílem se podílela na druhé publikaci. Tento podíl je prezentovaný ve výsledkové části disertační práce. Mgr. Jana Kohútová provedla většinu experimentů, které jsou součástí první publikace, a dále provedla všechny další experimenty, které jsou prezentované ve výsledkové části předložené disertační práce. Současně potvrzuji, že sepsala svoji prvoautorskou publikaci a podílela se na interpretaci všech prezentovaných dat.

V Praze, dne

.....

RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

Pod'akovanie

V prvom rade by som sa chcela poďakovať svojej školiteľke RNDr. Jitke Žurmanové, Ph.D. za odborné vedenie, pomoc a ochotu pri spracovaní dizertačnej práce, za cenné rady a pripomienky. Taktiež sa chcem poďakovať doc. RNDr. Olge Novákovej, CSc. za odborné konzultácie počas spisovania tejto práce.

Z radov svojich kolegov by som chcela poďakovať RNDr. Daniele Horníkovej, Ph.D. a RNDr. Barbare Elsnicovej, Ph.D. za pomoc s metodikou a vyhodnotením výsledkov. Ďalej, celej našej laborke svalovej fyziológie ďakujem za podporu a vytvorenie krásnej pracovnej atmosféry počas pokusov.

Veľmi pekne ďakujem taktiež celej svojej rodine, kamarátom a priateľovi, ktorí ma podporovali po celý čas môjho štúdia.

Tato práca vznikla za finančnej podpory Grantovej agentúry Univerzity Karlovej (GAUK 940216).

OBSAH

Abstrakt.....	7
Abstract.....	8
Zoznam skratiek.....	9
Zoznam obrázkov	12
Zoznam tabuliek	13
Zoznam publikácií	14
1 ÚVOD.....	15
2 LITERÁRNY PREHĽAD	18
2.1 Prehľad gap junction kanálov	18
2.1.1 Štruktúra konexínov	21
2.2 Regulácia gap junction kanálov	23
2.2.1 Životný cyklus konexínov	23
2.2.2 Otváranie Gap junction kanálov	27
2.2.3 Dôležitosť C-konca v regulácii konexínov	28
2.3 Fosforylácia konexínov	30
2.3.1 Serínové fosforylačné miesta	32
2.3.2 Tyrozínové fosforylačné miesta	38
2.4 Úloha Cx43 v patologických stavoch a v kardioprotekcii	39
2.5 Arytmie a konexíny	41
2.6 Kardioprotektívne účinky hypoxie.....	43
2.6.1 Úloha Cx43 u ischemiou indukovaných arytmií.....	45
2.7 Hexokináza v kardioprotekcii.....	46
2.8 Potenciálne protektívne účinky chladu	47
2.8.1 Adrenergná signalizácia v srdci a Cx43	48
2.8.2 Tyroidné hormóny a Cx43.....	50
3 HYPOTÉZA A CIELE PRÁCE	52
4 METODIKA A ADAPTÁCIE.....	53
4.1 Adaptácia na intermitentnú hypobarickú a kontinuálnu normobarickú hypoxiu	53

4.2 Akútna a chronická adaptácia na chlad	54
4.3 Odber tkaniva	54
4.4 Homogenizácia normoxických a hypoxických vzoriek	54
4.5 Homogenizácia vzoriek akútneho a chronického chladu	55
4.6 Imunofluorescencia	55
4.7 Analýza lipidov	58
4.8 SDS-PAGE elektroforéza a Western blot analýza	58
4.9 Hmotnostná spektrometria	61
4.10 RT-PCR	64
4.11 Štatistická analýza	68
5 VÝSLEDKY	69
5.1 Cx43 a hypoxia	69
5.2 Cx43 v srdci po adaptácii na chlad	80
6 DISKUSIA	87
6.1 Cx43 a hypoxia	87
6.2 Cx43, akútny a chronický chlad	92
7 ZÁVER	96
8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	98
Prílohy	118

Abstrakt

Ventrikulárne arytmie sú hlavnou príčinou úmrtí v celosvetovom meradle. Zvýšený výskyt arytmií v srdci cicavcov je sprevádzaný remodeláciou bunkovej distribúcie gap junction kanálov tvorených hlavne konexínom 43 (Cx43). V poslednej dobe sa preukazuje významný vplyv mitochondrií a ich asociácia s arytmogenezou. Za rôznych patologických stavov dochádza k zmene v expresii a/alebo distribúcii Cx43 v závislosti na fosforylačnom stave. Taktiež dochádza k zmene asociácie hexokinázy s mitochondriami, ktorá tak znižuje pravdepodobnosť aktivácie apoptózy. Adaptácia na intermitentnú hypobarickú hypoxiu potencuje endogénne ochranné cesty redukujúce výskyt ventrikulárnych arytmií, zatiaľ čo kontinuálna normobarická hypoxia tento efekt nemá. Ďalším študovaným modelom je aklimatizácia na chlad, ktorá je známa priaznivými účinkami na ľudské zdravie už niekoľko desaťročí. Avšak štúdie na srdci na týchto modeloch vo vzťahu ku Cx43 chýbajú. Naším cieľom bolo určiť expresiu Cx43, fosforylovaného Cx43 (p-Cx43) a hexokinázy (HK1, HK2), a ich distribúciu v kardiomyocytoch. Okrem toho bola analyzovaná expresia Cx43 upstream kináz, proteínkinázy A, proteínkinázy G, kazeínkinázy 1 v normoxických a hypoxických ľavých komorách potkanov spolu s distribúciou Cx43 počas krátkej ischemie a reperfúzneho poškodenia. Samce potkanov Wistar boli adaptované na hypoxiu (7 000 m, 8-h/deň, 5 týždňov alebo 10% kyslíka, 3 týždne) a následne boli špeciálne skupiny srdca vystavené krátkodobej ischemii (10 minút) a reperfúzii (15 minút) *in vivo*. Expresia a fosforylované stavy sa hodnotili pomocou špecifických protilátok a hmotnostnej spektrometrie. Distribúcia Cx43 v koncových *end to end* a v laterálnych spojeniach *side to side* bola hodnotená pomocou kvantitatívnej imunofluorescenčnej mikroskopie. Taktiež sme sa zamerali na určenie lokalizácie Cx43 na pozdĺžnych rezoch ľavej komory a expresie proteínu Cx43 u potkanov vystavených chladu (6 ± 1 °C) počas 3 dní, 10 dní, 5 týždňov a následne 2 týždne pri teplote 24 ± 1 °C. Naše výsledky naznačujú významný prínos v zmenách expresie a fosforylácie Cx43 v signalizačných dráhach, ktoré môžu byť zodpovedné za antiarytmický účinok súvisiaci s adaptáciou na hypobarickú hypoxiu. Po normobarickej hypoxii neboli preukázané zmeny a ponúkame možné zapojenie 5-týždňovej aklimatizácie na chlad do kardioprotektívnej dráhy.

Kľúčové slová: Potkan, Srdce, Chlad, Hypoxia, Konexín 43, Hexokináza

Abstract

Ventricular arrhythmias are the main cause of death worldwide. An increased incidence of arrhythmias in the heart of mammals is accompanied by a remodeling of the cellular distribution gap between the channels of mainly connexin 43 (Cx43). Recently has been demonstrated significant effect of mitochondria and their association with arrhythmogenesis. Various pathological conditions alter the expression and / or distribution of Cx43, depending on the phosphorylation status. but also on altering the association of hexokinase with mitochondria, which reduces the likelihood of apoptosis activation. Adaptation to intermittent hypobaric hypoxia potentiates endogenous pathways reducing the incidence of ventricular arteries, whereas continuous normobaric hypoxia does not have this effect. Another studied model is cold acclimatization, which has been known for several decades by known effects on human health. However, the heart study of these models in relation to Cx43 is missing. Our goal was to determine the expression of Cx43, phosphorylated Cx43 (p-Cx43) and hexokinase (HK1, HK2) and their distribution in cardiomyocytes. In addition, the expression of Cx43 upstream kinases, protein kinase A, protein kinase G, casein kinase 1 in normoxic and hypoxic left ventricles of rats, along with Cx43 distribution during short ischemia and reperfusion injury was analyzed. Male Wistar rats were adapted to hypoxia (7 000 m, 8 hours/day, 5 weeks or 10% oxygen, 3 weeks), and then special groups of the heart were exposed to short-term ischemia (10 min) and reperfusion (15 min) *in vivo*. Expression and phosphorylation are assessed by specific antibodies and mass spectrometry. The Cx43 distribution at *end to end* and *side to side* longitudinal junctions were evaluated by quantitative immunofluorescence microscopy. Cx43 on longitudinal sections of the left ventricle and protein expression of Cx43 exposed to cold ($6 \pm 1^\circ \text{C}$) for 3 days, 10 days, 5 weeks and then 2 weeks at $24 \pm 1^\circ \text{C}$. Our results indicate significant benefit in changes in expression and Cx43 phosphorylation in signaling pathways that may be responsible for the antiarrhythmic effect associated with adaptation to hypobaric hypoxia. No changes have been demonstrated after normobaric hypoxia and offer the possibility of 5-week acclimation to cold to the cardioprotective pathway.

Key words: Rat, Heart, Cold, Hypoxia, Connexin 43, Hexokinase

Zoznam skratiek

AA	Kyselina arachidonová
AC	Adenylcykláza
ADP	Adenozindifosfát
Akt	Proteín kináza B
ATP	Adenozíntrifosfát
BAT	Hnedé tukové tkanivo
β -AR	β -adrenergné receptory
°C	Stupeň Celsia
cAMP	Cyklický adenozínmonofosfát
CaM	Kalmodulín
cGMP	Cyklický guanozínmonofosfát
C-koniec	Karboxylový koniec
CNH	Kontinuálna normobarická hypoxia
cPLA ₂	Cytozólová fosfolipáza A ₂
CK 1	Kazeínkináza 1
Cx	Konexíny
Cx 43	Konexín 43
DAG	Diacylglycerol
D1, D2, D3	Iódtyronín diodínáza 1, 2, 3
EGF	Epidermálny rastový faktor
E1-E2	Extracelulárne slučky 1 a 2
ER	Endoplazmatické retikulum
ERAD	Degradácia spojená s ER
ERK	Extracelulárne signálne regulovaná proteín kináza
HK1, HK2	Hexokináza 1, 2
Gi	G-proteíny inhibičné

GC	Guanylylcykláza
GJ	Gap junction
GPCR	Receptory viazané s G-proteínmi
Gs	G-proteíny stimulačné
CH	Chronický chlad
IHH	Intermitentná hypobarická hypoxia
I/R	Ischemicko-reperfúzne
K	Kontrola
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogénom aktivovaná proteínkináza
M1-M4	Transmembránové oblasti 1, 2, 3, a 4
N	Normoxia
N-koniec	Aminový koniec
NO	Oxid dusnatý
NP	Nátriuretický peptid
n-3 PUFA	n-3 polynásytené mastné kyseliny
p-Cx43	Fosforylovaný Cx43
pGC	Partikulárna guanylylcykláza
PI3	Fosfatidylinozitol-3-kináza
PKA	Proteínkináza A
PKC	Proteínkináza C
PKC ϵ	Proteínkináza Cepsilon
PKC δ	Proteínkináza Cdelta
PKG	Proteínkináza G
R	Regresia
sGC	Solubilná guanylylcykláza
SH2	Src homológia 2
SH3	Src homológia 3

Src	Tyrozín proteín kináza transformujúca proteín Src
TH	Tyroidné hormóny
TPA	12-O-tetradekanoylforbol 13 acetát
T3	Triódtyronín
VDAC	Napät'ovo závislý aniontový kanál
ZO-1	Zonula occludens 1
WB	Western blot
3D	3-dňový
10D	10-dňový

Zoznam obrázkov

Obrázok 1. Konnexíny, konexóny, medzibunkové kanály a gap junctions.	18
Obrázok 2. Kombinácie konexínov tvoriace konexóny, hemikanály a medzibunkové kanály.....	21
Obrázok 3. Schématický model konexínu.....	22
Obrázok 4. Posttranslačne modifikované miesta Cx43.....	31
Obrázok 5. Účinok IHH na proteínovú expresiu celkového Cx43 a úroveň mRNA transkriptu proteínu alfa 1 (CXA1).....	71
Obrázok 6. Účinok IHH na proteínovú expresiu nefosforylovaného Cx43, fosforylovanej formy Cx43 na Ser368, Ser279/282, Tyr265.....	72
Obrázok 7. Účinok IHH na fosforyláciu Cx43 pomocou hmotnostnej spektrometrie.	73
Obrázok 8. Účinok IHH na proteínovú expresiu PKA, CK1, PKG.	74
Obrázok 9. Reprezentatívne mikrofotografie ukazujúce účinok IHH na distribúciu Cx43 počas krátkej Isch, IR.....	75
Obrázok 10. Reprezentatívne mikrofotografie ukazujúce účinok IHH na distribúciu p-Cx43(Ser368) počas krátkej ischémie Isch, IR.	76
Obrázok 11. Účinok IHH na hlavné polynenasýtené mastné kyseliny [kyselina linolová (18: 2n-6), kyselina arachidónová (20: 4n-6), kyselina dokosaheptaénová (22: 6n-3).....	77
Obrázok 12. Účinok CNH na distribúciu HK1 a HK2 počas krátkej ischémii.	79
Obrázok 13. Účinok 3D a 10D chladu na proteínovú expresiu Cx43.....	81
Obrázok 14. Reprezentatívne mikrofotografie ukazujúce účinok 3D a 10D chladu na distribúciu Cx43.....	82
Obrázok 15. Účinok CH a R na proteínovú expresiu Cx43.	83
Obrázok 16. Reprezentatívne mikrofotografie ukazujúce účinok CH, R na distribúciu Cx43.	84
Obrázok 17. Účinok CH a R na proteínovú expresiu PKA, CK1, Akt, MAPK.....	85
Obrázok 18. Účinok CH a R na proteínovú expresiu PKC ϵ , PKC δ	86

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1. Distribúcia izoforiem konexínov v jednotlivých častiach srdca.....	19
Tabuľka 2. Riedenie primárnych a sekundárnych protilátok.....	60

Zoznam publikácií

Kohutova, J., Elsnicova, B., Holzerova, K., Neckar, J., Sebesta, O., Jezkova, J., Vecka, M., Vebr, P., Hornikova, D., Szeiffova-Bacova, B., Egan Benova, T., Hlavackova, M., Tribulova, N., Kolar, F., Novakova, O., Zurmanova, JM. (2019). Anti-arrhythmic cardiac phenotype elicited by chronic intermittent hypoxia is associated with alterations in connexin-43 expression, phosphorylation and distribution. *Frontiers in Endocrinology*. 25 January, <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00789>. IF = 3.519

Kolar, D., Gresikova, M., Waskova-Arnostova, P., Elsnicova, B., **Kohutova, J.**, Hornikova, D., Vebr, P., Neckar, J., Blahova, T., Kasparova, D., Novotny, J., Kolar, F., Novakova, O., Zurmanova, JM. (2017). *Adaptation to chronic continuous hypoxia potentiates Akt/HK2 anti-apoptotic pathway during brief myocardial ischemia/reperfusion insult*. *Mol. Cell. Biochem.* 432, 99–108. IF= 2.669

1 ÚVOD

V spolupráci s Fyziologickým ústavom Akadémie vied Českej Republiky a Oddelením vývojovej kardiológie sme sledovali zmeny v expresii, distribúcii a fosforylácii Cx43 na hypobarickom modeli (IHH). Tento model je známy už vyše 50 rokov a bol preukázaný ako kardioprotektívny. Viaceré štúdie potvrdili kardioprotektívne účinky a to v dôsledku zvýšenej ischemickej tolerancie a zníženej tendencie k vzniku arytmií. Naproti tomu model normobarickej kontinuálnej hypoxie (CNH) znižuje veľkosť infarktu, ale nemá antiarytmické účinky.

Správna intercelulárna komunikácia je nevyhnutná pre normálnu elektrickú aktiváciu myokardu a synchronizovanú kontrakciu srdca. Kontraktilné srdcové zlyhanie a arytmie sú hlavnou príčinou smrti v dôsledku srdcových ochorení. Remodelácia myokardu pri týchto patologických stavoch môže byť spojená so zníženou medzibunkovou komunikáciou a taktiež so zhoršenou funkciou mitochondrií, ktorá je dôsledkom zmeny expresie alebo distribúcie Cx43, ako hlavnej zložky GJ spojenia v ľavej komore myokardu alebo aj dôsledkom energetickej nedostatočnosti a aktivácie apoptózy. Početné štúdie poukazujú na vznik patologických srdcových ochorení, ktoré často súvisia so štrukturálnou a elektrickou remodeláciou myokardu, zvýšeným rizikom ventrikulárnych arytmií a náhlejšou srdcovej smrti. Experimentálne štúdie na geneticky upravených myšiach so zníženou hladinou Cx43 ukázali vzťah medzi oslabenou medzibunkovou komunikáciou a arytmogenezou. Naproti tomu zvýšenie Cx43 na mitochondriálnej membráne bolo pozorované v protektívnych stavoch. Kľúčová úloha pri prestavbe GJ súvisiaca s arytmiami bola preukázaná v modeli srdcového infarktu u mačiek, kde zmena expresie Cx43 korelovala s lokalizáciou *reentry* arytmií.

Vedľa počtu Cx43, jeho vodivých vlastností, je lokalizácia Cx43 taktiež dôležitým aspektom, ktorá prispieva k arytmogenezе, pričom zoslabenie jej abnormalít bolo opakovane preukázané ako kardioprotektívne. Za fyziologických podmienok sú GJ prevažne umiestnené v interkalárnych diskoch, kde poskytujú *end to end* tzv. koncové vedenie medzi susednými kardiomyocytmi. Okrem toho sa v laterálnej plazmatickej membráne nachádzajú aj malé množstvá Cx43 mimo interkalárnych diskov, ktoré umožňujú *side to side* vedenie

medzi kardiomyocytmi (t.j. bočné spoje). Niektoré práce popisujú lokalizáciu Cx43 aj na mitochondriách. V rôznych patologických stavoch boli pozorované zmeny v expresii Cx43 a jeho funkčných vlastností v dôsledku posttranslačných modifikácií ovplyvňujúcich vodivosť a pravdepodobnosť otvárania kanálov. Znížená expresia Cx43, ako aj zvýšené vedenie prispieva k tvorbe arytmogénneho substrátu a spôsobujú abnormálne vedenie. Zistenie, že upregulácia proteínu Cx43 v myokardu je spojená s ochranou pred arytmiami je v súlade s predchádzajúcimi štúdiami.

Adaptácia na IHH, rovnako ako CNH, je tiež dobre známym kardioprotektívnym fenoménom. Predchádzajúce štúdie vypracované na Fziologickom ústave Akadémie vied Českej republiky preukázali zvýšenú ischemickú toleranciu, zlepšenie postischemickej kontraktility a najmä zníženú tendenciu k vzniku arytmií po adaptácii na intermitentnú hypobarickú hypoxiu (IHH, 7000 m, 5 týždňov) (Asemu et al. 1999; Asemu et al. 2000; Ostadal & Kolar 2007). Na našich pracoviskách bolo taktiež preukázané, že v mechanizme endogénnej kardioprotekcie indukovanej IHH, hrajú úlohu reaktívne formy kyslíka (ROS) (Kolar et al. 2007), proteín kináza C (PKC) (Hlavackova et al. 2007), mitochondriálne K-ATP kanály (Neckar et al. 2002) a mitochondriálna hexokináza, ktorá svojou väzbou na mitochondrie tiež znižuje tvorbu ROS (Waskova-Arnostova et al. 2015). Údaje o tom, či sa myokardiálny Cx43 môže zúčastniť na antiarytmickom účinku indukovanom IHH neboli študované.

Ďalším študovaným modelom je chladová adaptácia, ktorá predstavuje doposiaľ málo sledovaný model vo vzťahu ku Cx43 a kardioprotekcii. Adaptácia na chlad je známa svojimi pozitívnymi účinkami, ktoré zlepšujú imunitnú a vaskulárnu odpoveď. Chladová adaptácia vedie k tvorbe hnedého tukového tkaniva u zvierat, ktoré sa zvyčajne tvorí počas hibernácie, a tak zachováva srdcovú činnosť aj pri nízkych teplotách (Blumberg 1997). Fyziológia hibernácie sa vyznačuje dramatickým znížením tepovej frekvencie, dýchaním, metabolizmom, krvným tlakom, telesnou teplotou a rezistenciou na vznik ventrikulárnych fibrilácií. GJ poskytujú v srdci cesty s nízkym odporom, ktoré uľahčujú elektrickú a metabolickú väzbu medzi bunkami srdcového svalu, koordinovanú činnosť srdca a tkanivovú homeostázu. Vodivosť týchto GJ, a teda ich funkcia, je pravdepodobne ovplyvnená fyziologickými zmenami, ku ktorým dochádza počas hibernácie.

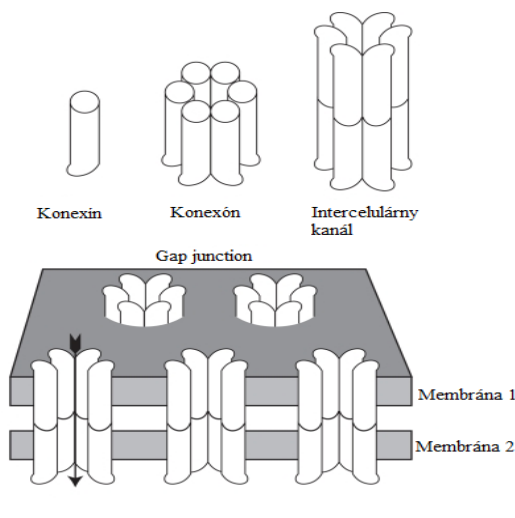
V tejto dizertačnej práci sa zameriavame na možnú úlohu expresie, fosforylácie a distribúcie Cx43 ako aj jednotlivých proteinkináz vzhľadom na antiarytmické účinky stimulované adaptáciou na IHH a chlad, a súčasne distribúciou hexokinázy v režime CNH.

2 LITERÁRNY PREHĽAD

2.1 Prehľad gap junction kanálov

GJ kanály boli prvýkrát popísané v roku 1967, ako "šesťuholníkové polia", ktoré sú lokalizované v interkalárnych diskoch (Ravel & Karnovsky 1967). GJ predstavujú vodivé spoje medzi kardiomyocytmi a sú nevyhnutné pre normálne šírenie akčného potenciálu v pracovnom myokarde. Je preukázané, že konexíny hrajú kľúčovú úlohu aj v embryonálnom vývoji, koordinácii kontrakcie excitabilných buniek, tkaninovej homeostáze, kontrole rastu buniek a diferenciácií (pre prehľad, Oyamada et al. 2005).

GJ predstavuje typ spojenia dvoch susedných buniek v miestach, kde dochádza k priblíženiu ich membrán. Spojenie je sprostredkované prostredníctvom konexónov. Konexón, taktiež nazývaný ako hemikanál, je hexamér proteínových podjednotiek, konexínov (Obr. 1) (Laird 2005). Rodina konexínov má 20 izoformiem u myši a 21 izoformiem u ľudí (Laird 2006). GJ kanály sú usporiadané v šesťuholníkových poliach, často označovaných „*gap junction plaques*“, ktoré môžu obsahovať od 200 000 konexónových kanálov (Laird 2006).



Obrázok 1. Konexíny, konexóny, medzibunkové kanály a gap junctions. Diagram znázorňujúci vzťahy medzi konexínovým monomérom, hexamerickým konexónom a medzibunkovým spojením za vzniku dodekamérneho medzibunkového kanálu. Medzi jednotlivými medzibunkovými kanálmi je medzera "gap", ktorá oddeľuje príslušné plazmatické membrány. Každý medzibunkový kanál má axiálny kanál (šípka), ktorý priamo spája cytoplazmu príľahlých buniek. (Goodenough & Paul 2009).

Spojenie medzi jednotlivými GJ kanálmi je ~2 nm. GJ kanálmi môžu prechádzať molekuly s nízkou molekulovou hmotnosťou < 1 kilodalton (kDa), metabolity a ióny, vrátane druhých poslov, ako je cyklický adenosínmonofosfát (cAMP), inozitoltrifosfát a Ca²⁺ (Saez et al. 2003). V kardiomyocytoch sú exprimované štyri izoformy Cx37, Cx40, Cx45 a Cx43 (Tab.1) (Van Kempen et al. 1995) a ich množstvo sa líši v jednotlivých srdečných oddieloch. Hlavnou izoformou v ľavej komore je Cx43 (Davis et al. 1995), ale taktiež bol preukázaný výskyt izoformy Cx45 (Verheule et al. 1997). V predsieňach túto úlohu zastávajú Cx40 a Cx45.

Tabuľka 1. Distribúcia izoform konexínov v jednotlivých častiach srdca (upravené podľa Davis et al. 1995; Dhein 1998; Kar et al. 2012).

Oblasť srdcového svalu	Izoforma konexínu
Predsiena	Cx40, Cx43, Cx45
Komory	Cx43, Cx45
Oblasť prepojenia predsiena a komory	Cx37, Cx46
Oblasť prepojenia dvoch komôr	Cx43, Cx45
Sinoatriálny uzol	Cx40, Cx45
Atrioventrikulárny uzol	Cx40, x43, Cx45
Purkyňove vlákna	Cx40, Cx43, Cx45
Hisov zväzok	Cx40, Cx43, Cx45

GJ kanály rozlišujeme v stave otvorenom (*coupling*) a taktiež v stave uzavretom (*uncoupling*), ktoré súvisia so zmenou konformácie a prerušením medzibunkovej komunikácie (Söhl & Willecke 2003). Tieto zmeny sú závislé a regulované rôznymi mechanizmami, vrátane Ca²⁺, pH, transjunkčného potenciálu a fosforylácie proteínov, ktoré budú detailnejšie popísané v samostatnej kapitole.

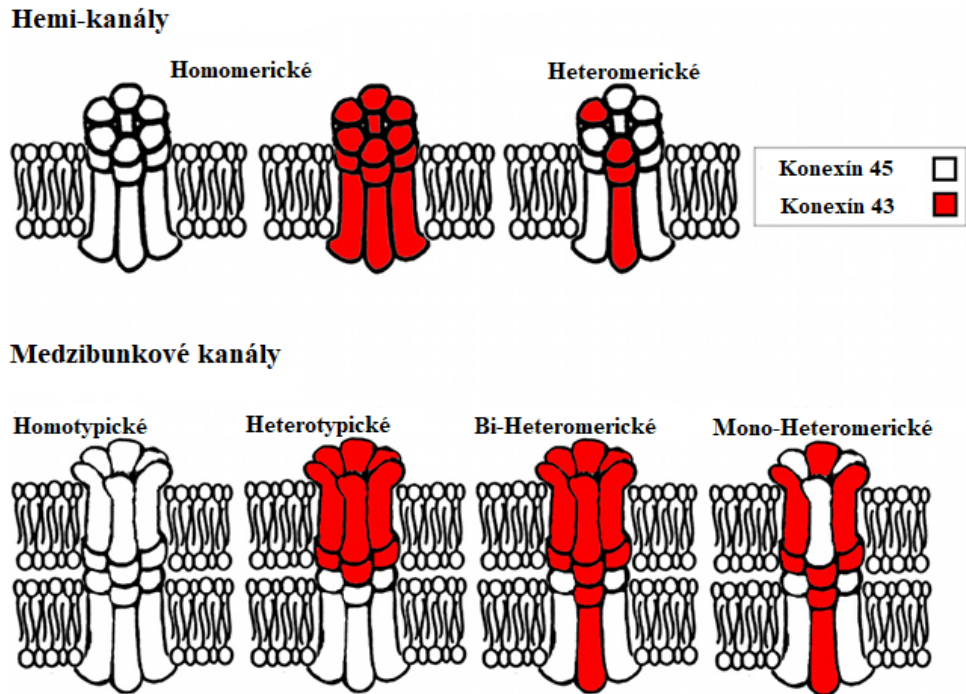
Lokalizácia Cx43 je prevažne v interkalárnych diskoch, kde zaisťuje *end to end* vedenie (tzv. koncové), ktoré je dôležité pre normálnu funkciu srdca. V menšom množstve sa Cx43 vyskytuje aj laterálne na plazmatickej membráne smerom od interkalárnych diskov, kde umožňuje *side to side* vedenie medzi kardiomyocytmi (tzv. laterálne) (Spach & Heidlage 1995).

Najpoužívanejšia nomenklatúra konexínov zachováva použitie názvu proteínu konexín napísaného ako skratka Cx, za ktorou nasleduje prípona s uvedenou molekulovou

hmotnosťou v kDa. Napríklad proteín študovaný v tejto práci sa nazýva Cx43, pretože jeho molekulová hmotnosť je ~ 43kDa (Goodenough et al. 1996). Na identifikáciu génov konexínov sa používa klasifikácia gréckych písmen. Gény začínajú trojpísmenovým kódom začínajúcim Gj (*gap junction*) a podskupinou odvodenou z gréckej písmenovej klasifikácie (α , β , γ , δ a ϵ). Následne číslom podľa poradia objavenia (napríklad Cx43- prvý identifikovaný konexínový gén skupiny a je kódovaný ako Gja1) (Söhl & Willecke 2003).

Konexíny môžu oligomerizovať a vytvárať *homomericke* (skladajúce sa len z jedného druhu konexínu) alebo *heteromericke konexóny* (tvorené zmesou rôznych izoform konexínov). Okrem toho môžu tieto konexóny vytvárať *homotypický kanál*, tvorený rovnakými izoformami konexónov alebo *heterotypický kanál*, ktorý je tvorený rozličnými izoformami konexónov. Taktiež rozlišujeme *mono-heteromérený kanál*, keď je spojený jeden homomérený konexón s jedným heteroméreným konexónom a *bi-heteromérený kanál*, ktorý je tvorený dvoma heteromérenými konexónmi (Obr. 2) (Moreno 2004; Martinez et al. 2002).

Elektrické vlastnosti konexínov boli najčastejšie študované v oocytoch *Xenopus* a kultivovaných bunkách cicavcov, ako sú HeLa bunky transfekované rôznymi subtypmi konexínov (Swenson et al. 1989; Elfgang et al. 1995; Elenes et al. 2001; Valiunas & Weingart 2000). Z týchto experimentov bolo zistené, že homotypické kanály zložené z Cx45 vykazujú najmenšiu jednotkovú vodivosť pri 30-40 pS, zatiaľ čo homotypické kanály Cx43 a Cx40 majú hodnoty 60-120 pS a 150-200 pS (Moreno 2004). Elektrické vlastnosti heteromérených a heterotypických kanálikov sa tiež skúmali v kotransfekovaných bunkách, aby sa zistila funkčná dôležitosť konexínových koexpresných vzorcov *in vivo*. Heterotypické pripojenie kanálov Cx43-Cx45 produkovalo vodivosť, ktorá bola medziodborovou jednotkovou vodivosťou pre homotypické kanály Cx43 a Cx45 (Elenes et al. 2001; Moreno 2004). Podobné výsledky boli tiež získané pre heterotypické kanály Cx40-Cx45 (Moreno 2004) a Cx30.2-Cx45 (Kreuzberg et al. 2005; Rackauskas et al. 2007).

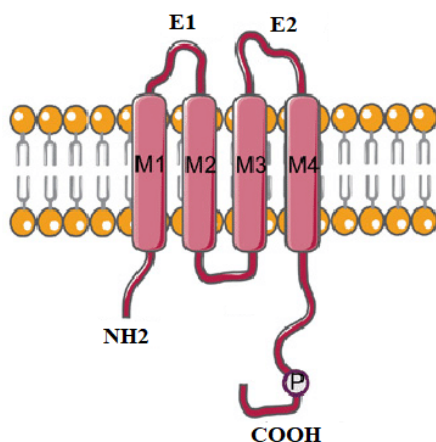


Obrázok 2. Kombinácie konexínov tvoriace konexóny, hemikanály a medzibunkové kanály. Cx45 a Cx43 sú reprezentované v bielom a v červenom poli (Moreno 2004).

2.1.1 Štruktúra konexínov

Čo sa týka molekulárnej štruktúry, konexíny sú tvorené štyrmi transmembránovými doménami (M1-M4), karboxylovým koncom (C-koniec), aminovým koncom (N-koniec), dvomi extracelulárnymi slučkami (E1-slučka a E2-slučka), cytoplazmatickou slučkou (C-slučka) medzi M2 a M3 pre prehľad (Obr. 3) (Solan & Lampe 2009).

V intracelulárnej cytoplazme sa nachádza C-koniec, N-koniec a C-slučka medzi M2 a M3. Hydrofilné domény medzi M1 a M2 a medzi M3 a M4 sú v extracelulárnom priestore a tvoria E1- a E2-slučku. Cytoplazmatické domény konexínov (N-koniec, C-slučka, C-koniec) hrajú dôležitú úlohu v otváraní GJ kanálov a regulujú fyziologické vlastnosti kanálu. N-koniec je relatívne konzervatívny na dĺžku, zatiaľ čo C-slučka a C-koniec sa líšia medzi rôznymi izoformami. Transmembránové domény ukotvujú proteín v plazmatickej membráne, pričom extracelulárne slučky zodpovedajú za medzibunkovú kompatibilitu (Goodenough & Paul 2009).



Obrázok 3. Schematický model konexínu. Valce znázorňujú transmembránové domény (M1- M4), slučky medzi prvou a druhou a taktiež aj medzi tretou a štvrtou transmembránovou doménou sú extracelulárne (E1 a E2) (upravené podľa Talbot et al. 2015).

Topologické štúdie ukázali, že štyri transmembránové domény konexínov pozostávajú z približne 20 aminokyselín. Ďalšia analýza transmembránových sekvencií viedla k hypotéze, ktorá konštatovala, že transmembránová doména M3 obsahuje sériu dobre rozmiestnených polárnych aminokyselín tvoriacich amfipatický α -helix. Potom by transmembránové domény M3 každej podjednotky Cx tvorili najvnútornejšiu hranicu transmembránového póru (Milks et al. 1988).

N-koniec je zložený z 22 aminokyselínových zvyškov α konexínov a 23 zvyškov β konexínov (Kyle et al. 2008). N-koniec vďaka jeho pozitívne nabitým zvyškom je potrebný pre správnu inkorporáciu do membrány. Bolo preukázané, že mutácia pozitívne nabitého zvyšku na N-konci a negatívne nabitých aminokyselín na Cx50 vedie k úplnému zlyhaniu tvorby GJ plakov (Kyle et al. 2008). N-koniec sa tiež podieľa na regulácii napätia a hrá zásadnú úlohu pri prenikaní iónov. Jeho poloha blízko kanálu mu umožňuje pôsobiť ako napäťový senzor (Purnick et al. 2000).

Dĺžka C-slučky sa líši medzi rôznymi izoformami konexínov. Na základe dĺžky môžu byť rozdelené do troch kategórií na: krátke (30-35aa), stredné (50-55aa) a veľké (80-105aa) (Beyer & Berthoud 2009). C-slučka sa taktiež podieľa na začlenení do membrány a vytváraním plakových spojov a je dôležitá pre interakcie proteínov, ktoré sa podieľajú

na funkcii kanála. Napríklad, väzbové miesto pre kalmodulín (CaM) bolo identifikované v druhej polovici C-slučky Cx43 (Zhou et al. 2007). Ako už bolo spomenuté, väzba CaM je dôležitá pre Ca^{2+} závislé zatvorenie GJ kanálov. C-slučka Cx43 sa podieľa aj na interakcii s C-koncom spôsobom závislým od pH v modeli *častice-receptor*, kde C-koniec Cx43 hrá úlohu receptora (Duffy et al. 2002).

C-koniec konexínov je primárna oblasť, ktorá je fosforylovaná rôznymi kinázami a doposiaľ neboli prezentované žiadne správy o fosforylácií na N-konci konexínov. C-slučka a C-koniec, majú variabilnú dĺžku a sekvenciu, ktorá umožňuje funkčné rozdiely medzi rôznymi konexínmi a konexónmi. C-terminálna oblasť, obzvlášť interaguje s proteínmi, ako sú kateíny a ďalšie, ktoré slúžia pre moduláciu polčasu životnosti, činnosti a funkcie konexínov (pre prehľad, Dbouk *et al.*, 2009). Dve extracelulárne slučky sú nevyhnutné na ukotvenie dvoch hemikanálov susedných buniek a pre vytvorenie GJ kanálu.

2.2 Regulácia gap junction kanálov

GJ kanály, ktoré umožňujú komunikáciu medzi susednými bunkami sú prísne regulované na viacerých úrovniach. Rôzne tkanivá a typy buniek exprimujú rôzne izoformy konexínov a ich hladiny expresie sa v priebehu času menia aj v tej istej bunke. Viacnásobné mechanizmy sa podieľajú na tkanivovej a časovo špecifickej kontrole konexínov na úrovni mRNA, syntéze proteínov, montáži a degradácii.

2.2.1 Životný cyklus konexínov

2.2.1.2 Syntéza konexínov

Konexíny majú pomerne krátky polčas života. Polčas životnosti konexínu Cx43 je približne 1 až 2 hodiny, preto sú konexíny predprogramované neustálej biosyntéze a degradácii (Beardslee et al. 1998). Táto krátka životnosť Cx43 bola dobre zdokumentovaná v kultivovaných bunkách kardiomyocytov (Laird et al. 1991). Konexíny sú syntetizované na membráne drsného endoplazmatického retikula (ER). Crow a kol. (1990) preukázali, že novo syntetizovaný Cx43 môže byť rýchlo fosforylovaný a defosforylovaný (v priebehu 15 až 30 minút) (Crow et al. 1990). Následne sa kotranslačne naviaže do hladkého

ER prostredníctvom translokónu a zakódovaných prenosových sekvencií štartu a zastavenia. Jednou z možných výnimiek je Cx26, o ktorom sa ukázalo, že je schopný byť posttranslačne a kotranslačne transportovaný do membrány ER (Zhang et al. 1996) a dokonca aj priamo importovaný do plazmatickej membrány (Ahmad & Evans 2002).

2.2.1.2 Transport a začlenenie konexínov do plazmatickej membrány

Vedľa regulácie konexínov expresiou je dôležitým regulačným krokom transport a ich začlenenie do plazmatickej membrány. Z ER sú konexíny transportované do trans-Golgiho aparátu, v ktorom prebieha oligomerizácia na konexóny. Miesto, v ktorom konexíny oligomerizujú na konexóny závisí od typu konexínu. Izoformy Cx32 a Cx26 sa zoskupujú v ER, zatiaľ čo Cx43 a Cx46 v trans-Golgiho komplexe (Musil & Goodenough 1993). Po ukončení oligomerizácie konexínov sú konexóny zabalené do vezikúl medzi ER a trans-Golgi komplexom a ďalej transportované k plazmatickej membráne. Tento transport môže byť buď závislý alebo nezávislý od mikrotubulov, čo zahŕňa aj aktínom sprostredkovaný transport, ako aj iné neidentifikované mechanizmy. Po vložení do plazmatickej membrány konexóny voľne difundujú v lipidovej dvojvrstve (Thomas et al. 2005), pričom môžu zostať ako hemikanály alebo sa spoja s hemikanálmi susedných buniek a vytvoria GJ plaký, respektíve GJ kanály (Lauf et al. 2002). Gaietta a kol. (2002) preukázali, že nové konexóny sú včlenené do vonkajších okrajov starých plakov GJ (Gaietta et al. 2002). V GJ plakoch môže byť starý a nový kanál zreteľne oddelený (Lauf et al. 2002). Staršie kanály uprostred plakov internalizujú do vezikúl rôznych veľkostí (Gaietta et al. 2002).

2.2.1.3 Internalizácia a degradácia gap junction kanálov, konexónov, konexínov

Cx43 predstavuje vysoko dynamickú štruktúru (Beardslee et al. 1998). Neočakávane krátky polčas životnosti Cx43 zahŕňa nielen syntézu, ale aj efektívny mechanizmus degradácie, ktorý je nevyhnutný a potrebný pre zabezpečenie dynamického obratu Cx43. Tento predpoklad bol overený rôznymi technológiami na živých bunkách, ktoré ukázali, že novo syntetizované kanály sú nahromadené na vonkajších okrajoch existujúcich plakov GJ, zatiaľ čo staršie kanály sú súčasne odstránené z plakových centier (Falk et al. 2014).

Internalizácia GJ kanálov je dôležitým regulačným mechanizmom konexónov a/alebo konexínov, ktorý je v posledných rokoch predmetom značného zamerania. K ich degradáciám

dochádza buď vytváraním dvojmembránových vezikulárnych štruktúr tzv. *annular junction*, ktoré boli objavené pred mnohými rokmi elektrónovou mikroskopiou (Archard & Denys 1979) alebo vytváraním konexozómov (Laird 2006).

Bunky si vyvinuli proteazomálne, endo- a fago- lyzozomálne (autofagické) degradačné cesty a všetky tri boli spojené s konexínovým proteínom a GJ degradáciou. Zatiaľ čo proteazomálna degradácia všeobecne degraduje krátkodobé, nesprávne zložené alebo inak nežiadúce polypeptid. Endo- a fago- lyzozomálne dráhy umožňujú degradáciu zložitejších proteínových štruktúr, ktoré sú buď endocytované na plazmatickej membráne, alebo sú prítomné v cytoplazme. V oboch endo-lyzozomálnych a autofagických dráhach degradácie hrá lyzozóm kľúčovú úlohu pri sprostredkovaní konečnej degradácie.

Degradácia bunkových proteínov proteazómom môže byť ubikvitín-závislá alebo ubikvitín-nezávislá. Modifikácia proteínov ubikvitínom predstavuje trojstupňový proces, ktorého výsledkom je aktivita enzýmu aktivujúceho ubikvitín, enzým konjugujúci ubikvitín a ubikvitín-proteín-ligáza (Kravtsova-Ivantsiv & Ciechanover 2012) Proteazomálna degradačná dráha môže regulovať stabilitu konexínov a internalizáciu z bunkovej membrány, ale tento účinok je nepriamy, pravdepodobne prostredníctvom regulácie proteínov asociovaných s konexínmi, ako je napríklad zonula occludens 1 (ZO-1) (Ambrosi et al. 2016). Účasť proteazómu bola zistená pri degradácii Cx43 v ER. Asi 40 % Cx43 degraduje proteazómom prostredníctvom degradácie spojenej s ER (ERAD) za normálnych podmienok, pričom inhibícia ERAD zväčšuje tvorbu a funkciu GJ kanálov (VanSlyke, 2002). Laing a Beyer (1995) ukázali, že liečenie E36 buniek vaječníkov čínskych škrečkov s proteazomálnymi inhibítormi a použitím buniek s defektnou ubikvitináciou predĺžilo počas rozpadu Cx43, čo poskytlo prvý dôkaz o účasti proteazómu na degradácii Cx43 (Laing & Beyer 1995).

Lyzozomálna degradácia je taktiež dôležitá pre medzibunkovú komunikáciu. Zohráva ústrednejšiu úlohu pri degradácii konexínov, buď pred transportom na membránu, po začlenení do membrány, alebo ešte pred vytvorením funkčných GJ kanálov. Ubikvitinácia je dôležitým krokom pre lyzozomálnu degradáciu, pričom inhibícia lyzozomálnej dráhy zvyšuje proteínovú hladinu konexínov (Qin et al. 2003). Lyzozomálna

degradácia Cx43 bola dokázaná zistením, že prstencové profily Cx43 boli spojené so štruktúrou podobnou lyzozómu v C6 gliomových bunkách (Naus et al. 1993).

Ďalšie pokusy s pulzným sledovaním odhalili, že inhibítory proteazómu a lyzozómu spôsobili predĺžený polčas rozpadu Cx43 v podobnom rozsahu v kardiomyocytoch potkanov, čo naznačuje koexistenciu týchto dvoch proteolytických dráh pri degradácii Cx43 (Laing et al. 1997). Hoci existujú dobré dôkazy, ktoré naznačujú, že sa lyzozómy aj proteazómy podieľajú na degradácii Cx43, je ťažké zhodnotiť, prečo sú obe cesty potrebné na degradáciu Cx43. Nie je tiež jasné, či obe dráhy degradujú Cx43 na povrchu bunky z plakov, ako aj možné nezrelé Cx43 lokalizované na ER alebo, či sú do týchto procesov sekrečných dráh zahrnuté aj ďalšie medzikroky ako je napríklad aktivácia kináz.

Fosforylácia zohráva dôležitú úlohu aj v internalizácii a degradácii konexínov (Laird 2005). Vzhľadom na vzájomnú komunikáciu medzi mitogénom aktivovanou proteínkinázou (MAPK), PKC a tyrozín proteínkinázou transformujúcou proteín Src (Src) signálnymi kaskádami sa tieto tri kinázy najlepšie diskutujú spoločne. Ukázalo sa, že všetky tri signalizačné dráhy môžu prispieť k uzatvoreniu GJ kanálov a zníženiu GJ komunikácie, keď je Src aktívna (Solan & Lampe 2008). Táto komunikácia medzi PKC, Src a MAPK je vyvolaná ako odpoveď na 12-O-tetradekanoylforbol 13 acetát (TPA), analóg diacylglycerolu (DAG). DAG, ako druhý posol, zvyšuje aktiváciu receptora epidermálneho rastového faktora (EGF) a následne c-Src, čo sprostredkuje priamu fosforyláciu Cx43 na Tyr247 a Tyr265. Ako c-Src, tak aj v-Src môže fosforylovať Cx43 priamo na tieto zvyšky a inhibovať GJ intercelulárnu komunikáciu redukciami pravdepodobnosti otvorenia kanála (Postma et al. 1998). EGF spôsobuje hyperfosforyláciu Cx43, a tým spúšťa jeho internalizáciu, čo je spojené s aktiváciou extracelulárne signálne regulovanej proteín kinázy (ERK) 1/2 (Cameron et al. 2003). Väčšina zverejnených prác na fosforylácii Cx43 sprostredkovanvej MAPK preukázala, že liečenie buniek EGF alebo TPA a následná aktivácia receptora EGF viedla k rýchlej poruche GJ komunikácie. Absencia fosforylácie Cx43 na tyrozínu preukázala, že receptor EGF nefosforyluje Cx43 priamo, ale namiesto toho aktivuje downstream kaskádu MAPK cez Ras GTPázu (Lau et al. 1992; Warn-Cramer & Lau 2004). Štúdia Sirnes a kol. (2009) ukázala, že v bunkách ošetrovaných TPA sa aktivuje PKC, čo následne aktivuje kaskády MAPK. Táto štúdia poskytla dôkaz, že zníženie

regulácie GJ intercelulárnu komunikáciu bolo spôsobené nielen fosforyláciou PKC (na Ser368), ale aj fosforyláciou Cx43 pomocou MAPK (na Ser255 a Ser262) (Sirnes et al. 2009).

Liečba buniek kyselinou glycyrrhetinovou, ktorá inhibuje GJ komunikáciu, vedie k narušeniu usporiadania konexínov v GJ kanáloch (Goldberg et al. 1996). V tomto prípade, zatiaľ čo veľkosť kanálu a morfológia sa zdali normálne, kanály boli neusporiadané s nepravidelným rozstupom, skôr než v husto zabalenom zoskupení. V samostatných štúdiách bola pozorovaná zvýšená fosforylácia a interakcia so Src (Chung et al. 2007) a PKC (Liang et al. 2008) ako odpoveď na liečbu glycyrrhetinovou kyselinou. Tieto údaje spoločne viedli k špekulácii, že fosforylácia a organizácia kanálov spolupracujú na usmerňovaní internalizácie GJ buď prostredníctvom endocytózy alebo vytváraním *annular junction*.

2.2.2 Otváranie Gap junction kanálov

Ako je zrejmé z vyššie uvedených údajov počet aktívnych hemikanálov je jedným z významných kritérií pre celkovú priepustnosť membrány. Avšak významnou úlohou regulácie je vodivosť jednotlivých hemikanálov (γ). Potom vodivosť GJ kanálu je charakterizovaná ako $V_{GJ} = N \times Po \times \gamma$, kde N je počet aktívnych kanálov v plazmatickej membráne a Po je pravdepodobnosť ich otvárania (Imanaga et al. 2004).

Napätie je dôležitý parameter, ktorý reguluje otváranie a zatváranie všetkých spojovacích kanálov. Vnútro bunkové kanály môžu byť citlivé na tieto napätia:

1. Napäťový rozdiel medzi cytoplazmou a extracelulárnym priestorom, transmembránové napätie (V_m).
2. Napätie medzi cytoplazmou dvoch rôznych buniek, transjunkčné napätie (V_j), je nezávislé od membránového potenciálu každej bunky.

Priepustnosť GJ kanálov je regulovaná špecifickými zmenami v cytosólovej iónovej kompozícii, posttranslačnými modifikáciami (fosforyláciou) a V_j , pričom niektoré kanály sú senzitívne na V_j a V_m . Keď sa kanály uzavru, dochádza k prerušeniu elektrickej a metabolickej komunikácie. Rozpojenie kanálov je hlavným ochranným mechanizmom na izoláciu zdravých buniek od poškodených (Gonzalez et al. 2007).

Model *ball-and-chain* opisuje mechanizmus rýchleho otvárania GJ kanálov pomocou zmien *Vj*. V tomto modeli pohyb C-konca smerom k pólu kanála spôsobuje blokáciu pórov (Gonzalez et al. 2007).

Podobný model (takzvaný model *particle-receptor*) umožňuje taktiež zatváranie GJ kanálov pomocou chemických stimulov (napr. pH), ktoré interagujú s receptorom C-konca, a tak blokujú kanál. Napríklad kanály Cx43 sa zvyčajne otvárajú pri pH 7,2 (Ek-Vitorin et al. 1996).

Bukauskas a kol. (2000) zistili, že veľkosť GJ je taktiež kritickým determinantom otvorenia kanála. Odhadli, že minimálna veľkosť plakov obsahujúca 200-400 kanálov bola potrebná na otvorenie GJ kanálov a že so zvyšujúcou sa veľkosťou plakov bude pravdepodobne otvorených viac kanálov (Bukauskas et al. 2000).

Ďalším chemickým podnetom, ktorý môže regulovať aktivitu GJ kanálov sú Ca^{2+} ióny. Predpokladá sa, že účinok intracelulárneho Ca^{2+} pôsobí prostredníctvom CaM a inhibítorov CaM, ktoré zabraňujú zatvoreniu GJ kanálov v mnohých bunkových typoch (pre prehľad Peracchia 2004). Cx32 obsahuje dve domény, ktoré sa viažu na CaM. Ukázalo sa, že s nárastom Ca^{2+} , CaM buď fyzicky blokuje kanál, alebo ho uzavrie cez konformačnú zmenu v Cx32. Napriek zatváraniu kanálov súvisiaceho so zvýšením intracelulárneho Ca^{2+} , štúdie na hemikanáloch obsahujúcich Cx32 ukázali, že zvýšenie koncentrácie Ca^{2+} v cytoplazme vyvoláva otvorenie hemikanálu (Vuyst et al. 2006).

2.2.3 Dôležitosť C-konca v regulácii konexínov

Predpokladá sa, že C-koniec je hlavnou regulačnou doménou väčšiny konexínov. C-koniec hrá úlohu pri transporte, veľkosti, lokalizácii GJ kanálov, ako aj udržiavaní medzibunkovej komunikácie prostredníctvom mnohých posttranslačných modifikácií a interakcií proteín-proteín (Goodenough & Paul 2009).

Hlavným regulačným miestom Cx43 je C-koniec. C-koniec Cx43 je nevyhnutný pre správnu organizáciu v interkalárnom disku, rovnako ako aj pre reguláciu kanála vplyvom rôznych chemických stimulov. Sorgen a jeho kolegovia (2004) uviedli, že C-koniec Cx43 je prevažne náhodná cievka pozostávajúca zo 132 aminokyselín obsahujúca dve špirálovité

domény prechádzajúce cytoplazmatickou membránou (Sorgen et al. 2004). Táto skupina ďalej preukázala, že väzobné proteíny C-konca Cx43 môžu významne zmeniť sekundárnu štruktúru Cx43. Dôležité je, že tieto štrukturálne zmeny boli pozorované v miestach vzdialených od oblasti väzby. To naznačuje, že C-koniec Cx43 nie je len miestom interakcie proteín-proteín, ale je aj platforma, cez ktorú väzobné proteíny konexínov môžu vzájomne interagovať.

Dimerizácia C-konca Cx43 bola navrhnutá ako jedna zo štrukturálnych zmien zahrnutých v regulácii Cx43 pomocou pH, čím sa zvýšila väzobná afinita C-konca Cx43/C-slučky Cx43, aby sa kanál dostal do uzavretého stavu (Hirst-Jensen et al. 2007), čo je dôležité pre reguláciu heteromérických kanálov. V súlade s tým bolo zistené, že delécia posledných piatich aminokyselinových zvyškov C-konca Cx43 vedie k vzniku letálnych komorových arytmií (Lubkemeier et al. 2013).

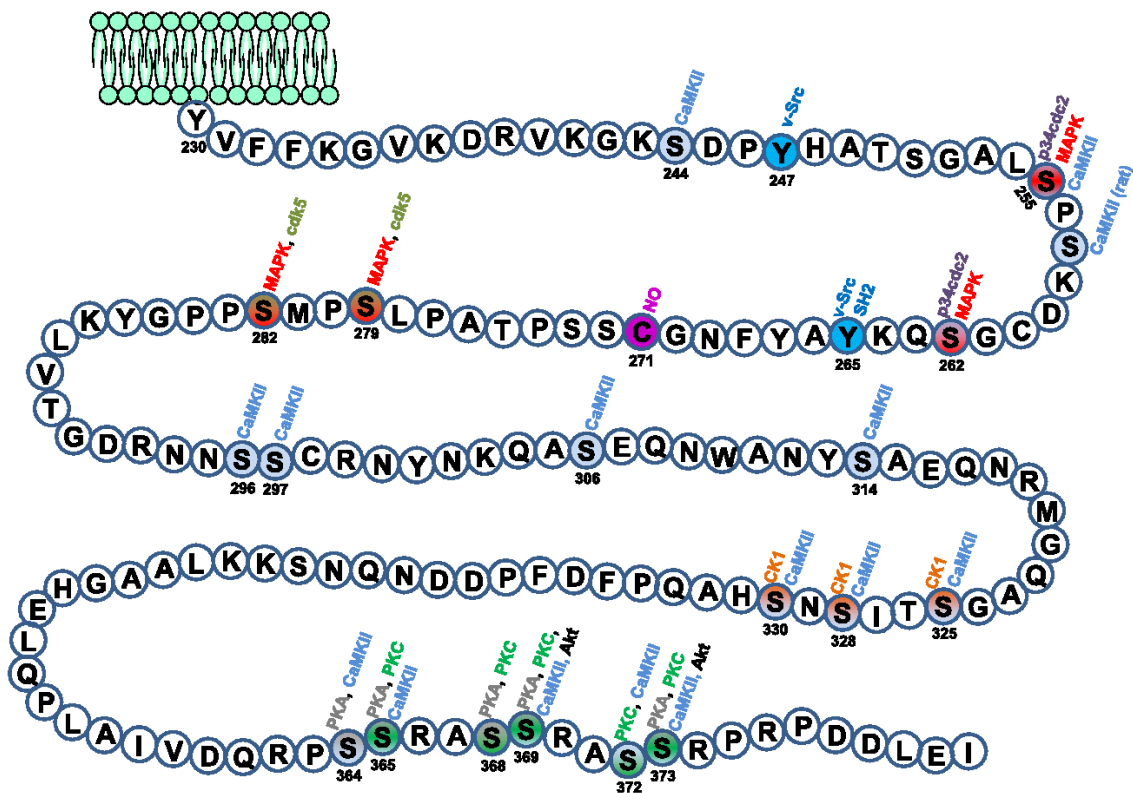
Mnohé posttranslačné modifikácie sa vyskytujú na C-konci konexínov, zahŕňajúc fosforyláciu, ubikvitináciu, hydroxyláciu, acetyláciu, nitrozyláciu, oxidáciu a palmitoyláciu (Axelsen et al. 2013). Frekvencia fosforylácie na C-konci konexínov je extrémne vysoká, pretože fosforylácia prevažne nastáva v neusporiadanom (*disordered*) regióne proteínu. Nestabilná štruktúra je rozhodujúca pre vytvorenie vodíkovej väzby medzi substrátmi a jeho kinázami (Iakoucheva et al. 2004). Fosforylácia môže tiež regulovať interakcie proteín-proteín zmenou termodynamickkej väzby (Boehr et al. 2009). Bolo identifikovaných mnoho väzobných proteínov na C-konci konexínov, vrátane ZO-1, tubulínu, kazeín kinázy 1 (CK1), drebrínu a CaM (Ambrosi et al. 2016; Cooper & Lampe 2002; Saez et al. 1990; Zhou et al. 2007).

Na C-konci sa nachádza mnoho cieľových fosforylačných miest prevažne na serínových, treonínových a tyrozínových aminokyselinových zbytkoch. Bolo identifikovaných niekoľko kináz, ktoré môžu ovplyvniť permeabilitu kanála (pre prehľad Lampe & Lau 2004) a to PKA (Ser364, Ser365) (Tenbroek et al. 2001; Solan et al. 2007), PKC (Ser368) (Akita 2002), proteinkináza B (PKB/Akt) (Ser373) (Batra et al. 2014), CK 1 (Cooper & Lampe 2002), MAPK (Ser279, Ser282) a ERK1/2 (Ser255, S279, Ser282) (Johnson et al. 2013).

2.3 Fosforylácia konexínov

Kovalentné viazanie fosfátových skupín na serínové, treonínové alebo tyrozínové zvyšky proteínov sa nazýva proteínová fosforylácia. Pridanie fosfátovej skupiny k proteínu je sprostredkované rôznymi proteínkinázami, zatiaľ čo odstránenie fosfátovej skupiny, defosforylácia, je sprostredkované proteínfosfatázami. Dnes je fosforylácia a defosforylácia dobre popísaná a predstavuje potenciálne najbežnejší spôsob kontroly aktivity a funkcie proteínov v biologických systémoch. Prvý dôkaz, že konexíny (Cx) sú fosfoproteíny bol publikovaný v roku 1980 (Saez et al. 1986; Takeda et al. 1987). Fosforylačný stav Cx závisí od interakcie medzi rôznymi kinázami a fosfatázami, je často špecifický pre bunkový, alebo tkanivový typ a je ďalej ovplyvnený rôznymi fyziologickými a patologickými stavmi.

Fosforylácia Cx predstavuje najviac študovanú posttranslačnú modifikáciu. Podieľa sa na regulácii medzibunkovej komunikácie (Dhein 2006) a je nevyhnutná pre správnu syntézu Cx, reguláciu elektrickej vodivosti a pri priepustnosti malých molekúl (Doble et al. 2000). Všeobecne možno povedať, že fosforylácia Cx ovplyvňuje aj ich prienik cez membránu, montáž do gap junctions, distribúciu, degradáciu (pre prehľad, Hervé, 2012). Fosforylácia Cx sa nachádza, ako na serínových tak aj na tyrozínových zvyškoch, čím sa stávajú potenciálnymi cieľmi rôznych proteínkináz a signálnych dráh (Jeyaraman et al. 2012). Kým fosforylácia Cx na tyrozíne je spojená so znížením medzibunkovej komunikácie, fosforylácia Cx na seríne je spojená ako so zvýšením tak aj znížením (Doble et al. 2000). Medzi serín/treonínove kinázy, ktoré fosforylujú Cx, patria napr. PKC, MAPK, PKA závislá na cAMP, CK1, PKG, ale taktiež tyrozín kináza Src je schopná fosforylácie Cx (Lampe & Lau 2004). Niektoré zvyšky môžu byť cieľmi viacerých proteínkináz, ktoré majú rôzne vplyvy na GJ kanály za rôznych fyziologických alebo patofyziologických podmienok.



Obrázok 4. Posttranslačne modifikované miesta Cx43 (Pogoda et al. 2016). CaMKII- kalmodulín proteínkináza II, v-Src- tyrozín proteín kináza transformujúca proteín Src, SH2- Src doména 2, MAPK- mitogénom aktivovaná pretín kináza, cdk5- cyklín dependentná kináza 5, NO- oxid dusnatý, CK1- kazeín kináza 1, PKA- proteínkináza A, PKC- proteínkináza C, Akt- proteínkináza B.

Štúdie naznačujú, že Cx43 je rôzne fosforylovaný po celú dobu jeho životného cyklu a to najmenej na 14 z 21 serínov a 2 tyrozínov v cytoplazmatickej doméne (pre prehľad, Márquez-Rosado *et al.*, 2012).

Fosforylácia Cx sa vyskytuje primárne na C-konci, ale Cx36 a Cx56 môžu byť fosforylované aj na cytoplazmickej slučke (Berthoud et al. 1997; Urschel et al. 2006). Cx26 má veľmi krátku C-koncovú oblasť s iba 11 aminokyselinami a predpokladá sa, že sa nevyskytuje vo forme fosfoproteínu, pretože fosforylácia tohto proteínu nebola detekovateľná v hepatocytoch (Traub et al. 1989).

Celý priebeh fosforylácie a defosforylácie Cx43 je riadený kinázami a fosfatázami, ktoré ovplyvňujú jeho špecifické miesta. Počiatočná fosforylácia Cx43 sa vyskytuje počas 15 minút syntézy (Crow et al. 1990), takže niektoré fosforylačné udalosti sa pravdepodobne môžu vyskytnúť pred príchodom Cx43 na plazmatickú membránu. Zosilnená zostava spojenia GJ vzniká pri aktivácii proteínkinázy závislej od cAMP (PKA) prostredníctvom

zvýšeného prenosu Cx43 na plazmatickú membránu (Tenbroek et al. 2001). Solan a kol. (2007) preukázali, že prechod Cx43 z cytoplazmy na plazmatickú membránu zahŕňa fosforyláciu pravdepodobne na Ser365 (Solan et al. 2007). Následne CK1 fosforyluje Cx43 na Ser325/328/330, ktoré sa podieľajú na pohybe Cx43 z plazmatickej membrány do GJ (Cooper & Lampe 2002).

2.3.1 Serínové fosforylačné miesta

Ser368

PKC je hlavnou upstream kinázou Cx43 na Ser368. Existuje najmenej 10 izoform PKC, ktoré sú rozdelené do troch skupín súvisiacich s ich primárnou štruktúrou (Newton 2003). Rodina proteínov PKC je rozdelená do troch skupín na základe zmien v usporiadaní, alebo existencii C1-C4 a V1-V5. Konvenčné PKC (α , β I, β II, γ) majú opakujúcu C1 doménu bohatú na cysteín, ktorá pôsobí ako senzor diacylglycerolu (DAG). C2 doménu, ktorá viaže Ca^{2+} a C3, C4 domény, ktoré viažu adenosíntrifosfát (ATP) a substrát viažúce molekuly PKC. Nové PKC (δ , ϵ , η , θ) neobsahujú C2 a teda nie sú aktivované Ca^{2+} . Atypické PKC (ζ , ι/λ) taktiež nie sú aktivované Ca^{2+} ani DAG, pretože im chýbajú konzervované zvyšky Ser/Thr na C-konci. Konzervované zvyšky predstavujú dôležité miesto pre fosfor-akceptor u konvenčných a nových PKC (Giorgione et al. 2006).

PKC priamo fosforyluje Cx43. Aktivácia a degradácia PKC izoenzýmov je riadená priestorovo a časovo. Je zrejmé, že PKC izoenzýmy hrajú ústrednú úlohu v regulácii elektrickej aktivity srdca (Pears et al. 2008). Existujú práce, ktoré poukazujú, že fosforylácia Cx43 sprostredkovaná PKC bola spojená ako so zvýšenou vodivosťou (Kwak & Jongsma 1996), tak aj so zníženou vodivosťou GJ kanálov (Doble et al. 2000).

PKC ϵ , ktorá fosforyluje Ser368 je aktivovaná druhými poslami, a to DAG, inozitol-3-fosfátom a mastnými kyselinami (Akita 2002). Podporuje dlhodobo stabilizovať a rovnako aj zvyšovať fosforyláciu Cx43. Podávaním FGF-2 sa obnovujú hladiny fosforylovaného Cx43 vo fosforylačných miestach PKC ϵ (Ser368, Ser262) po ischemicko-reperfúznom poškodení (Srisakuldee et al. 2006).

Ek-Vitorin a kol. (2006) uviedli, že v reakcii na prechodnú ischémiu zvýšená upregulácia PKC ϵ sprostredkovanej fosforylácie Cx43 na Ser368 viedla k zadržaniu GJ v interkalárnych diskoch dokonca aj keď u celkového Cx43 sa zvýšila lateralizácia (Ek-Vitorin et al. 2006). Podobne Srisakuldee a kol. (2009) preukázali, že ischemický *preconditioning* zvýšil PKC ϵ sprostredkovanú fosforyláciu Cx43 na Ser262 a Ser368 a inhiboval lateralizáciu Cx43 po ischemickom insulte (Srisakuldee et al. 2009). Štúdie, ktoré skúmali reguláciu Cx43 v bunkovom cykle, ukázali, že počas S-fázy sa montáž GJ do plazmatickej membrány znižuje a koreluje so zvýšenou fosforyláciou na Ser368 (Solan et al. 2003). Treba však poznamenať, že fosforylácia Cx43 na Ser368 pomocou PKC indukuje uzavretie Cx43 kanálov (Boengler et al. 2006). Okrem toho fosforylácia Cx43 súvisiaca s PKC ϵ v diabetickom srdci bola síce sprevádzaná znížením rýchlosti vedenia, ale s ochranou pred indukovateľnou ventrikulárnou fibriláciou (Lin et al. 2008).

Ser364, Ser365

PKA je serín/threonín kináza, ktorá sa aktivuje účinkom druhého posla cAMP a fosforyluje na Cx43 Ser364 a Ser365. Štruktúrne a biochemicky PKA je jednou z najlepšie charakterizovaných proteinkináz. Rozsiahla expresia PKA podjednotiek je spojená s nespočetnými mechanizmami, pomocou ktorých je cAMP v bunke regulovaný, to dokladá, že signálna kaskáda PKA má všeobecnú dôležitosť pre funkciu bunky. Signálna upstream dráha typicky zahŕňa aktiváciu stimulačných G proteínov cez receptory viazané s G-proteínmi na plazmatickej membráne a následnú aktiváciu adenylcyklázy, ktorá konvertuje ATP na cAMP (Zaccolo 2011).

PKA holoenzým sa skladá z dvoch katalytických (C) a dvoch regulačných (R) podjednotiek. V neprítomnosti cAMP je tetramérny holoenzým neaktívny. U myši existujú dva gény podjednotky C kódujúce izoformy C α a C β a selekcia diferenciálneho promotora vedie k syntéze aspoň dvoch C α (C α 1 a C α 2) (Desseyn et al. 2000; Reinton et al. 2000) a troch C β (C β 1, C β 2 a C β 3) proteínov (Guthrie et al. 1997). Rozdiely medzi PKA katalytickými podjednotkami sú tiež zrejmé zo štúdií na knokautovaných myšiach. Eliminácia izoformy C β 1 vedie k špecifickým defektom v hipokampálnej synaptickej

plasticite (Qi et al. 1996). Strata Ca spôsobuje spomalený rast s extrémnymi deficitmi kinázovej aktivity (Skalhegg et al. 2002).

V rôznych bunkových populáciách je zvýšená koncentrácia cAMP spojená s upreguláciou medzibunkovej komunikácie, ktorá by mohla vyvolať rýchlu montáž GJ na povrchu buniek a tak zvýšiť zabudovanie Cx43 do membrány (Paulson et al. 2000). Burghardt a kol. (1995) taktiež preukázali, že zvýšená hladina intracelulárneho cAMP zvyšuje GJ komunikáciu a permeabilitu Cx43 (Burghardt et al. 1995). Na zvýšenej montáži GJ sa podieľa aktivácia PKA a fosforylácia Cx43 na Ser364, ako je uvedené v štúdií (Tenbroek et al. 2001). Dôležité je, že fosforylácia Ser365 pomocou PKA bola preukázaná ako *gate-keeper*, ktorá stabilizuje GJ plaky prostredníctvom prevencie fosforylácie na Ser368 pomocou PKC a následnej downregulácie GJ komunikácie (Solan et al. 2007).

Ser325, 328, 330

Ser325, Ser328 a Ser330 predstavujú fosforylačné miesta Cx43 regulované CK1. CK1 sa podieľa na rôznych bunkových procesoch. Ukázalo sa, že izoformy rodiny CK1 fosforylujú kľúčové regulačné molekuly, ktoré sa podieľajú na bunkovom cykle, transkripcii a translácii. CK1 izoformy sú kľúčovými regulátormi niekoľkých bunkových procesov rastu a prežitia, vrátane signalizácie p53, kontroly bunkového cyklu, opravy DNA a apoptózy (Koschinski & Zaccolo 2017; Schitteck & Sinnberg 2014).

U ľudí bolo identifikovaných šesť izoforiem CK1 (α , γ 1, γ 2, γ 3, δ a ϵ). Všetky izoformy CK1 majú vysoko konzervovanú kinázovú doménu, ale líšia sa dĺžkou a sekvenciou N-koncových a najmä C-koncových nekatalytických domén. CK1 α hrá úlohu pri tvorbe mitotického vretienka počas bunkového delenia a mechanizmov na opravu DNA a ďalej sa podieľa na metabolizme RNA (Koschinski & Zaccolo 2017; Schitteck & Sinnberg 2014). Izoformy CK1 δ a ϵ sú známe ako dôležité regulátory v cirkadiánnom rytme eukaryotických buniek. CK1 α reguluje apoptotické signálne dráhy, zdá sa však, že existujú rozdiely špecifické pre typ bunky. Okrem zapojenia do apoptotických signálnych dráh majú izoformy CK1 α , δ a ϵ dôležité regulačné funkcie v signalizačnej dráhe Wnt / β -catenin (Cruciat 2014; Valle-Perez et al. 2011)

CK1 indukuje fosforyláciu Cx43 na Ser325, Ser328 a Ser330 a je kľúčovým regulačným mechanizmom pre tvorbu GJ kanálov (Cooper & Lampe 2002). Ďalej bolo preukázané, že tieto špecifické serínové fosforylačné miesta sú fosforylované len vtedy, keď je Cx43 umiestnený v plakoch GJ (Solan & Lampe 2007). V ďalšej podpore dôležitosti fosforylácie týchto špecifických miest, substitúcia Ser325, Ser328 a Ser330 Cx43 za alanín (ktorý napodobňuje konštitutívne defosforylovaný serínový zvyšok) spôsobuje zníženie komunikácie, ako aj oneskorený vývoj elektrického spojenia u fibroblastov myši (Lampe et al. 2006). Tieto údaje spolu preukazujú dôležitosť fosforylácie Cx43 na Ser235, Ser328 a Ser330 pri jeho regulácii začlenení do plazmatickej membrány.

Chronické hemodynamické preťaženie tiež spôsobuje defosforyláciu a delokalizáciu Cx43 u potkanov aj u ľudí, čo môže súvisieť s vývojom fibrilácie predsiení (Rucker-Martin et al. 2006). Okrem toho u myši takéto hemodynamické preťaženie indukované aortálnym zúžením spôsobuje časovo závislé zníženie fosforylácie na Ser325, Ser328, Ser330 spolu s progresívnou stratou Cx43, spomaľovaním rýchlosti vedenia a zvýšením arytmogénie (Qu et al. 2009). Na ďalšie preskúmanie fyziologického významu fosforylácie Ser325, Ser328 a Ser330, Remo a kol. (2011) uskutočnili štúdiu na mutantných knock-in myšiach, kde Ser325, Ser328 a Ser330 boli nahradené buď fosfomimetickými glutamovými kyselinami, alebo nefosfomimetickými alanínmi. Zavedenie kyseliny glutámovej viedlo k remodelácii GJ, v spojení s akútnou ischémiou a chronickým hemodynamickým preťažením. Naproti tomu myši s deficitom fosforylácie, kde Ser325, Ser328 a Ser330 boli nahradené alanínmi, vykazovali zvýšenú náchylnosť na vznik arytmií (Remo et al. 2011).

Ser279 a Ser282

MAPK fosforyluje Cx43 na Ser279 a Ser282 (Warn-Cramer & Lau 2004). MAPKs sú kľúčové signalizačné enzýmy, ktoré sa podieľajú na regulácii rôznych aspektov biológie v eukaryotických organizmoch vrátane bunkového delenia, vývoja, metabolizmu a stresových reakcií. Superrodina MAPK pozostáva z troch hlavných, pričom odlišných signalizačných dráh: ERK, c-Jun N-terminálne kinázy alebo stresom aktivované proteín kinázy a rodina kináz p38 (Pearson et al. 2001).

S použitím purifikovaných proteínov bolo zistené, že MAPK fosforyluje Cx43 priamo *in vitro* a fosforylácia sa vyskytuje na tryptických peptidoch, ktoré spoločne migrujú s podskupinou fosfotryptických peptidov Cx43 získaných z buniek ošetrovaných EGF (Kanemitsu & Lau 1993). Neskoršie štúdie identifikovali Ser255, Ser279 a Ser282 na Cx43 ako cieľové fosforylačné miesta pre aktivovanú MAPK *in vitro* (Warn-Cramer et al. 1996) a preukázali, že tieto miesta sa zdajú byť cieľmi pre MAPK *in vivo* (Warn-Cramer et al. 1998).

V ďalšej štúdií boli Cx43 hemikanály rekonštituované do unilamelárnych lipidových vezikúl a bolo stanovené, že sú permeabilné pre sacharózu alebo luciferové žlté farbivo. Keď boli tieto vezikuly defosforylované pôsobením tel'acej črevnej fosfatázy, bola zvýšená permeabilita lipozómov. Spracovanie lipozómov ošetrovaných fosfatázou s purifikovanou aktivovanou MAPK (ERK 2) indukovalo fosforyláciu Cx43 a výsledkom bolo zníženie permeability Cx43 hemikanálov v rekonštituovanom systéme (Kim et al. 1999). Tieto údaje potvrdili, že Cx43 je priamym cieľom pre aktivovanú MAPK a že fosforylácia sprostredkovaná MAPK na Cx43 je dostatočná pre zníženie regulácie funkcie Cx43.

Fosforylácia Cx43 na Ser279 a/alebo Ser282 prostredníctvom MAPK koreluje so znížením elektrickej vodivosti, podieľa sa na regulácii veľkosti GJ plakov a taktiež zvyšuje internalizáciu Cx43 (Nimlamool et al. 2015). Johnson a kol. (2013) zistili, že fosforylácia na Ser279 a Ser282 narušuje rast GJ plakov spúšťaním kaltrínom sprostredkovanej endocytózy Cx43 (Johnson et al. 2013).

Ser 110, Ser276 a Ser289

Aminokyselinové zvyšky Ser110, Ser276 a Ser289 predstavujú potenciálne ciele PKG, ktoré boli detekované v *in vitro* štúdií v HeLa bunkách (Patel et al. 2006). Aktivácia PKG znižuje elektrickú vodivosť GJ (Kwak & Jongsma 1996). Avšak účinky PKG na fosforyláciu konexínu neboli doposiaľ objasnené.

PKG je aktivovaná všadeprítomným druhým poslom 3',5'-cyklickým guanozínmonofosfátom (cGMP), ktorý reguluje viaceré fyziologické procesy v kardiovaskulárnom systéme. cGMP je tvorený z guanozín trifosfátu špecializovanými

enzýmami nazývanými guanylylcyklázy (GC). Existujú prinajmenšom dve odlišné cesty pre tvorbu cGMP v závislosti na stimulácii. Jeden stimulovaný oxidom dusnatým (NO) a druhý vyvolaný natriuretickými peptidmi (NP) (Chinkers et al. 1989; Takimoto et al. 2005). V bunkách cicavcov a tkanivách existujú GCs v dvoch rôznych formách. Solubilná guanylylcykláza (sGC) je enzým obsahujúci hem, pozostávajúci z dvoch podjednotiek (α a β , ktorá obsahuje doménu viažúcu hem). Partikulárna guanylylcykláza (pGC) je transmembránový proteín bez hemu. Obe izoformy GCs sú zapojené do signalizácie cGMP (Montfort et al. 2017). sGC sú stimulované NO a pozostávajú z dvoch podjednotiek a typicky sa vyskytujú ako heterodimér zložený z väčšej podjednotky α a menšej podjednotky β . (Rastaldo et al. 2007). Zatiaľ čo pGC sú stimulované NP. Existuje najmenej sedem pGC (GC-A až GC-G). Avšak doteraz boli identifikované ligandy len pre tri z nich (GC-A, GC-B a GC-C), zatiaľ čo ostatné pGC majú pôsobiť ako receptory pre ojedinelé ochorenia (Kuhn 2016).

Existujú aspoň tri triedy známych cGMP efektorových proteínov. Po prvé, proteínové kinázy závislé od cGMP (PKG, tiež známe ako cGK) sú dôležitými downregulujúcimi cieľmi cGMP v kardiovaskulárnom systéme. Boli identifikované tri PKG izoformy (PKG I α , PKG I β a PKG typu II), pričom PKG I je hlavnou izoformou v kardiovaskulárnom systéme (Tsai & Kass 2009).

cGMP negatívne moduluje kontraktilitu, urýchľuje relaxáciu a zlepšuje tuhosť srdcových myocytov. Tieto účinky môžu byť sprostredkované priamou PKG fosforyláciou proteínov, vrátane kardiálneho troponínu I, Ca²⁺ kanála L-typu, fosfolambánu a titínu (Tsai & Kass 2009). Úloha PKG v negatívnej inotropii indukovanej cGMP bola preukázaná v štúdiu na srdciach myší bez PKG I. Wegener a kol. (2002) uviedli, že cGMP analógy (8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP) majú negatívne inotropné účinky v kontrolných srdciach, ale nie v srdci bez PKG I, nezávisle od signalizácie cAMP (Wegener et al. 2002).

Dve štúdie jasne demonštrovali úlohu PKG I ako kľúčového negatívneho regulátora srdcovej hypertrofie a remodelácie (Frantz et al. 2013; Zhang et al. 2010). U myší so zníženou aktivitou PKG a nadmernou expresiou fosfodiesterázy 5 sa vyvinula exacerbovaná hypertrofia a remodelácia v reakcii na pretlak a normalizáciu. Aktivita PKG vypnutím nadmernej expresie PDE5 zmierňuje remodeláciu (Zhang et al. 2010).

Zvyšujúce sa dôkazy naznačujú, že signálne dráhy závislé od cGMP hrajú dôležitú úlohu pri inhibícii srdcovej remodelácii a predstavujú sľubný terapeutický cieľ pre liečbu kardiovaskulárnych ochorení.

2.3.2 Tyrozínove fosforylačné miesta

Tyr247 a Tyr265

Fosforylácia konexínov prostredníctvom tyrozínových proteinkináz (najmä Src) je intenzívne študovaným regulačným mechanizmom. Hlavnými regulačnými doménami v-Src sú Src homológie 3 (SH3) a Src homológie 2 (SH2), ktoré sprostredkovávajú interakcie so substrátovými proteínmi. SH3 domény interagujú s peptidovými motívmi bohatými na prolín. SH2 domény sa spájajú s krátkymi aminokyselinovými sekvenciami obsahujúcimi fosfotyrozín. Mutácie v doménach SH3 a SH2 v-Src a v oblasti bohatej na prolín alebo Tyr265 na Cx43 redukovali interakcie medzi v-Src a Cx43 in vivo. Tyrozínová fosforylácia Cx43 bola závislá od asociácie v-Src a Cx43. Tieto výsledky poskytujú ďalšie dôkazy pre priame zapojenie v-Src do tyrozínovej fosforylácie Cx43 a inhibíciu medzibunkovej komunikácie v bunkách transformovaných v-Src (Kanemitsu et al. 1997).

Zníženie GJ komunikácie u Src transformovaných buniek bolo prvýkrát popísané v roku 1966 (Loewenstein & Kanno 1966). Kombinácia genetických a biochemických dôkazov ukázala, že Src môže priamo fosforylovať Cx43. Najprv SH3 doména Src viaže oblasť bohatú na prolín na Cx43. To prináša Src kinázovú doménu do tesnej blízkosti Tyr265, ktorý je potom fosforylovaný Src. Fosforylovaný Tyr265 ponúka miesto pre Src, SH2 doména a táto zvýšená interakcia spôsobuje fosforyláciu Tyr247 na Cx43, ktorá môže prispieť k redukcii GJ komunikácie. V štúdií kde boli Tyr247 a Tyr265 nahradené fenylyalanínom v Cx43-knockoutovaných bunkách, neboli schopné prerušiť GJ komunikáciu, čo naznačuje, že Tyr247 a Tyr265 sú dôležité pre potlačenie GJ komunikácie Src kinázou (Lin et al. 2001).

Pokiaľ ide o účinky v-Src na Cx43, väčšina dôkazov naznačuje, že v-Src interaguje priamo s Cx43 prostredníctvom SH3 a SH2 domén a potom fosforyluje Cx43 na Tyr265 a Tyr247, čím sa spúšťa zatváranie GJ kanálov (Lau 2009).

Podobne ako u v-Src bolo preukázané, že aktivácia c-Src spôsobuje priamu fosforyláciu Tyr265, čo vedie k zníženiu elektrickej vodivosti pri absencii zmien v množstve GJ kanálov Cx43 (Giepmans et al. 2001). Lin a kol. (2001) preukázali, že fosforylácia samotného Tyr265 nie je dostatočná na úplné zatvorenie GJ kanálov. Namiesto toho je nevyhnutná fosforylácia nielen na Tyr265, ale aj na Tyr247, aby sa narušila metabolická väzba GJ Cx43 (Lin et al. 2001).

Na druhej strane, Tyr265 sa tiež podieľa na regulácii interakcie medzi Cx43 a cytoskeletovým proteínom ZO-1 (Toyofuku et al. 2001). ZO-1 je dôležitý pre lokalizáciu Cx43 v interkalárnych diskoch srdca, a preto prerušenie interakcie Cx43-ZO-1 znižuje množstvo Cx43 na bunkovom povrchu. Duffy a kol. (2004) zistili, že intracelulárne okyslenie v astrocytoch spôsobuje internalizáciu Cx43 sprevádzanú znížením viazaním s ZO-1 a zvýšenou väzbou Src na Cx43 (Duffy et al. 2004). Okrem toho sa predpokladá, že tyrozínová fosforylácia Cx43 hrá úlohu pri srdcových arytmiách spôsobených buď zvýšenou aktiváciou renín-angiotenzín-aldosterónového systému, alebo metabolickou inhibíciou. Konkrétnejšie sa ukázalo, že liečba inhibítorom c-Src prerušuje angiotenzínom II. sprostredkovanú zníženú vodivosť GJ kanálov Cx43 a tak znižuje riziko ventrikulárnej tachykardie u myši s nadmernou expresiou enzým konvertujúceho angiotenzínu (Sovari et al. 2011).

2.4 Úloha Cx43 v patologických stavoch a v kardioprotekcii

Existuje stále viac dôkazov o dôležitej úlohe Cx43 pri vývoji fenotypu rezistentného na poškodenie buniek vrátane kardiomyocytov. Cx43 vytvára hemikanály, ktoré sa môžu otvárať ako odpoveď na elektrické a chemické spúšťače, ale taktiež aj počas ischémie (Kondo et al. 2000), zníženého redoxného stavu (Retamal et al. 2007), mierneho zvýšenia Ca^{2+} (<500 nM) (Wang et al. 2012) a mechanického stresu (Batra et al. 2014).

Podobne ako ischemický *preconditioning*, tak ischemický alebo farmakologický *postconditioning* znižuje veľkosť infarktu a zachováva expresiu a fosforyláciu Cx43 myokardu počas následnej ischemie (3 cykly reperfúzie 10s striedavo s 10s ischemiou) v srdci potkana (Wu et al. 2012; Zhao et al. 2013). V niektorých štúdiách však bola miera imunopozitivity Cx43 počas trvalej ischemie (15 až 45 min) neovplyvnená ischemickým *preconditioningom* (Muhlfeld et al. 2010) a taktiež bolo znížené zatváranie GJ (Jain et al. 2003).

Nahradenie Cx43 pomocou Cx32 u myší znížilo veľkosť infarktu po ischemicko-reperfúznom (I/R) poškodení (Rodriguez-Sinovas et al. 2010). Trvalé otvorenie hemikanálov Cx43 po I/R poškodení v kombinácii s reziduálnou GJ komunikáciou prispieva k nevratnému poškodeniu myokardu (Garcia-Dorado et al. 2004). Zaujímavé je, že u kultivovaných kardiomyocytov sa rýchlosť apoptózy skôr zvýšila, než poklesla, keď sa znížila GJ komunikácia (Yasui et al. 2000).

Cx43 má taktiež dôležité postavenie v rôznych srdcových ochoreniach. Chronické ochorenie srdca vrátane hypertrofie a srdcového zlyhania je spojené s vznikom arytmií, ako aj s poklesom celkového Cx43 a zvýšeného defosforylovaného Cx43 (Severs et al. 2008). Prevencia účinku proteín fosfatázy 1 v poruche srdca, pri ktorej by sa očakávalo zvýšenie základných hladín fosforylácie Cx43, má za následok významné obnovenie kontraktilnej funkcie srdca (Pathak et al. 2005). Pri zlyhaní srdca je celková expresia Cx43 znížená, rovnako ako expresia Cx43 v GJ nezávisle od príčiny srdcového zlyhania (Wang et al. 2012). Podobne, v tkanivových vzorkách zlyhania srdca (dilatačná alebo ischemická kardiomyopatia), expresia Cx43 je redukovaná a Cx43 je redistribuovaný mimo GJ (Dupont et al. 2001).

Údaje z klinickej štúdie na pacientoch s mutáciami v Cx43, rovnako ako dáta získané na modeloch myší podporujú úzky vzťah medzi remodeláciou konexónu a tvorbou arytmogenného substrátu (Gustein et al. 2001; Thibodeau et al. 2010). V prípade zníženia GJ sa vedenie stáva vysoko diskontinuálne, čo môže vytvoriť základ pre *reentry* arytmie (Kanno & Saffitz 2001).

Abnormálna architektúra tkaniva, napr. v dôsledku zvýšenia fibrózy, môže mať synergické účinky spolu so zníženou expresiou Cx43, a tak viesť k spomalenému vedeniu (Fontes et al. 2012). Zmena Cx43 v množstve, fosforylácii a distribúcii môže spôsobiť srdcové elektro-vodivé poruchy a viesť eventuálne k arytmiám. Predchádzajúce štúdie preukázali, že remodelácia Cx43 môže prispieť k medzibunkovému Ca^{2+} preťaženiu, ktoré je spojené s indukciou ischemickej arytmie (Gao et al. 2016).

Za zmienku stojí, že dlhodobé podávanie atorvastatínu, melatonínu a n-3 polynenasycených mastných kyselín (n-3 PUFA) bolo sprevádzané pozitívnou moduláciou fosforylovaného stavu Cx43 (tj. vylepšenie či normalizácia), ktorý bol spojený s útlmom abnormálnej distribúcie Cx43 súvisiacou s ochranou voči ventrikulárnej fibrilácií (Bacova et al. 2010; Radosinska et al. 2013).

Za rôznych patologických stavov dochádza k zmenám v expresii konexínov, a taktiež k zmenám ich funkčných vlastností vplyvom posttranlačných modifikácií, čo ovplyvňuje vodivosť a pravdepodobnosť otvárania konexónu (pre prehľad, Ferreira, Mochly-Rosen and Boutjdir, 2012). Zníženie expresie Cx43 spôsobuje spomalenie a abnormálne vedenie vzruchu. Dochádza tiež k tzv. generovaniu arytmogenného substrátu, čo je dôležitý faktor pre tvorbu arytmií. Bol testovaný antiarytmický peptid (rotagaptid alebo ZP123), ktorý bol Zealand Pharma na kardiovaskulárne použitie a vykazoval ochranné účinky prostredníctvom zostupných zmien fosforylácie Cx43. Ukázalo sa, že tieto peptidy inhibujú ischemiou indukovanú arytmiu a infarkt myokardu (Hennan et al. 2006).

Existujú štúdie, ktoré poukazujú na ďalšie možné kardioprotektívne intervencie, ktoré ovplyvňujú Cx43. Naša práca ako prvá ukázala, že antiarytmický účinok intermitentnej hypoxie je spojený so zmenou expresie a fosforylácie Cx43 (Kohutova et al. 2019, in press).

2.5 Arytmie a konexíny

Ochorenia srdca predstavujú zhruba 50 % všetkých kardiovaskulárnych úmrtí v ľudskej populácii. Kardiovaskulárne ochorenia predstavujú obrovské zaťaženie verejného zdravia a významné príčiny úmrtnosti v dôsledku kontraktilného srdcového zlyhania a arytmií, pričom výskyt rizikových faktorov u mladých ľudí je alarmujúci (Andersson & Vasan 2018).

U ľudí je známe, že výskyt fibrilácií sa zvyšuje vekom alebo v kardiomyopatickom srdci. Tieto stavy sú charakterizované remodeláciou štruktúry myokardu, pretože srdce mení svoju štruktúru a funkciu v reakcii na starnutie, ochorenie alebo zranenie. Takto mení štruktúru kardiomyocytov a extracelulárnej matrice aktiváciou intracelulárnych signalizačných kaskád. Výsledkom je hypertrofia a/alebo fibróza myokardu (Tribulova et al. 1999). Dôležité je, že štrukturálna remodelácia myokardu je sprevádzaná aj remodeláciou GJ kanálov (Tribulova et al. 1999; Tribulova et al. 2002), ktorá môže byť vyvolaná zmenami v signalizačných molekulách ako odpoveď na celkovú remodeláciu (Teunissen et al. 2004). Vo všeobecnosti remodelácia GJ kanálov, t.j. zmena v topológii GJ kanálov súvisí s elektrickou remodeláciou prispievajúcou k zmenám vedenia (Spach et al. 1982), a preto je považovaná za arytmogénny substrát.

Analýza tkaniva myokardu odhalila patologické substráty vrátane poklesu a misslokácie GJ, ktoré korelovali s lokalizáciou *reentry* okruhov v hraničnej zóne infarktu (Peters et al. 1997). Zaujímavé je, že myši s deficienciou Cx43 vykazovali výrazné spomalenie vedenia GJ, ktoré uľahčuje vznik *reentry* arytmií a náhlu arytmiickú smrť (Gustein et al. 2001). V prípade potkanov trpiacich na diabetes melitus (Okruhlicova et al. 2002), spontánnu hypertenziu alebo L-NAME-indukovanú hypertenziu (Tribulova et al. 2002; Tribulova et al. 2003) bola pozorovaná abnormálna distribúcia pozitívnych GJ spojení Cx43 so zvýšenou citlivosťou na hypokalémiu vyvolanú ventrikulárnu fibriláciu. Kým diabetes bol spojený s fibrózou myokardu, mladé spontánne hypertenzné potkany boli charakterizované hypertrofiou ľavej komory a L-NAME indukovaná hypertenzia bola sprevádzaná ako hypertrofiou, tak aj fibrózou srdca (Fialová et al. 2008; Tribulova et al. 2002).

Zdá sa, že štrukturálna remodelácia je spojená s elektrofyziologickou remodeláciou GJ, čím sa môže vytvoriť arytmogénny substrát na spúšťanie a udržanie srdcových arytmií (Severs 2001; Teunissen et al. 2004). Myokardiálna remodelácia GJ so zvýšenou citlivosťou na VF bola pozorovaná aj u hypertriglyceridemických potkanov (Tribulova et al. 2006) a na experimentálnom modeli metabolického syndrómu (Zicha et al. 2006).

Zistenia naznačujú, že štrukturálne substráty pre mechanizmus opätovného vzniku fibrilácií srdca zahŕňajú nielen remodeláciu architektúry myokardu (hypertrofia, fibróza),

ale aj remodeláciu GJ (abnormálna distribúcia, znížený počet). Výskyt ventrikulárnych fibrilácií je vyvolaný akútnymi udalosťami, ktoré vyvolávajú náhle poruchy elektrolytovej homeostázy, preťaženia Ca^{2+} a defosforylácie Cx43, čím zhoršujú (alebo dokonca blokujú) GJ komunikáciu. Heterogénna distribúcia myokardu už existujúcich abnormalít GJ spojenia v dôsledku veku, alebo ochorenia a náhla dysfunkcia spojovacích kanálov v dôsledku akútnych patofyziologických stavov významne prispieva k elektrickej nestabilite myokardu, čo spôsobuje, že srdce je náchylné k vzniku malígnych arytmií.

2.6 Kardioprotektívne účinky hypoxie

Chronická hypoxia je stav, kedy je organizmus vystavený dlhodobo hypoxickým podmienkam, na ktoré sa adaptuje. Najbežnejším modelom pre výskum systémovej chronickej hypoxie je vysokohorské prostredie, ktoré sa dá simulovať laboratórnymi podmienkami v hypobarických (zníženie pO_2 čiastočným odčerpaním vzduchu) a v normobarických (zvýšený parciálny tlak dusíka) komorách. Adaptácia v hypobarickej komore sa dá považovať za presný model výškové hypoxie (napr. $\text{pO}_2 = 8,5$ kPa, 7000 m). Ukázalo sa, že k rozvoji zmien stačí i každodenná niekoľkohodinová expozícia, tzv. intermitentná hypobarická hypoxia (IHH) (Ostadal & Kolar 2007).

Chronické pôsobenie hypoxie, ktoré vedie k zefektívneniu fyziologických a metabolických mechanizmov v reakcii na dlhodobo znížený prísun kyslíka, vyvoláva radu adaptívnych zmien v myokarde, ktoré sú protektívne. V oblasti kardioprotekcie bolo preukázané, že adaptácia na chronickú hypoxiu vedie k viacerým pozitívnym fyziologickým prejavom: znižuje výskyt komorových arytmií (Asemu et al. 2000), znižuje veľkosť infarktu (Neckar et al. 2002), zlepšuje návrat kontraktilnej funkcie (Asemu et al. 1999; Wang et al. 2012). Výsledkom adaptácie na chronickú hypoxiu CNH boli aj zvýšené hladiny HK1 a HK2 proteínov a celková HK aktivita po ischémii v porovnaní so zodpovedajúcou normoxickou skupinou. Podobne srdce vykazovalo zvýšenú ischemickú hladinu Akt proteínu fosforylujúceho Ser473 (Kolar et al. 2017). Podobne sa zvýšila expresia po IHH a najviac došlo k zvýšeniu asociácie oboch HK1 aj HK2 isoformami s mitochondriami. To môže mať za následok zvýšenie dodávky adenosíndifosfát (ADP) pre ATP syntázu a primerané zníženie membránového potenciálu a teda zníženiu produkcie ROS (Waskova-Arnostova et

al. 2015). Bolo preukázane, že zvýšený výskyt arytmií je úzko spojený so zvýšenou produkciou ROS mitochondriami (Brown & Rourke 2010). Zvýšená asociácia HK môže teda súvisieť s antiarytmickým účinkom IHH.

V niekoľkých prípadoch bolo i potvrdené zlepšenie kontraktálnych funkcií pravej a ľavej komory srdca po ischemickom stimule na pokusoch *in vivo i ex vivo* (Neckar et al. 2002; Zhong et al. 2002). Neckar a kol. (2004) ukázali, že protektívny účinok IHH na veľkosť infarktu pretrváva aj niekoľko týždňov po ukončení expozície a návratu k normoxickým podmienkam, avšak antiarytmický efekt pretrváva iba niekoľko dní (Neckar et al. 2004).

K zmenám dochádza aj na molekulárnej úrovni, kde bolo preukázané, že na protektívnom fenotype indukovanom IHH sa uplatňujú aj ROS. Podanie antioxidantu N-acetylcysteínu v priebehu adaptácie, prakticky eliminovalo protektívny účinok IHH (Kolar et al. 2007). Ďalej bolo potvrdené, že v mechanizme kardioprotekcie sa taktiež uplatňujú mitochondriálne K-ATP kanály a Ca²⁺ aktivované K⁺ kanály. Tieto kanály sa nachádzajú na vnútornej membráne mitochondrií. Chronická hypoxia spôsobuje zvýšenú aktivitu týchto kanálov a s tým spojený zvýšený vtok K⁺ do mitochondrií vyvolávajú zníženú tvorbu ATP, čím normalizuje produkciu ROS (Neckar et al. 2002; Borchet et al. 2011). V signálnych dráhach indukovaných adaptáciou na IHH sa taktiež uplatňuje celá rada proteínkináz ako napr. PKC (Neckar et al. 2005; Hlavackova et al. 2010), ERK 1/2 a p38 kinázy (Micova et al. 2017) a fosfatidylinozitol-3-kináza/proteínkináza B (PI3/AKT) (Ravingerova et al. 2007), ktorá je mimo iné spojená s mitochondriálnou hexokinázou (Waskova-Arnostova et al. 2015).

Niekoľko štúdií taktiež preukázalo antiarytmický účinok vyvolaný adaptáciou na chronickú hypoxiu. Meerson a kol. (1987, 1989) ako prví ukázali, že adaptácia potkanov na miernu intermitentnú výškovú hypoxiu (5000 m) znižuje výskyt závažných ischemických arytmií, avšak len na modeli srdca *in situ* u anestetizovaného umelo ventilovaného zvieratá (Meerson et al. 1987; Meerson et al. 1989). Neskoršie štúdie zistili, že adaptácie na miernu intermitentnú výškovú hypoxiu u modelu izolovaného perfundovaného srdca vedie k zníženiu závažnosti ischemických a reperfúzných arytmií, a ich celkového počtu (Asemu

et al. 1999; Asemu et al. 2000). Taktiež bol preukázaný antiarytmický efekt n-3 PUFA po adaptácii na IHH (Jezkova et al. 2002).

2.6.1 Úloha Cx43 u ischemiou indukovaných arytmií

Ako bolo uvedené vyššie, remodelácia GJ je spoločným znakom srdcových patológií a môže byť rýchlo indukovaná ischemiou. Zvyčajne dochádza ku strate Cx43 v interkalárnom disku a často k posunu k bočným okrajom kardiomyocytov v procese označovanom ako lateralizácia (Beardslee et al. 2000). Znížená medzibunková komunikácia môže zvýšiť sklon k arytmiám v dôsledku dysfunkcie a dezorganizácie Cx43, pričom arytmie sú častou komplikáciou infarktu myokardu u ľudí.

Ischemické poškodenie srdca je veľmi častou príčinou orgánovej dysfunkcie u ľudí. Ischémia je stav, kedy prietok krvi klesá pod 50 % normálu. Prejavuje sa akumuláciou metabolitov v extracelulárnom priestore v kombinácii so zníženou dodávkou kyslíka. Anaeróbny metabolizmus a nedostatočný tok spôsobuje extra- a intra-celulárnu acidózu so zvýšeným extracelulárnym K^+ . Ischémia vyvoláva zatváranie GJ kanálov, kvôli zvýšenej koncentrácii cytozolového Ca^{2+} , acidózy (Ek-Vitorin et al. 1996), zníženej koncentrácii ATP, zmenám vo fosforylácii Cx43, okysľovaniu (Johansen et al. 2011), pozmenenému stavu fosforylácie (Ek-Vitorin et al. 2006) a iných faktorov súvisiacich s ischemiou. Okrem toho sú konexíny remodelované v dôsledku procesov, ktoré zahŕňajú redistribúciu konexínového proteínu (Chkourko et al. 2012), zmenené zabudovanie do membrány (Remo et al. 2011) a lateralizáciu (Smyth et al. 2014). Lateralizácia Cx43 predstavuje defosforyláciu, zatiaľ čo fosforylované formy Cx43 zostávajú v oblasti interkalárnych diskov. Tieto akútne ischemické zmeny fosforylácie Cx43 sú spôsobené v dôsledku degradácie Cx43 (Huang et al. 1999), ktoré sa zhodujú s rozvojom arytmií.

Z literárnych údajov vyplýva, že významnú úlohu v rozvoji I/R arytmií hraje Cx43 (Boengler et al. 2006). Významné je, že obnovenie kontraktilnej funkcie na izolovaných perfundovaných srdciach po I/R inzulte úzko súvisí so znovu obnovením fosforylácie Cx43 v priebehu reperfúzie (Beardslee et al. 2000). Tri kinázy Akt, ERK1/2 a PKC hrajú dôležitú úlohu v remodelácii Cx43, kde môžu zmeniť rozsah infarktu myokardu v reakcii na I/R

poškodenie srdca. Akt aj ERK1/2 sú súčasťou dráhy nazývanej *reperfusion injury salvage kinase*. Spatiotemporálna regulácia týchto kináz je schopná zmeniť rozsah poškodenia srdcového tkaniva (Hausenloy & Yellon 2003). Ďalej sa preukázalo, že PKC hrá dôležitú úlohu pri *prekondicioningu*, pretože PKCε knockoutované myši nereagovali na *prekondicioning* (Hund et al. 2007). V prípade PKCε knockoutovaných myšiach sa zdá, že stabilita spojenia medzi GJ je kritická pre fenotyp *prekondicioningu*. Cx43 je teda umiestnený na križovatke medzi aktiváciou kináz, stabilitou GJ a bunkovým poškodením. Tak ako bolo vyššie zmienené, IHH ovplyvňuje expresiu všetkých už spomenutých kináz.

2.7 Hexokináza v kardioprotekcii

V srdci sú exprimované tri izoformy Hexokinázy (HK1, 2, 3), ktoré sa líšia svojou afinitou k substrátu a katalytickou aktivitou. Isoformy HK1 a HK2 majú veľkosť okolo 100 kD a sú považované v srdci za dominantné (Pedersen et al. 2007). HK1 je považovaná za všade prítomnú a HK2 je typická pre tkanivá senzitivne k inzulínu (Heikkinen et al. 2000). Hexokináza, ako prvý enzým glykolýzy, je významná tým, že reguluje svojou aktivitou vstup glukózy do kardiomyocytov a fosforyláciu glukózy na glukózo-6-fosfát. To udržuje energetickú homeostázu kardiomyocytov prepojením glykolýzy s beta oxidáciou mastných kyselín. Vedľa toho je už mnoho rokov HK známa svojimi cytoprotektívnymi účinkami, pokiaľ je lokalizovaná v oblasti mitochondrií (John et al. 2011). Obe izoformy HK1 a HK2 sa môžu viazať na vnútornú mitochondriálnu membránu svojou N-terminálnou doménou, tak, že interagujú priamo s napäťovo závislým aniontovým kanálom (VDAC), ktorý komunikuje s adenín nukleotidovou translokázou na vnútornej mitochondriálnej membráne (Vyssokikh & Brdiczka 2003). V tomto mieste sa tiež často vyskytuje mitochondriálna kreatínkináza a tvorí tzv. kontaktné miesta obidvoch membrán (Rose & Warms 1967). Hexokináza naviazaná na mitochondrie umožňuje prednostný metabolický tok ADP, ako produktu svojej reakcie do mitochondrií za súčasného využitia ATP produkovaného mitochondriami pre fosforyláciu glukózy. Táto väzba súčasne znižuje inhibíciu aktivity svojím produktom glukózo-6-fosfátom (Arora & Pedersen 1988; Sun et al. 2008). Neskôr bolo zistené, že v srdci je táto interakcia u HK1 konštitutívna a u HK2 nastáva iba za zvláštnych fyziologických podmienok ako je zvýšená stimulácia inzulínom, glukózou, morfinom a / alebo v experimentálnych podmienkach ischemickým

preconditioningom (Zuurbier et al. 2005). Nedávno bolo ukázané, že túto interakciu stimuluje tiež IHH (Waskova-Arnostova et al. 2015). Samotná expresia je veľmi plastická a prechádza dynamickými zmenami v rôznych patologických stavoch, ako je napríklad diabetes typu I (Gurel et al. 2013). Spolu s tým bol pozorovaný nárast expresie a aktivácie Akt kinázy a PI3 kinázy, tj. upstream kinázy Akt (Lee & States 2006). A práve Akt bola neskôr spojená s fosforyláciou HK2 na Tyr473, ktorá uľahčuje asociáciu HK2 s mitochondriami za stresových podmienok.

Táto interakcia má veľký význam v modulácii mitochondriálnej funkcie v zmysle produkcie ATP, mitochondriálneho membránového potenciálu, a produkcie ROS a bol preukázaný protektívny efekt na mnohých tkanivách a bunčných typoch (Bryson et al. 2002; Da-Silva et al. 2004). Tento efekt sa prejavuje najmä na úrovni zníženia pravdepodobnosti aktivácie apoptózy, prevencie rozvoja hypertrofie srdca (Wolf et al. 2011; McCommis et al. 2013). Hypertrofia srdca vyvolaná vysokou stimuláciou adrenergnej signalizácie bola znížená nadmernou expresiou HK2. Predpokladá sa, že tento efekt je založený na princípe zníženia produkcie ROS mitochondriami. Vzhľadom k indukcii arytmií vplyvom vysokého oxidačného stresu, môžeme uvažovať aj o prevencii alebo znížení výskytu arytmií. Na rovnakom princípe sa odhaduje zníženie pravdepodobnosti otvorenia prechodného mitochondriálneho póru (Rasola et al. 2010). A súčasne ochranou pred naviazaním proapoptotických proteínov Bax na VDAC (Majewski et al. 2004). Pre nás bola HK/Akt dráha centrom záujmu v krátkodobej ischémii, kde nedošlo k I/R poškodeniu u zvierat adaptovaných na chronickú hypoxiu (Kolar et al. 2017).

2.8 Potenciálne protektívne účinky chladu

Naše predbežné výsledky na chladovej adaptácii ukázali, antiarytmický efekt chladovej aklimatizácie po expozícii 5 týždňov (Vebr P., *Lipidomická konferencia 2018, Praha*).

Existuje niekoľko štúdií, ktoré venujú pozornosť zvýšenému kardiovaskulárnemu riziku akútnemu chladu, pretože existuje úzka korelácia medzi akútnou expozíciou chladu a úmrtnosťou spôsobenou srdcovým ochorením počas zimných mesiacov. Aklimatizácia na chlad zlepšuje imunitnú odpoveď, termoreguláciu, vaskulárnu reaktivitu

a má hypolipidemický účinok. Aklimatizácia na chlad u zvierat i u dospelých mužov vedie k vzniku hnedého tukového tkaniva (BAT), zvýšenej expresii odpojovacích proteínov prevažne v BAT a tiež v iných tkanivách, čo vedie k netriaškovej, primárne k triaškovej termogenéze. Bolo zistené, že aj noradrenalín a adrenalín sú termogénne, zatiaľ čo len termogenéza indukovaná adrenalínom bola zosilnená adaptáciou na chlad (Jansky et al. 2008; Jansky & Jansky 2002).

Tyroidné hormóny (TH), adrenálne hormóny a sympatický nervový systém udržiavajú a kontrolujú oxidatívnu fosforyláciu, ktorá je aktivovaná hlavne v BAT, v bielom tuku a v tkanivách kostrových svalov aklimatizáciou na chlad. Je zrejmé, že zvieratá, ktorým bola odstránená štítna žľaza alebo nadobličky, netolerujú chlad (Pääkkönen & Leppäluoto 2002), avšak torakotómia TH po dvoch mesiacoch aklimatizácie na chlad neovplyvnila vitalitu potkanov počas následnej aklimatizačnej doby (Zaninovich et al. 2003).

Trvanie aklimatizácie na chlad sa môže rozdeliť na dve fázy, ktoré sa líšia v β -adrenergnej aktivite. Prvá fáza sa vyznačuje zvýšenou β -adrenergnou aktivitou a objavuje sa tvorba BAT. Druhá fáza nastáva, keď bunková β -adrenergná odpoveď nie je odlišná od kontrol a metabolická homeostáza je udržiavaná rôznym mechanizmom (Xing et al. 2014), pravdepodobne zvýšeným účinkom TH, ktorý je stimulovaný chronickou expozíciou na chlad (Fiedler et al. 2006).

2.8.1 Adrenergná signalizácia v srdci a Cx43

V srdci sú prítomné 3 podtypy β -adrenergných receptorov (β -AR), β 1-, β 2- a β 3-, ktoré sú vyjadrené približne v pomere 70:27:3 v kardiomyocytoch. β 1-AR sa spájajú s G-stimulujúcimi proteínmi (Gs) a adenylecyklázou (AC) a ich stimulácia vedie k akumulácii cAMP a aktivácii PKA. PKA fosforyluje niekoľko proteínov, ktoré sú zapojené do EC väzby. Podobne sú β 2-AR a pravdepodobne aj β 3-AR spojené s proteínmi Gs. Napriek prevažujúcej expresii β 1-AR je všeobecne akceptované, že β 2-AR subtyp spôsobuje väčšiu stimuláciu AC ako subtyp B1 v kardiomyocytoch. Okrem toho môže β 2-AR tiež spájať s G inhibičnými proteínmi (Gi) za istých podmienok, a tak ovplyvňovať PI3K/Akt a ERK/ Cytosólovú fosfolipázu A₂ (cPLA₂), ktoré sa obe zúčastňujú na ochrannom mechanizme v srdci. Ich stimulácia ovplyvňuje expresiu génov transkripčných faktorov

a má antiapoptotické účinky (Lohse et al. 2003). cPLA₂ bola identifikovaná ako nová signálna dráha β₂-AR v srdci a môže byť aktivovaná aj β₃-AR. Tento enzým je aktivovaný submikromolárnou koncentráciou Ca²⁺ a vykazuje jedinečnú selektivitu pre kyselinu arachidonovú (AA) v sn-2 pozícii fosfolipidov (Leslie 2004). Vo všetkých bunkových typoch hrá dôležitú úlohu pri hormónom indukovanom uvoľňovaní AA po aktivácii p38 a ERK1/2 MAPK závislej od Gi proteínov citlivých na toxín pertussis (Magne et al. 2001). Aktivácia cPLA₂ prostredníctvom ERK zvyšuje jej súvislosť s ER, Golgiho a jadrovými membránami, kde katalyzuje hydrolýzu fosfolipidov vedúcu k uvoľneniu AA. AA môže pôsobiť ako signalizačná molekula ovplyvňujúca funkciu rôznych iónových kanálov zapojených do elektricko-kontrakčnej väzby v srdci (Meves 2008).

Aktivácia sympatického nervového systému je bežným patofyziologickým znakom kardiovaskulárnych ochorení, ako je hypertenzia a chronické zlyhanie srdca. Prechodná aktivácia sympatického nervového systému zvyčajne spôsobuje smrteľné arytmie v chorom srdci. Zaujímavé je, že narušená štruktúra GJ spojenia a znížená expresia Cx43 sú tiež často pozorované v srdcovej remodelácii v reakcii na rôzne patologické podnety, ako je ischémia u psov (Huang et al. 1999). Agonista α-adrenergického receptora fenylefrín zvyšuje expresiu Cx43, ale nie expresiu Cx40 a Cx45, u neonatálnych srdcových myocytov potkana, čo má za následok zvýšenú intracelulárnu vodivosť. Tieto účinky boli úplne potlačené selektívnym α_{1D}-antagonistom BMY7378, čo naznačuje, že α_{1D}-adrenergický receptor sprostredkoval tento účinok (Rojas Gomez et al. 2008). Nedávna správa ukázala, že blokáda β₂-AR vyvolala väčšie zníženie izoproterenolom sprostredkovaného zvýšenia komorovej kontraktility u psov, ktoré boli náchylné na komorové fibrilácie, ako u psov, ktoré boli rezistentné voči týmto malígnym arytmiám. Mechanizmus môže byť taký, že aktivácia β₂-AR zvyšuje prúd Ca²⁺ bez zmeny reabsorpcie Ca²⁺ prostredníctvom sarkoplazmatického retikula, čo môže vyvolať arytmie. Aktivácia β₂-AR teda má tendenciu znižovať elektrickú stabilitu srdca, čím zvyšuje sklon k arytmiám (Billman et al. 2006).

Salameh a kol (2009) študovali expresiu Cx43 počas stimulácie β-adrenoceptorov u neonatálnych kardiomyocytov potkanov. V tejto štúdií, izoprenalín stimuloval hladiny Cx43 na úrovni mRNA a proteínov, ako aj fosforyláciu MAPK, p38, ERK 1/2 a ich cieľového proteínu Cx43. Ďalej, izoprenalín indukoval translokáciu aktivátora

transkripčných faktorov proteínu 1, proteínu viažúceho element cAMP a jadrový faktor aktivovaných T-buniek do jadra a táto translokácia bola zrušená inhibíciou MAPK. V druhej časti štúdie autori zistili znížené hladiny Cx43 u pacientov s dilatálnou kardiomyopatiou a zvýšené hladiny Cx43 u pacientov s hypertrofickou kardiomyopatiou, hoci latentizácia Cx43 bola zvýšená v oboch skupinách (Salameh et al. 2009).

2.8.2 Tyroidné hormóny a Cx43

Účinok TH na kardiovaskulárnu funkciu je už dlho známy. Nedávno sa pozornosť venovala úlohe TH ako nezávislého determinanta funkčného zotavenia po infarkte myokardu. Nové dôkazy sa sústreďujú na dôležitosť TH v odpovedi srdca na ischemický stres, remodeláciu srdca a jeho potenciálnu úlohu pri obnovení myokardu po I/R poškodení (Pantos et al. 2012).

Pokiaľ ide o stres vyvolaný chladom, pôsobenie TH je potrebné na indukciu tvorby BAT počas aklimatizácie na chlad. V súlade s β -adrenergnou stimuláciou, ktorá vedie k zvýšenej tvorbe triódtyronínu (T3), čo je najaktívnejšia forma TH prostredníctvom stimulácie aktivity izoforiem iódotyronín diodinázy (D), čo naznačuje potenciálnu aktiváciu β -adrenergnej štítnej synergie (Kim et al. 2004). T3 ovplyvňuje mnoho procesov v živých organizmoch, vrátane metabolizmu lipidov a sacharidov, hladiny lipidov v plazme, koagulácie, zápalu, proteolýzy a apoptózy. Tieto účinky sa dosahujú prostredníctvom väzby na tyroidné hormón response elementy (TREs) cieľových génov T3 prostredníctvom interakcie s TH nukleárnymi receptormi (TR α 1 a TR β 1) (Huang et al. 2008).

Cieľové gény T3 v srdci ovplyvňujú metabolické procesy, riadia kontrakčne-relaxačný cyklus stimuláciou expresie Ca²⁺ ATP-ázy (SERCA) a ľahkého reťazca myozínu α (Arnostova et al. 2011; Radosinska et al. 2013), mitochondriálnu biogenézu a dýchanie expresiou cytochrómu C1, adenínového nukleotidového translokátora (Luciakova & Nelson 1992).

Hladina aktívneho T3 v srdci je výsledkom rovnováhy medzi dostupnosťou a degradáciou T3, ktorá je regulovaná niekoľkými mechanizmami. Zatiaľ čo vyššie aktivity D1 a D2 zvyšujú tvorbu T3, vyššia aktivita D3 vedie k zvýšenej degradácii T3. Okrem zmien enzýmových aktivít rôznych izoforiem diodinázy môže byť hladina T3 ovplyvnená

aj zmenou vychytávania TH, TH membránovými transportérmi a TH jadrovými receptormi a ich koaktivátormi v srdcovom tkanive. Ukázalo sa, že zvýšená aktivita T3 môže zlepšiť funkciu zlyhávajúceho srdca (Gerdes & Iervasi 2010).

TH sú výkonné modulátory funkcie srdca. Bunkový účinok TH je z veľkej časti odvodený z jeho dlhodobých účinkov, ktoré vedú k tyreotoxikóze a hypotyreóze. Klinické štúdie naznačujú, že nadbytok TH zvyšuje riziko predsieňovej fibrilácie a ventrikulárnych arytmií, zatiaľ čo hypotyreóza môže mať za následok vznik aterosklerózy a srdcové zlyhanie (Gao et al. 2016). Na druhej strane sa nedávno zdôraznila kardioprotektívna úloha TH v zložitosti postischemickej choroby srdca (Rajagopalan et al. 2016). Predpokladá sa, že akútne účinky TH sú sprostredkované priamou väzbou na cieľové proteíny alebo ovplyvňujú intracelulárnu signalizáciu (Rybin & Steinberg 1996; Iordanidou et al. 2010) a následnú reguláciu otvárania iónových kanálov (napríklad prostredníctvom PKA, fosforylácie PKC). Dôkazy naznačujú, že tieto akcie, ako aj modulácia elektrickej väzby sprostredkovaná medzibunkovými kanálmi Cx43 môže byť zapojená do pro- a antiarytmických účinkov TH (Tribulova et al. 2010). Hypertyroidné srdce potkanov je náchylné k smrtiacej fibrilácii komôr, pri ktorej sú pravdepodobne zahrnuté Cx43 kanály (Lin et al. 2008). Na druhej strane zvýšenie cirkulujúcich TH môže zabrániť predčasným komorovým úderom a tachyarytmiám s najväčšou pravdepodobnosťou kvôli prevencii preťaženia Ca^{2+} (Tribulova et al. 2004; Tribulova et al. 2010).

3 HYPOTÉZA A CIELE PRÁCE

Cieľom dizertačnej práce bolo lepšie pochopiť význam distribúcie Cx43, rôznych fosforylácií Cx43 a nájsť ich súvislosť s antiarytmickým účinkom adaptácie na chlad a IHH. Na IHH modeli bola zistená zvýšená kolokalizácia hexokinázy s mitochondriami, ktorá znižuje produkciu ROS. Naším ďalším cieľom bolo posúdiť mieru translokácie isoformiem hexokinázy na mitochondrie v kardioprotektívnom režime normobarickej hypoxie CNH, ktorý nevykazuje antiarytmické účinky.

Cieľ 1. Identifikácia distribúcie t-Cx43 a p-Cx43(Ser368) medzi koncovými a laterálnymi spojmi v LV N, IHH zvierat, po ischemickom insulte a I/R poškodení.

Cieľ 2. Identifikácia distribúcie izoformiem hexokinázy HK1 a HK2 v LV N, CNH zvierat, po ischemickom insulte a I/R poškodení v jednotlivých mitochondriálnych populáciach.

Cieľ 3. Stanovenie expresie myokardiálneho Cx43 a p-Cx43(Ser368), PKA, CK1a PKG v LV N a IHH zvierat.

Cieľ 4. Identifikácia fosforylačných miest a ďalších posttranslačných modifikácií Cx43 v LV N a IHH zvierat pomocou hmotnostnej spektrometrie.

Cieľ 5. Stanovenie mRNA transkriptu Cx43 a analýza lipidov v LV N a IHH zvierat.

Cieľ 6. Stanovenie expresie myokardiálneho Cx43 v LV po akútnej expozícii chladu počas 3 a 10 dní (3D, 10D) a po chladovej aklimatizácii 5 týždňov s následnou regresiou 2 týždne (CH a R).

Cieľ 7. Identifikácia distribúcie celkového Cx43 medzi koncovými a laterálnymi spojmi v LV v akútnej a chronickej expozícii chladu a následnej regresii.

Cieľ 8. Stanovenie expresie PKA, CK1, PKB/Akt, PKC ϵ , PKC δ , MAPK v LV CH a R.

4 METODIKA A ADAPTÁCIE

4.1 Adaptácia na intermitentnú hypobarickú a kontinuálnu normobarickú hypoxiu

Na experiment boli použité dospelé samce laboratórneho potkana kmeňa Wistar (8 týždňov staré), pochádzajúce z chovnej stanice Fyziologického ústavu Akadémie vied (Česká republika). Priemerné hmotnosti zvierat sú uvedené v prílohách (Príloha 1). Zvieratá mali voľný prístup k vode a ku štandardnej laboratórnej diéte v režime 12 hod svetlo/12 hod tma. Štúdia bola vedená v zhode so zákonom na ochranu zvierat proti týraniu „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” publikovaným *US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996)* a bola schválená príslušnou komisiou Fyziologického ústavu AV ČR.

Potkany boli vystavené intermitentnej výškovej hypoxii IHH v hypobarickej komore alebo normobarickej kontinuálnej hypoxii CNH. Adaptácia prebiehala 8 hod denne, 5 dní v týždni, celkom 25 dní v prípade IHH a 3 týždne, 24 hodín denne v CNH. V IHH bol barometrický tlak znižovaný postupne tak, aby po 13 expozíciách odpovedal nadmorskej výške 7000 m. Počas adaptácie bola v komore zaistená cirkulácia vzduchu a teplota bola udržiavaná v rozmedzí 21-23 °C. V CNH boli zvieratá presunuté do normobarickej komory ($FIO_2 = 0,1$). Potkany kontrolných skupín normoxie boli chované v normoxických podmienkach odpovedajúcich nadmorskej výške 200 m pri teplote 21-23 °C. Barometrický tlak bol 99 kPa a parciálny tlak kyslíka 20,7 kPa ($FIO_2 = 0,21$).

Tri srdcia z každej skupiny boli podrobené krátkemu I/R poškodeniu in vivo alebo in vitro, ako bolo popísané v prácach (Neckar et al. 2017, Kolar et al. 2015) v uvedenom poradí. Stručne, zvieratá boli anestetizované (pentobarbital sodný, 60 mg/ kg i.p.) a ventilované vzduchom pri rýchlosti 68 až 70 úderov za minútu (dychový objem 1,2 ml/100 g telesnej hmotnosti). Rektálna teplota bola počas celého experimentu udržiavaná medzi 36,5 a 37,5 °C. Oklúzia ľavej prednej zostupnej koronárnej artérie sa uskutočnila v otvorenom hrudníku po 15 minútach stabilizácie, regionálna ischémia myokardu bola indukovaná uťahovaním švu pomocou polyetylénovej trubice. Po 10-minútovej oklúznej perióde sa ligatúra uvoľnila a hrudník zostal otvorený počas nasledujúcich 15 minút

reperfúzie. Ex vivo pokusy boli vykonané na perfundovanom srdci podľa Langendorfa. Cieľom oboch protokolov bolo krátkodobu získať ischemické srdce s plne reverzibilným poškodením, ako bolo opísané v práci (Kolar et al. 2017).

4.2 Akútna a chronická adaptácia na chlad

Na experiment boli použité dospelé samce laboratórneho potkana kmeňa Wistar (8 týždňov staré) (Velaz s.r.o.). Priemerné hmotnosti zvierat sú uvedené v prílohách (Príloha 2). Zvieratá mali voľný prístup k vode a ku štandardnej laboratórnej diéte v režimu 12 hod svetlo/12 hod tma a boli chované vo dvojiciach. Potkany boli v experimente rozdelené do šiestich skupín nasledovne: akútna kontrola (K), 3-dňový (3D) chlad, 10-dňový (10D) chlad, chronická kontrola (K), chronický chlad (CH) a regresia (R). Kontrolné skupiny boli chované v miestnosti s izbovou teplotou $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Skupina 3D bola vystavená počas 3 dní teplote $6 \pm 1^\circ\text{C}$. Skupina 10D bola vystavená teplote $6 \pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 10 dní. CH a R skupiny boli chované v oddelenej miestnosti od kontrolných skupín. V priebehu jedného týždňa boli postupne adaptované pomalým znižovaním teploty na $6 \pm 1^\circ\text{C}$, v ktorej zotrvali po dobu 5 týždňov. R skupina bola po tejto dobe ešte premiestnená z chladovej miestnosti, kde boli chované 2 týždne pri rovnakej teplote ako kontrolné skupiny.

4.3 Odber tkaniva

Zvieratá boli usmrtené pentobarbitálom sodným, 60 mg/kg i.p.. Srdcia boli vystrihnuté z hrudníka, prepláchnuté ľadovým fyziologickým roztokom. Následne boli odstránené predsieň a veľké cievy. Pre analýzy pomocou metód Western blot, Imunoflorescenciu, RT-PCR, Hmotnostnú spektrometriu a Analýzu lipidov boli srdcia rozdelené na septum, pravú komoru a ľavú komoru. Jednotlivé srdečné oddiely boli zvážené a zmrazené v kvapalnom dusíku (-80°C), kde boli uchovávané do ďalšieho spracovania.

4.4 Homogenizácia normoxických a hypoxických vzoriek

Ľavé komory srdca boli za sterilných podmienok a pri zachovaní nízkej teploty zhomogenizované. Srdcia boli vybrané z tekutého dusíka a prenesené do pripravených vychladených trecích misiek, kde boli rozdrvené na jemný prášok. Rozdrvené tkanivo bolo

následne prenesené do skúmaviek s tromi sklenenými guľčkami a 300 µl homogenizačného média (HM) 1. Skúmavky boli scentrifugované a do každej z nich bolo pridané HM1 na finálny pomer médium:tkanivo 8:1. Následne boli vzorky zhomogenizované v homogenizátore (MIXER MM200 Retch) po dobu 10 min. pri frekvencii 30 Hz.

Vo vzorkách bola stanovená koncentrácia proteínov pomocou metódy Bradford s využitím komerčného setu (BioRad) na prístroji Varioscán (Thermo Scientific). Po zmeraní koncentrácie bolo k vzorkám pridané homogenizačné médium HM2 s vysokým obsahom močoviny v pomere 1:1. Vo všetkých vzorkách bola opäť zmeraná koncentrácia proteínov pomocou metódy Bradford. Jednotlivé vzorky boli následne rozdelené do mikroskúmaviek a uchované v -80 °C pre elektroforézu a Western blot analýzu.

4. 5 Homogenizácia vzoriek akútneho a chronického chladu

Ľavé komory srdca boli za sterilných podmienok a pri zachovaní nízkej teploty zhomogenizované. Srdcia boli vybrané z tekutého dusíka a prenesené do pripravených vychladených trecích misiek, kde boli rozdrvené na jemný prášok. Rozdrvené tkanivo bolo následne prenesené do skúmaviek s tromi veľkými a tromi malými sklenenými guľčkami a roztokom zloženého z TMES + complete + phosphostop. Skúmavky boli pretrepané a do každej z nich bolo pridané TMES + complete + phosphostop na finálny pomer médium : tkanivo 4 : 1. Následne boli vzorky scentrifugované po dobu 10 min./ 2100 ot./ 4 °C. Po scentrifugovaní vzoriek bol supernatant 1 prepipetovaný do čistých epiniek. Pelet bol doplnený polovicou predchádzajúceho objemu TMESu a scentrifugovaný po dobu 10 min./ 2100 ot./ 4 °C. Následne bol odpipetovaný supernatant 2 zmiešaný so supernatantom 1, scentrifugovaný po dobu 35 min./ 12000 ot./ 4 °C a zmrazený. Pelet bol resuspendovaný v TME (TMES bez sacharózy). Vo vzorkách bola stanovená koncentrácia proteínov ako je uvedené vyššie.

4. 6 Imunofluorescencia

Tri oddelené LV z každej skupiny normoxických a hypoxických (IHH, CNH) potkanov podrobených krátkej ischémii a I/R a štyri oddelené LV z každej skupiny akútneho

a chronického chladu. boli fixované 2-minútovou perfúziou so 4 % paraformaldehydom. Následne boli ponorené do pufrovaného 4 % formaldehydu počas nasledujúcich 2 hodín a inkubované v 20 % roztoku sacharózy v PBS cez noc. Oddelené LV boli prerezané priečne v jednej tretine od vrcholu a zmrazené v kvapalnom dusíku. Pozdĺžne kryosekcie LV (6 μm , pripravené na kryostate Leica CM3050, Leica-mikrosystémy) boli permeabilizované v ľadovom metanole a opláchnuté v 1 % SDS ako krok získania antigénu. Jednotlivé kryosklíčka boli použité na detekciu celkového Cx43 a p-Cx43(Ser368) in situ. Rezy boli opláchnuté trikrát päť minút v PBS. Nasledovalo 90 minútové inkubovanie rezov v 10 % donkey sére v PBS (0.3 % Triton X-100, 1 % BSA, 0,3 M glycín and donkey anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich)), aby sa zabránilo naviazaniu nešpecifických väzieb. Po prepláchnutí v PBS (3 x 5 min.) boli pozdĺžne rezy inkubované s rabbit monoclonal antibody proti Cx43 (1:200, Sigma-Aldrich), s rabbit polyclonal antibody proti p-Cx43(Ser368) (1:200, Santa Cruz) alebo HK1, HK2 (1:500, Abcam) pri 4 °C cez noc. Po opätovnom premytí v PBS (3 x 5 min.) boli primárne protilátky detekované s donkey anti-rabbit IgG konjugovanou Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific). Sarkoléma bola vizualizovaná pomocou Alexa Fluor 647 konjugátu WGA (Thermo Fisher Scientific). Mitochondria boli vizualizované pomocou mouse MitoProfile Total OXPHOS Blue Native Antibody Cocktail konjugované s Alexa 633 (Thermo Fisher Scientific). Nakoniec bolo pridané krycie médium ProLong Gold Antifade Reagent obsahujúci marker pre zviditeľnenie jadier 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen) a kryostatové rezy boli prikryté krycím sklíčkom a uchované pri 4 °C. Na niektoré rezy primárne protilátky neboli aplikované. Tie slúžili ako špeciálna kontrola na testovanie špecifickosti protilátky. Imunopozitivita Cx43 a p-Cx43(Ser368) bola sledovaná v fluorescenčnom mikroskope Olympus cell P (Carl Zeiss, Nemecko).

Snímanie obrázkov

Vzorky srdca boli skúmané pomocou invertovaného fluorescenčného mikroskopu Olympus IX81 (Olympus, Tokio, Japonsko) vybaveného osvetľovacou jednotkou MT20 s meracím oblúkom, plne motorizovaným stupňom (Märzhäuser Wetzlar, Corvus) a CCD kamerou (Hamamatsu - Orca C4742-80-12AG). 5 obrázkov z IHH skupiny a 6 obrázkov zo skupín akútneho a chronického chladu bolo získaných s 20 x NA1,2 Plan-Apochromat objektívom

s nulovým ziskom a 1 x 1 binning vo formáte 1344 x 1024, 16-bit. Kombinácia filtrov pre jednotlivé kanály bola nastavená nasledovne: DAPI - trojpásmová sada 69002-ET-DAPI / FITC / TexasRed® (Chroma Technology Corp.) ex. 350 nm (šírka pásma 50 nm). 457 nm (šírka pásma 22 nm), konexín 43 (Alexa Fluor 488) - fl. kocka U-MWIBA3 (Olympus), napr. 477,5 nm (šírka pásma 17,5 nm) em. 530 nm (šírka pásma 20 nm), WGA (TMR) - fl. Cube U-MWIGA3 (Olympus), napr. 540 nm (šírka pásma 10 nm), em. 600 nm (šírka pásma 25 nm).

Analyza obrázkov Cx43

Analyza obrázkov bola spracovaná pomocou softvéru s otvoreným zdrojovým kódom FIJI (Schindelin et al. 2012). Automatický proces kvantifikácie prebiehal postupne v štyroch krokoch: (i) Predspracovanie obrazu: Obrázky boli kalibrované podľa objektívnych charakteristík a režimu snímania (pozri vyššie), čo malo za následok veľkosť pixelov 0,3225 x 0,3225 μm . Nerovnomerné osvetlenie bolo opravené pomocou algoritmu odčítania pozadia FIJI ImageJ (vytvorený Michaelom Hradom a Janicou Kellerovou, https://imagej.net/Rolling_Ball_Background_Subtraction) s polomerom valcovej gule nastavenej na 50 pixelov. (ii) Nastavenie prahu: Pre každý obrázok bol prah ručne nastavený na výber všetkých častí konexínu. Plocha jednotlivých konexínových častíc bola vypočítaná a každá častica bola uložená ako ROI pre ďalšiu selekciu. (iii) Stanovenie konexínových častíc: WGA farbenie sa použilo ako marker priečnej / pozdĺžnej orientácie myocytov. Častice, ktoré spájajú myocyty v pozdĺžnom smere, boli rozlíšené ako typ spojenia *end to end*, GJ spojenia v priečnom smere boli definované ako *side to side*. (iv) pomer *end to end* bol vypočítaný ako percento GJ plochy *end to end* na celkovú plochu všetkých GJ spojení. Vlastný skript bol napísaný pre poloautomatizáciu procesu.

Analyza obrázkov HK

Kvantitatívna imunofluorescenčná analýza sa uskutočnila tak, ako je opísané (Waskova-Arnostova et al. 2015). Kryosecie boli skúmané použitím širokouhlého invertovaného fluorescenčného mikroskopu (Olympus IX2-UCB). Každá experimentálna vzorka bola pozorovaná pri objektívoch s objektívom 100 x 1,4NA Plan-Apochromat. Bolo získaných

najmenej päť digitálnych obrázkov z každej vzorky. Na každý obrázok bol použitý dekonvolučný algoritmus (algoritmus Neighbor). Subcelulárna kolokalizácia dvoch HK izoforiem s mitochondriami bola vyjadrená Pearsonovým korelačným koeficientom vypočítaným pomocou ICA plugin softvéru Fiji ImageJ (Schindelin et al. 2012; Li et al. 2004).

4. 7 Analýza lipidov

Sedem oddelených LV z každej skupiny normoxických a IHH potkanov a potkanov podrobených následnej 10 min. ischemii bolo použitých pre potreby analýzy lipidov. Lipidy boli extrahované z tkanivových vzoriek podľa modifikovanej metódy Folch et al. (1957).

Celkové fosfolipidy boli oddelené pomocou jednorozmernej chromatografie na tenkej vrstve s použitím zmesi hexán-éter-kyselina octová (80:20:3). Pri fosfolipidových analýzach sa fosfolipidové škvrny vizualizovali pod UV svetlom po farbení 0,005 % 2,7-dichlorofluoresceínom v metanole a uskladnili v dusíku pri -20 °C až do nasledujúceho dňa, keď sa pripravili fosfolipidové metylestery. Pre prípravu metylesteru bol do skúmaviek so silikagélom pridaný metanolát sodný; skúmavky boli následne inkubované 60 minút pri teplote miestnosti v tme. Metylestery boli extrahované hexánom. Extrakt bol odparený v prúde dusíka a uskladnený pri -20 °C. Metylestery boli oddelené pomocou plynového chromatografu CP 438 A (Chrompack, Middelburg, Holandsko) strednou polárnou kolónou CP WAX 52 CB (25 m x 0,25 mm i.d.). Teplota pece bola naprogramovaná od 145 do 230 °C pri rýchlosti 2 °C / min. Ako nosný plyn bol použitý vodík. Jednotlivé metylestery boli identifikované použitím štandardnej zmesi FA metylesterov (Sigma) (Tvrzicka et al. 2002).

4. 8 SDS-PAGE elektroforéza a Western blot analýza

Elektroforéza

Ku každej vzorke (n=5) bolo pridané SLB, DTT, HM:UREA. Na elektroforézu bol pripravený najprv rýchle tuhnúci 12 % deliaci gél (Príloha 3). Po 30 min tuhnutia bol pridaný 5 % zaostrovač gél, ktorý tuhol ešte 20 min (Príloha 3). Medzitým boli vzorky umiestnené na 5 min do termostatu a varené pri teplote 100 °C, čím došlo k denaturácii proteínov.

Po vytuhnutí gélov boli nanesené vzorky v koncentrácií 20, 40 μg na jamku, vždy pod elektrodový pufor. Na každý gél bol pridaný molekulový štandard Precision plus protein standard (BioRad) o objemu 1,5 μl pre správne určenie daného proteínu na membráne podľa molekulovej hmotnosti. Po zostavení celej aparatury a zaliatí elektrodovým pufrom (Príloha 3) bola spustená elektroforéza. Program začínal na konštantnom napätí 100 V a po prechode čela elektroforézy do zaostrovacieho gélu bolo zvýšené napätie na konštantných 150 V. Pred koncom elektroforézy bolo napätí zvýšené na 200 V, kvôli lepšiemu zaostreniu proteínov. Elektroforéza trvala 60-90 min podľa veľkosti sledovaných proteínov.

Western blot

Pred koncom elektroforézy boli najprv nitrocelulóзовé membrány asi 2 min aktivované v metanole. Následne boli membrány ekvilibrované v blotovacím pufri (Príloha) po dobu 10 min. v chladničke spolu s filtračnými papiermi a gély po skončení elektroforézy. Pri zostavovaní blotovacieho „sendviča“ boli vytlačené všetky bubliny medzi membránou a gélom a zahájené blotovanie pri konštantnom napätí 100 V po dobu 60 min.

Imunodetekcia

Po skončení blotovacieho programu boli membrány premyté 15 min v TBS (Príloha 3). Následne bolo potrebné povrch membrány zablokovať. Na blokáciu sme použili 5% nízkoúčinné sušené mlieko rozpustené v TTBS, ktoré sa naviazalo na všetky miesta, kde neboli prenesené proteíny z gélu na membránu. Tým sa zabránilo nešpecifickému naviazaniu primárnej protilátky. Blokovaním taktiež dochádza k zníženiu negatívnych efektov, ako je šum v pozadí. Po premytí membrán v TTBS boli membrány umiestnené do 5 % mlieka v TTBS po dobu 1 hod pri pokojovej teplote.

Po blokácii boli membrány opäť premyté 5 min v TTBS. Po premytí boli membrány umiestnené do primárnej protilátky, voči danému proteínu cez noc v chladničke pri teplote 4°C za stáleho pomalého kolísania (Tabuľka 2).

Tabuľka 2. Riedenie primárnych a sekundárnych protilátok.

Primárna protilátka	Riedenie	Sekundárna protilátka	Riedenie
Actin, sc-1616, (Santa Cruz)	1:5000	2033 (Santa Cruz), Anti-goat	1:10000
Akt, (GenScript)	1:2000	A9169 (Sigma), Anti-rabbit	1:10000
B-actin, sc-47778, (Santa Cruz)	1:1000	31432 (Invitrogen), Anti-mouse	1:10000
CK1, 2655 (Cell Signaling)	1:1000	A9169 (Sigma), Anti-rabbit	1:10000
Cx43, C6219 (Sigma)	1:10000	A9169 (Sigma), Anti-rabbit	1:10000
MEK3, sc-959 (Santa Cruz)	1:2000	A9169 (Sigma), Anti-rabbit	1:10000
np-Cx43, 13-8300, (ThermoFisher)	1:1000	A9169 (Sigma), Anti-rabbit	1:10000
p-Cx43(Ser368), sc-101660, (Santa Cruz)	1:500	A9169 (Sigma), Anti-rabbit	1:10000
p-Cx43(Ser282/279), sc-12900, (Santa Cruz)	1:500	A9169 (Sigma), Anti-rabbit	1:10000
p-Cx43(Tyr265), sc-17220, (Santa Cruz)	1:500	A9169 (Sigma), Anti-rabbit	1:10000
PKA, sc-365615, (Santa Cruz)	1:1000	31432 (Invitrogen), Anti-mouse	1:10000
PKCε, sc-214, (Santa Cruz)	1:1000	A9169 (Sigma), Anti-rabbit	1:10000
PKCδ, sc-213, (Santa Cruz)	1:1000	A9169 (Sigma), Anti-rabbit	1:10000
PKG, 3248 (Cell Signaling)	1:1000	A9169 (Sigma), Anti-rabbit	1:10000

Po inkubácii v primárnej protilátke boli membrány opäť premyté 3 x 15 min v TTBS. Následne boli inkubované v sekundárnej protilátke 1 hod pri pokojovej teplote (Tabuľka 2). Po hodinovej inkubácii boli membrány premyté 3 x 10 min v TTBS a nasledovala detekcia proteínov. Detekcia prebiehala pomocou konjugácie sekundárnej protilátky s enzýmom umožňujúcim vizualizáciu. Pomocou enzýmu peroxidázy dochádza k premene chemiluminiscenčného substrátu na nestabilný produkt, ktorý sa stabilizuje vyžiarovaním kvanta svetla. Uvoľňovanie svetla je tak detekované priložením svetlo citlivého filmu alebo s použitím CCD kamier.

V tomto pokuse bola využitá CCD kamera. Následne došlo k nanosení 300 μ l chemiluminiscenčného farbiva (Supersignal West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific Pierce) na každú membránu a vyvolané pomocou programu Image-reader LAS 4000 (Genetica, FujiFilm).

Pro kvantifikácií dát z Image-reader LAS 4000 bola využitá densitometria a následne boli všetky dáta spracované v programe QuantityOne (BioRad). Všetky vzorky boli pre jednotlivé protilátky analyzované niekoľkokrát a vzniknutý priemer bol využitý k štatistickému hodnoteniu.

4.9 Hmotnostná spektrometria

Ľavé komory srdca ($n=4$) potkanov boli za sterilných podmienok a pri zachovaní nízkej teploty zhomogenizované. Srdcia boli vybrané z tekutého dusíka a prenesené do pripravených vychladených trecích misiek, kde boli rozdrvené na jemný prášok a následne rozpustené v Lyzačnom pufri (4 % SDS; 100 mM TRIS; pH 8,5; 10 mM TCEP; 40 mM CAA). Vzorky boli zahriaté pri 95 °C po dobu 5 min pri kontinuálnom miešaní a chladené na ľade 15 min. Nasledovala sonikácia 3 x 30s a vzorky boli opakovane zahriaté pri 95 °C po dobu 5 min a centrifugované 30 min/ 3500 ot. Supernatant bol doriedený 50 % mQ vodou a precipitovaný 4x acetónom (-20 °C). Pričom posledné precipitavnie prebiehalo cez noc.

Vyzrážaný proteín bol oddelený centrifugovaním počas 15 min pri 2000 ot/ 4 °C, pelety boli dvakrát premyté pri -20°C, 80 % acetónom a sušené sa na vzduchu po dobu 10 min pri izbovej teplote (RT) alebo pokiaľ sa odstránil zvyškový zápach acetónu. Pelety boli resuspendované v 2 ml TFE (2,2,2-Trifluorethanol) Digestačnom pufri (10 % TFE, 100 mM hydrogénuhličitan amónny) sonikáciou (Bioruptor (Diagenode), pri 4 °C po dobu 5 min, alebo pokiaľ sa nevytvorila homogénna suspenzia. Koncentrácia proteínov bola stanovená pomocou BCA. Po nanáške vzoriek a BCA bola doštička inkubovaná 30 min pri 37 °C.

Štiepenie bielkovín prebiehalo v 500 μ l TFE Digestačnom pufri:

1. Štiepenie začalo pridaním 1:100 Lys-C počas 30 min a 1:100 trypsínu resuspendovaného v 0,05 % kyseline octovej /2 mM CaCl₂.

2. Vzorky boli následne inkubované v termomixéri počas 18 hod pri teplote 37 °C, 2000 ot/min.

Po inkubácii boli vzorky doriedené podľa koncentrácie proteínov 3 mg/500 µl TFE. K odštiepeným peptidom v 500 µl TFE Digestion pufri boli pridané nasledujúce substancie do finálneho objemu 1,6 ml (300 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 50 % ACN, 6 % kyselina trifluóroctová). Roztok peptidov bol miešaný pri RT po dobu 1 minútu v termomixéri pri 2000 ot/min a vyčistený pri vysokej rýchlosti centrifugáciou (≥16000 ot/ 15 min v 2ml epinkách alebo 30 min/ 3500 ot). Supernatant S1 bol odpipetovaný do čistých 2 ml epiniek.

Príprava TiO₂ guličiek

TiO₂ guličky boli navážené v pomere 10:1 k proteínu. Guličky boli resuspendované v Loading pufri (LP) (80 % ACN, 6 % TFA) pri koncentrácii 100 µl LP na vzorku. Suspenzia TiO₂ guličiek bola inkubovaná v Bioruptor pri teplote 4 °C počas 1 min, pokiaľ sa guľôčky rozptýlili. 100 µl suspenzie rovnomerne dispergovaných guličiek bolo prenesených ku každému S1. TiO₂ guličky a peptidy boli inkubované pri teplote 25 °C po dobu 5 min, následne 40 °C po dobu 5 min v termomixéri pri 2000 ot. Guličky boli centrifugované po dobu 1 min/3500 ot pri RT kvôli ich usadeniu.

Vymývanie nešpecificky naviazaných peptidov

Nešpecificky naviazané peptidy boli vymyté z TiO₂ guličiek resuspendovaním v 500 µl Wash pufri (60 % ACN, 1% TFA). Guličky boli prevedené do čistých 2 ml epiniek, pričom zostávajúce guličky boli zozbierané s druhým 500 µl Wash pufrom. Guličky boli inkubované pri RT po dobu 30 s v termomixéri pri 2000 ot/min. Následne boli centrifugované 1 min/ 3500 ot/ RT a supernatant bol odstránený odsatím. Peletované guličky boli premyté 4 x v 1 ml Wash pufri a inkubované pri každom premytí 30 s v termomixéri pri 2000 ot./min. a 1 min/ 3500 ot/ RT. Po konečnom premytí, 100 µl Transfer pufru (80 % ACN, 0,5 % kyselina octová) bolo pridané do každej skúmavky a prebiehala inkubácia počas 30 s v termomixéri pri 800 ot./min. až pokiaľ sa guličky nerosuspendovali.

Príprava kolonky C8

Guličky so vzorkou boli prenesené v Transferovom pufri na vrchol C8 StageTip. Následne boli vzorky centrifugované 5 min/ 500 ot/ RT, alebo pokiaľ v StageTip nezostala žiadna kvapalina. Fosfopeptidy boli vymývané 2 x pridaním 30 µl Elution pufru (40 % ACN, 15 % NH₄OH (25 % HPLC), ktorý bol pripravený bezprostredne pred použitím) ku každému StageTipu, ktorý obsahoval TiO₂ guličky. Vzorky boli stočené pri 500 ot/ 3 min. pri 4 °C. Eluáty obsahujúce fosfopeptidy boli zhromaždené do sklenených skúmaviek.

Vzorky boli zahustené vo SpeedyVac počas 3-4 minút pri 45 °C alebo pokiaľ zostalo 20µl, pričom ku každej vzorke bolo ihneď pridané 10µl 10 % TFA. Následne nasledovala ekvilibrácia membrány. Bol pripravený StageTips s 3 vrstvami SDB-RPS (3M Empore) materiálu, ktorý bol vopred ekvilibrovaný pridaním 50µl 100 % ACN, 6000 ot./3min.; 50 µl 30 % MeOH, 0,2 % TFA, 6000 ot./3min. a 50µl 0,2 % TFA, 6000 ot./3min.. Každú vzorka bola nanosená na StageTips s 3 vrstvami SDB-RPS a pomaly točená pri 500 ot./ 3min. SDB-RPS StageTips boli následne premyté 2x pomocou 100µl SDB-RPS Wash pufru (0,2 % TFA) a centrifugované 10 minút pri 500 ot./ min. pri RT alebo pokiaľ v epinke nezostala žiadna tekutina. Pre vymytie fosfopeptidov bolo pridané 60µl SDB-RPS Elučného pufru (80 % ACN, 5 % NH₄OH (25 %, HPLC)).

Fosfopeptidy boli zhromaždené do čistých sklenených skúmaviek a centrifugované pri 500 ot./5min. pri RT, alebo pokiaľ nezostala žiadna tekutina. Okamžite boli skúmavky vložené do SpeedyVacu po dobu 3-4 minút pri 45 °C, alebo pokiaľ zostalo 2 µl. 15µl MS Loading pufru (2 % ACN, 0,3 % TFA) bol pridaný k fosfopeptidom a premiešaný sonikáciou (Bioruptor, 4 °C, 1 min.).

LC-MS analýza

LC-MS analýza bola uskutočnená na OrbitrapFusion spojenom s NanoLC Dionex Ultimate 3000RS. Na separáciu bola použitá 50 cm Thermoeasy nano kolóna, spojená v kombinácii s kolónou 300 µm ID, dĺžkou 5 mm. Bol použitý 2 hodinový gradient oddelenia. Údaje boli vyhľadávané pomocou softvéru MaxQuant (Cox et al. 2014) proti najnovšej databáze Uniprot Rattus Norvegicus s variabilnou modifikáciou phospho STY. Údaje z MaxQuantu boli ďalej spracované softvérom Perseus (Tyanova et al. 2016). Kvantitatívne hodnoty

pre identifikované fosfopeptidy boli podrobené ďalšej štatistickej analýze v Exceli a vyhodnotené v Prism GraphPad pomocou t-testu.

4.10 RT-PCR

Homogenizácia

Homogenizácia vzoriek (n=6) uchovávaných v tekutom dusíku (-196 °C) bola prevedená pri nízkej teplote, aby nedochádzalo k otepleniu tkaniva a naštartovaniu degradačných mechanizmov. Pred vlastnou homogenizáciou boli označené 2 ml mikroskúmavky, do ktorých boli vložené 3 malé a 3 veľké sklenené guľičky pre budúcu homogenizáciu tkaniva pomocou MIXER MM200 (Retsch) a 0,5ml RNAzolu. RNazol je činidlo na báze guanídium chloridu a fenolu používané k rýchlej jednostupňovej izolácii RNA z tkaniva. Takto pripravené mikroskúmavky boli zvažene na analytických váhach s presnosťou na 4 desatinné miesta a boli vychladené na ľade. Pre izoláciu RNazolom je ideálne množstvo 80 – 120 µg tkaniva.

V digestore bola pripravená polystyrénová krabica s tekutým dusíkom, do ktorej boli vložené trecie misky, tĺčiky, pinzeta a špachtle k vychladeniu. Do vychladenej misky s malým obsahom tekutého dusíka bolo prenesené tkanivo a vychladeným tĺčikom bola rozbitá a rozmlená o steny misky na jemný prášok. Ten bol ihneď prevedený do vychladenej 2 ml mikroskúmavky s guľičkami a 0,5 ml RNAzolu. Tkanivo bolo ihneď zaliate ďalším 0,5 ml RNAzolu a znovu odvážené. Pokiaľ bolo v mikroskúmavke viac tkaniva ako 100 µg, bolo pridané 0,5 ml alebo 1 ml RNAzolu, ktoré bolo úmerné nadbytku tkaniva. Po zalíati RNazolom boli mikroskúmavky dynamicky pretrepané v ruke, scentrifugované na ručnej centrifúge a vrátené späť na ľad.

Homogenizácia bola vykonaná vo vychladených kyvetách na homogenizátore MIXER MM200 (Retsch) po dobu 10 minút pri frekvencii 30 Hz. Nasledovala centrifugácia vo vychladenej centrifúge pri 11000 ot./min. po dobu 10 minút. Získaný supernatant v objemu 1ml bol prevedený do novej označenej 2 ml mikroskúmavky a uchovávaný v -80 °C do ďalšieho spracovania.

Izolácia RNA

K supernatantu (1 ml) z predchádzajúcej homogenizácie bolo pridané 400 μ l vody a dynamicky premiešané. Voda používaná pre PCR je ultračistá dvakrát klábovaná miliporQ voda alebo DEPC (diethyl pyrokarbonát) ošetrovaná voda firmy Roche alebo Fermentas, ďalej len voda. Prebehla 15 minútová inkubácia pri pokojovej teplote a následná centrifugácia pri 12000 ot./min. 1 ml supernatantu obsahujúci RNA bol odobraný do novej označenej mikroskúmavky, kde bola prevedená precipitácia RNA pridaním 1ml izopropanolu a 10 minútová inkubácia. Nasledovala centrifugácia pri 12000 ot./min. počas 10 minút v chladenej centrifúge. Následne bolo pridané 400 μ l 75 % ethanolu, ktorý bol čerstvo pripravený z destilovaného 96 % etanolu. Mikroskúmavka bola ľahko premiešaná preklopením a centrifugovaná pri 4000 ot./min. počas 2minút. Vznikla zrazenina RNA a ethanol bol odobraný. Postup s pridaním ethanolu bol ešte raz zopakovaný Po konečnom odobraní ethanolu sa mikroskúmavky nechali minútu vyschnúť v termostatickom bloku pri 37 °C, aby došlo k jeho úplnému odpareniu. K zrazenine bolo pridané 200 μ l vody, v ktorej sa zrazenina RNA rozpustila. Vo vzniknutom roztoku bola v nasledujúcom kroku zmeraná čistota a koncentrácia RNA.

Meranie koncentrácie RNA

Do malých mikroskúmviek bolo napipetované 9 μ l 0,5 % SDS (dodecylsulfátsodný) pufru a 1 μ l roztoku s izolovanou RNA, čím sa nám roztok 10x nariedil. Vzniknutý roztok bol spektrofotometricky analyzovaný na prístroji Nanodrop proti samotnému SDS, použitého ako blank. Ako meradlo čistoty sa používa pomer absorbancie pri 260 a 280 nm, ktorý by sa mal pohybovať medzi 2,0 – 2,2 pre čistú RNA. Pokiaľ je číslo nižšie, môže sa jednať o prítomnosť látok absorbujúcich v blízkosti meranej absorbancie, ako napríklad fenoly či proteíny (manuál NanoDrop Technologies, 2007). Dôležitým faktorom je taktiež pH roztoku, kedy kyslé roztoky môžu pomer znižovať o 0,2 – 0,3 a naopak zásadité tento pomer zvyšovať. Nezanedbateľná je také iontová sila roztoku. Výsledky z merania boli použité ako vstupné informácie pre reverznú transkripciu.

Elektroforéza

V našom prípade bola použitá elektroforéza ako kontrola čistoty a prípadnej degradácie izolovanej RNA, kde fosfátové skupiny RNA nesúce záporný náboj umožňujú pohyb molekúl ku kladnému pólu. Analýza bola prevedená na prístroji pre horizontálnu gélovú elektroforézu v 1xTAE (Tris base, acetic acid, EDTA) pufru. Bola použitá zmes LE (*Low Electroendosmosis*) a GTG (*Genetic Technology Grade*) agarózy v koncentrácií 1,5 %. Do rozpustenej agarózy bol pridaný ethidium bromid pre vizualizáciu transiluminátorom.

Koncentrovaný pufr 50x TAE je zložený z 40 mM TRIS, 20 mM kyseliny octovej a 2 mM Na₂ EDTA. Gél bol vyrobený rozvarením 125 mg LE a 250 mg GTG agarózy v 25 ml vody s následným pridaním 500 µl 50xTAE pufru a 5 µl ethidium bromidu. Pri teplote okolo 60 °C bol gél naliaty na elektroforetickú mištičku s hrebienkom. Po zatuhnutí gélu bol hrebienok vybraný, gél bol preliaty elektródovým pufrom a do jamiek boli nanášané vzorky.

Vzorky boli nanesené v zmesi s nanášacím pufrom (*loading buffer*), ktorý obsahuje glycerol a spôsobí usadenie vzoriek na dno jamky. Ďalšou zložkou nanášacieho pufru je bromfenolová modrá, ktorá roztok zafarbí, čo umožňuje ľahšie nanášanie vzoriek do gélovej jamky. Bolo nanesené 0,5 µg RNA na jamku. Nanášky boli spočítané z koncentrácie RNA zmerané spektrofotometrickým systémom Nanodrop.

Zdroj bol nastavený na 80 V, bez obmedzenia prúdu po dobu 60 minút. Následne bol gél exponovaný UV žiareniu v transluminátore a okometricky zhodnotený. V prípade prítomnosti DNA by bol detekovaný band, ktorý by zostal na štarte v jamke.

Reverzná transkripcia a PCR

Reverzná transkripcia je posledným krokom pred vlastnom real-time RT PCR, ktorá kvantitatívne prevedie RNA na cDNA. Aby sme docielili čo najpresnejšiu kvantifikáciu génovej expsie, vnášame do reakcie 1 µg RNA, ktorý je vypočítaný z koncentrácie RNA zmeranej systémom Nanodrop. RNA bola riedená vodou do objemu 11 µl. Následne bol pridaný 1 µl oligo (dT)₁₈ a zmes bola inkubovaná 5 minút pri 65 °C. Po inkubácii bola zmes ihneď schladená na ľadu. Ku každej vzorke bolo pridané 7,9 µl premixu, ktorý

sa skladá z týchto komponentov: 4 μl 5X reaction buffer, 0,95 μl Ribolock, 2 μl 10 nM dNTP mix a 0,95 μl H-Minus. Premix bol vytvorený ako jedna zmes a následne pipetovaný po 7,9 μl , aby boli zachované rovnaké podmienky pre všetky vzorky. Po pridaní premixu boli mikroskúmavky inkubované pri 42 °C 60 minút. Reakcia bola zastavená 5minútovou inkubáciou pri 70 °C a následným schladením na ľade. Screening primeru a testovanie housekeeping génov bolo testované na cDNA z jednej RT. Pre vyššiu výťažnosť cDNA na vlastnú analýzu bola vykonaná dvojitá RT.

K vlastnej PCR reakcii boli použité primery od firmy Eurogentec. Primery boli dodané v lyofilizovanej forme, čistené odsolením a následne boli nariadené na zásobnú koncentráciu 500 μM . V tejto podobe boli uchovávané v -20 °C. Pre PCR reakciu boli obe primery pre daný gén, tzn. ľavá (L), forward (F) i pravá reversia (R), rozriedené na 5 μM . Výsledný roztok pre PCR reakciu teda obsahoval zmes pravého i ľavého primeru v roztoku Premix Sybr Green od firmy Eurogentec a vody. Premix pre celú doštičku bol vypočítaný z počtu PCR reakcií s patričnou rezervou. Na každú PCR reakciu pripadlo: 5 μl Sybr Green premix, 3 μl vody a 1 μl primeru (zmes reversie + forward formy), podľa návodu Light Cycler 480 DNA SYBR Green I Master (Roche Applied Science).

Pred vlastnou analýzou boli všetky primery testované na špecificitu produktu pomocou krivky topenia, stanovenia efektivity z kalibračnej krivky a dostatočného odstupu negatívnych kontrol najmenej 10 cp. Bola použitá 3 bodová kalibračná krivka s riedením desiatkovou sústavou. Kalibračné krivky boli tiež analyzované pre každý premix. Samotná PCR reakcia prebiehala na cykleri LightCycler® 480 Real-Time PCR na 384 jamkovej doštičke s objemom reakcie 10 μl (9 μl premixu + 1 μl cDNA) podľa nasledujúceho protokolu. Preinkubácia pri teplote 95 °C po dobu 10 minút s následnými 50 cyklami s teplotným profilom: 95 °C/10 s; 60 °C/30 s; 72 °C/1 s. Ďalej bola v každom protokole vygenerovaná krivka topenia produktu. Posledným krokom je schladenie na teplotu 40 °C.

Každá vzorka bola na doštičke meraná v triplikátoch a k výpočtu priemernej hodnoty cp meraného génu boli použité hodnoty, ktoré nepresiahli smerodajnú odchýlku 0,4. Pre presný výpočet relatívnej hodnoty mRNA, bola efektivita jednotlivých primerov počítaná zo štandardnej krivky. Hladina analyzovaného transkriptu bola normalizovaná

na hladinu referenčného génu ribozomálnej podjednotky S18 s ohľadom na efektivitu podľa vzorca:

$$\text{Normalizované množstvo} = \frac{(1+E)^{Cp \text{ referenčný transkript}}}{(1+E)^{Cp \text{ sledovaný transkript}}}$$

Upravené podľa (Pfaffl 2004).

4. 11 Štatistická analýza

Štatistické rozdiely medzi skupinami boli stanovené t-testom alebo ANOVA s post-testom Newman-Keuls. Hodnoty $P < 0,05$ boli považované za štatisticky významné. Všetky údaje boli vyjadrené ako pomer \pm SD, SEM.

5 VÝSLEDKY

5.1 Cx43 a hypoxia

Vplyv IHH na expresiu celkového Cx43 a jeho fosforylovaný stav

Obrázok 5 ukazuje účinok IHH na expresiu Cx43 na úrovni proteínu a mRNA. Expresia celkového Cx43 (t-Cx43) sa významne zvýšila o 48 % v IHH skupine na úrovni proteínu (5B), avšak transkript Cx43 mRNA klesol o 16 % v IHH srdciach (5E). Paralelne sa tiež zvýšili fosforylované formy P1 + P2 o 56 % (5C). Pomer fosforylovaných foriem P1 + P2/t-Cx43 bol zvýšený o 54 % v IHH skupine (5D).

Obrázok 6 ukazuje účinok IHH na proteínovú expresiu nefosforylovanej formy a fosforylovaných foriem Cx43 pomocou Western blot analýzy. Použitím špecifickej anti-np-Cx43 protilátky sme potvrdili významný pokles nefosforylovanej formy Cx43 (o 30 %) v IHH skupine (6A). Ďalej sme použili špecifické protilátky na analýzy fosforylovaných miest. p-Cx43(Ser368), zvyšujúci GJ komunikáciu, bol zvýšený po IHH o 30 % v porovnaní s normoxickou skupinou (6B). Naopak, fosforylácia p-Cx43(Ser279/282), ktorá znižuje intercelulárnu komunikáciu, bola po IHH znížená o 12% (6C). Fosforylácia na p-Cx43(Tyr265), ktorá môže prispieť k internalizácii Cx43, klesla o 19 % (6D).

Obrázok 7 ukazuje účinok IHH na proteínovú expresiu fosforylovaných foriem Cx43 pomocou hmotnostnej spektrometrie. IHH zvýšila fosforyláciu p-Cx43(Ser364, Ser365, Ser368) o 65 % v porovnaní s normoxickou skupinou (7A, B, C). Pre jednotlivé fosforylačné miesta boli nájdené nasledovné sekvencie:

Ser364-AGHELQPLAIVDQRPSSRASSRASSRPRPDD

Ser365-GHELQPLAIVDQRPSSRASSRASSRPRPDDL

Ser368- LQPLAIVDQRPSSRASSRASSRPRPDDLEI

Vplyv IHH na expresiu proteinkináz fosforylujúcich Cx43

Obrázok 8 prezentuje účinok IHH na proteínovú expresiu Cx43 upstream kináz. Analyzovali sme PKA, PKG a CK1. V IHH skupine sa expresia PKA zvýšila o 33 % a PKG 19% (8A, B), zatiaľ čo expresia CK1 sa v porovnaní s normoxickou kontrolou nezmenila (8C).

Vplyv IHH na redistribúciu celkového Cx43 pomocou imunofluorescencie

Obrázok 9 ukazuje kvantitatívnu analýzu obrázkov t-Cx43. Distribúcia t-Cx43 bola normalizovaná za normoxických podmienok a t-Cx43 bol umiestnený prevažne na *end to end* spojeniach. Sporadicky sa t-Cx43 objavil aj na *side to side* spojeniach (9A). IHH zvýšila plochu t-Cx43 v *end to end* spojeniach o 7 %. Naopak, plocha t-Cx43 v *side to side* spojeniach sa taktiež znížila o 7 % (9B). Nasledujúca 10-minútová ischémia zrušila zvýšenie t-Cx43 v *end to end* spojeniach v IHH srdciach (9A, C) takmer na úroveň normoxickej kontroly. Následná 15 minútová reperfúzia nemala na distribúciu t-Cx43 vplyv (9D).

Vplyv IHH na redistribúciu p-Cx43 (Ser368) pomocou imunofluorescencie

Obrázok 10 ukazuje umiestnenie p-Cx43(Ser368) v *end to end* a *side to side* spojeniach (10A). Adaptácia na IHH zvýšila plochu p-Cx43(Ser368) v *end to end* spojeniach o 9 % (10B) a zároveň znížila plochu p-Cx43(Ser368) v *side to side* spojeniach taktiež o 9 %. Nasledujúca 10-minútová ischémia udržala nárast p-Cx43(Ser368) v *end to end* spojeniach len v IHH srdciach (10C). Následná 15 minútová reperfúzia nemala na distribúciu p-Cx43(Ser368) vplyv (10D).

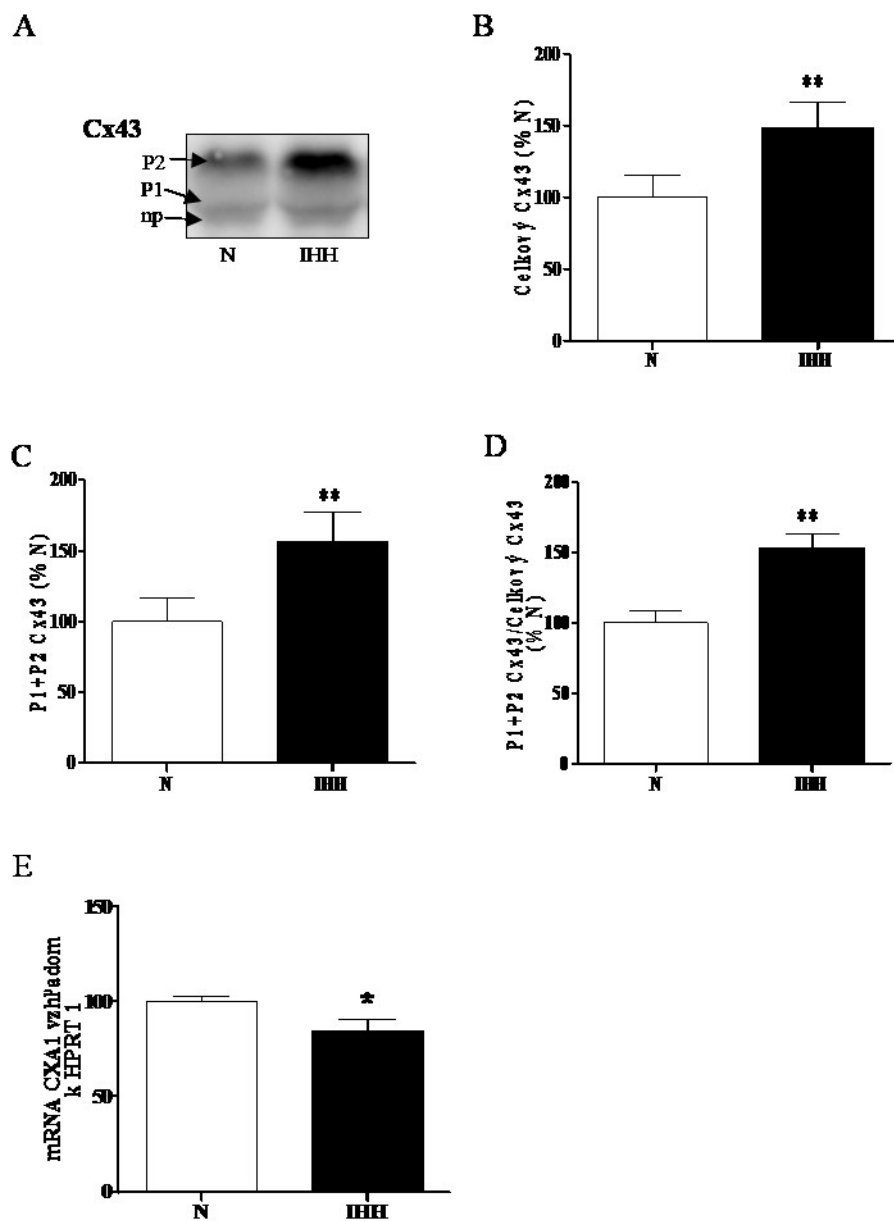
Vplyv IHH na zastúpenie mastných kyselín v celkových fosfolipidoch srdca

Obrázok 11 znázorňuje účinok IHH a 10-minútovú ischémiu na podiel PUFA v celkových fosfolipidoch. Pokiaľ ide o účinok IHH, podiel dokosahexaénovej kyseliny (DHA, 22: 6n-3) a celkových n-3 PUFA sa zvýšil, čo sprevádzalo zníženie kyseliny linolovej (LA, 18: 2n-6). Podiel AA (20: 4n-6) sa nezmenil. Následná 10-minútová ischémia spôsobila ďalšie zvýšenie n-3 PUFA len v IHH srdciach o 13 % kvôli ďalšiemu zvýšeniu DHA (15 %).

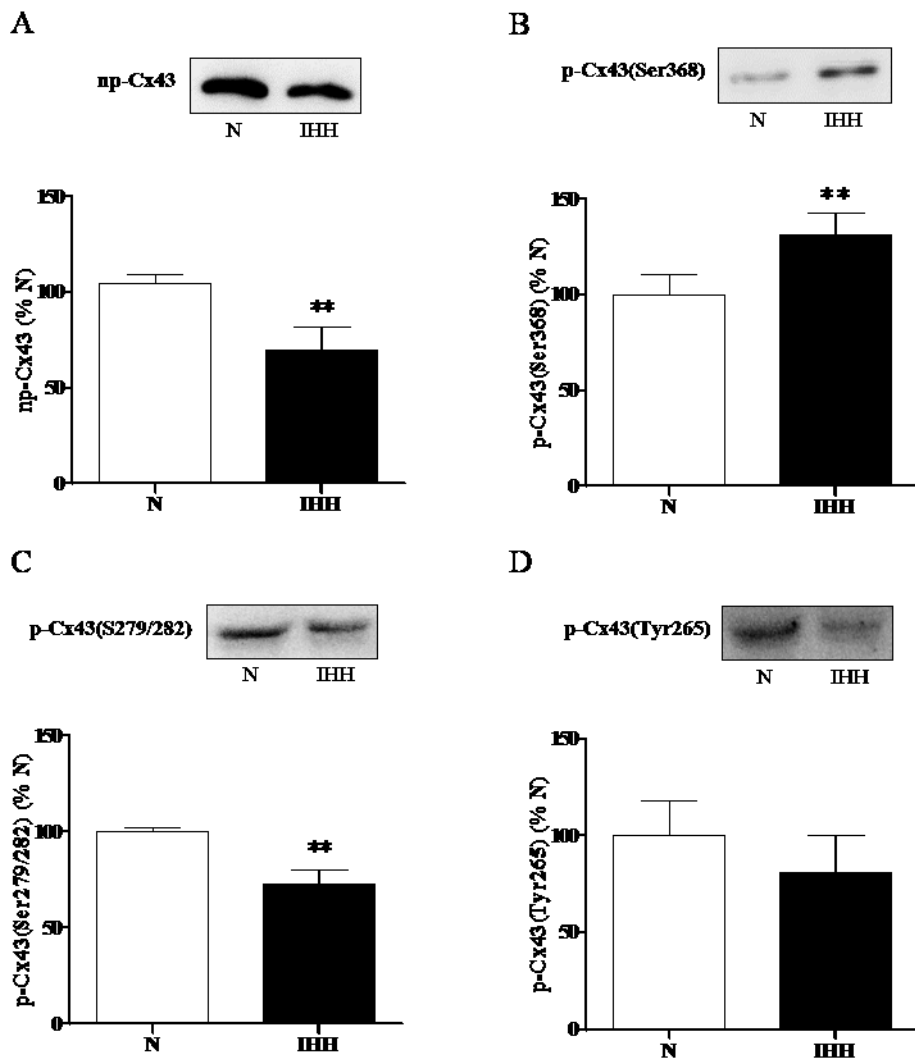
Vplyv CNH na ko-lokalizáciu HK s mitochondriami

Kolokalizácia HK1 s mitochondriami hodnotená korelačným koeficientom Pearsonu sa medzi jednotlivými skupinami nelíšila (12C). V skupine N bola kolokalizácia HK2 s mitochondriami významne znížená po reperfúzii v porovnaní s ischémiou, zatiaľ čo v CNH skupine bola pozorovaná len tendencia (12D). Zaujímavé je, že pri všetkých

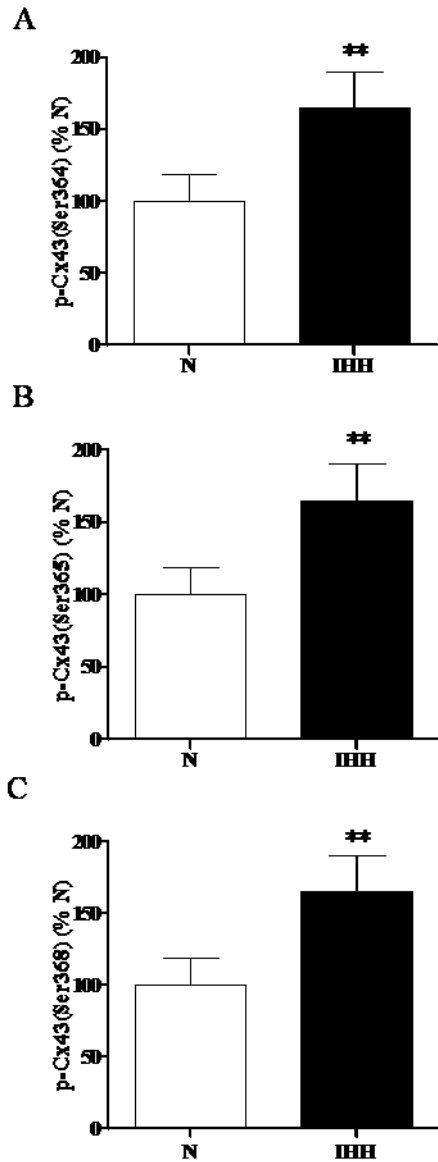
mitochondriálnych subpopuláciách (12E, F a G) sa pozoroval rovnaký vzorec lokalizácie HK2 (pokles po reperfúzii o 33%, 32% a 37%).



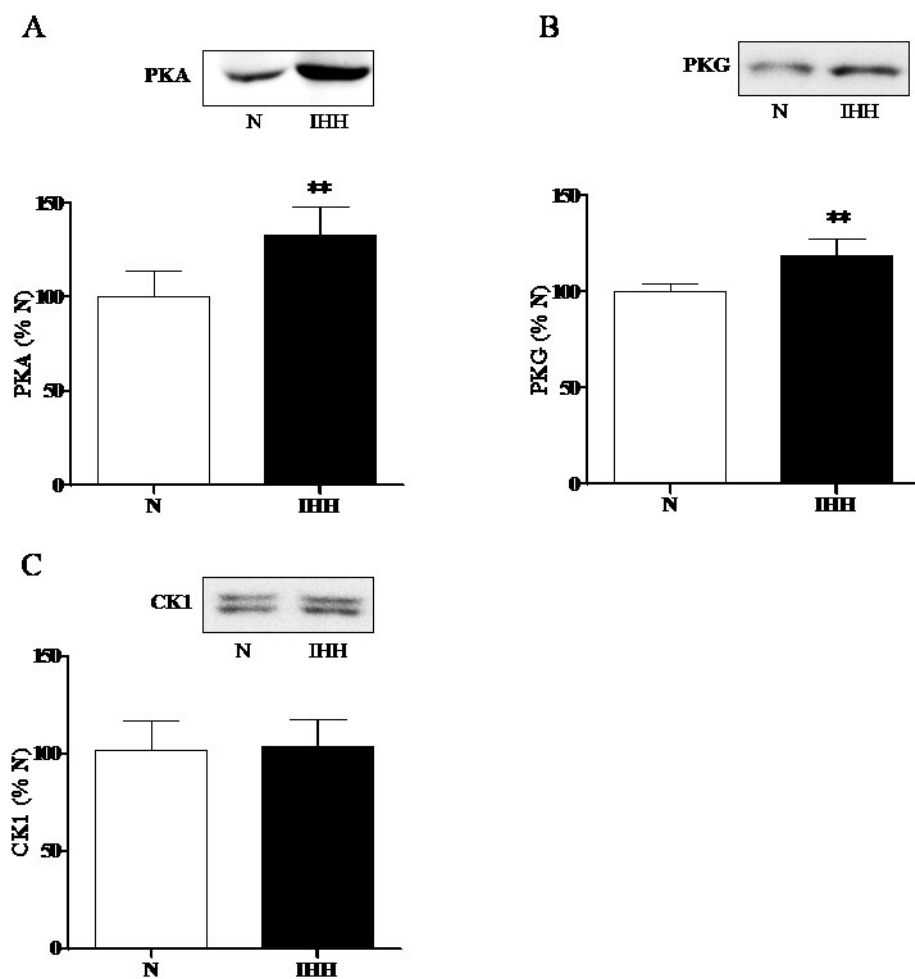
Obrázok 5. Účinok intermitentnej hypobarickej hypoxie (IHH) na expresiu celkového Cx43 v ľavej komore potkana v porovnaní s normoxiou (N). A, reprezentatívny blot; B, proteínová expresia celkového Cx43; C, proteínová expresia fosforylovaných foriem P1 + P2 Cx43; D, Pomer P1 + P2 Cx43 k celkovému Cx43. Hodnoty sú priemerné ± SD, (n = 5), ** P < 0,01. E, úroveň mRNA transkriptu proteínu alfa 1 (CXA1). Hodnoty sú priemerné ± SD, (n = 7), * P < 0,05.



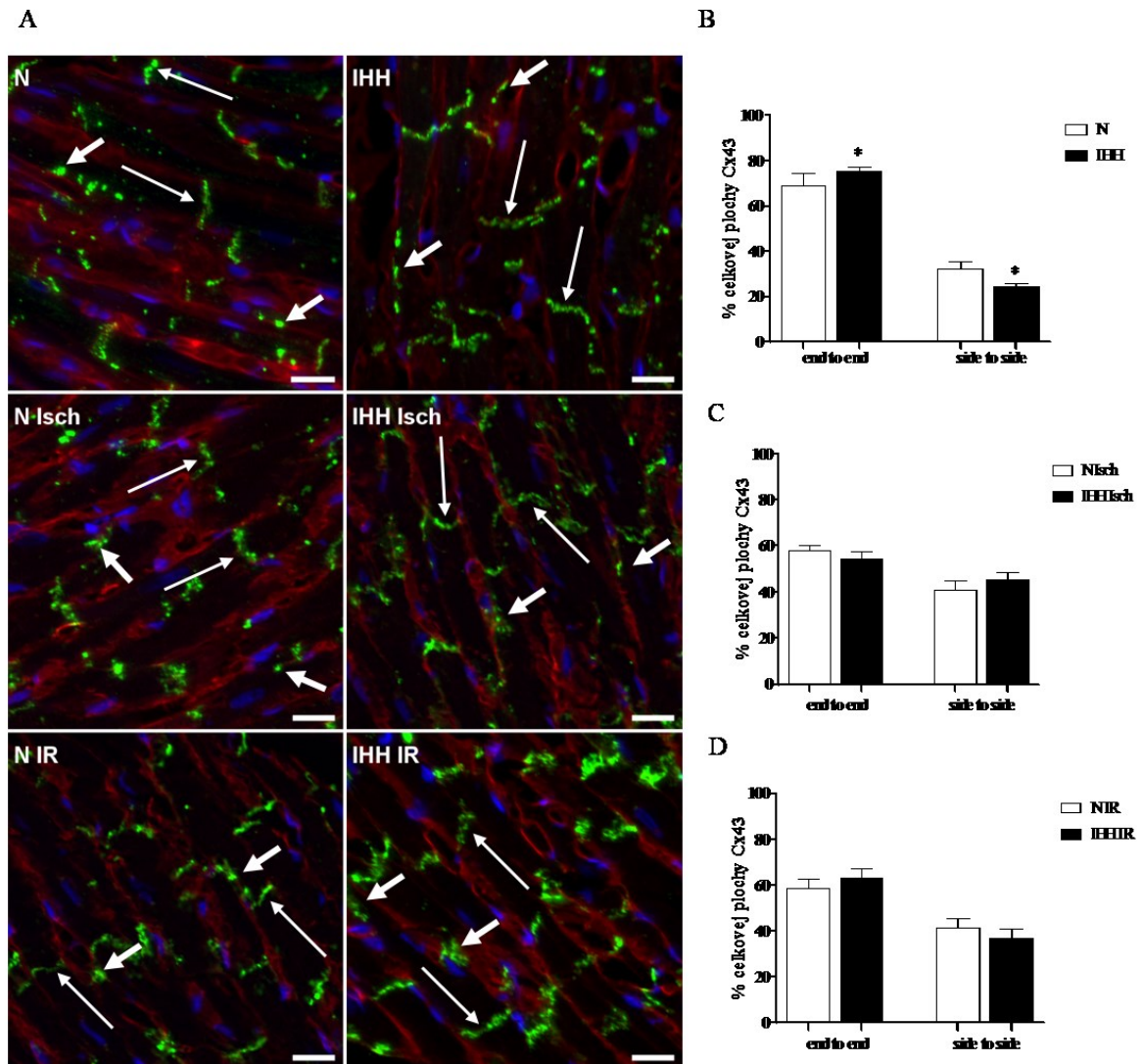
Obrázok 6. Účinek intermitentnej hypobarickej hypoxie (IHH) na proteínovú expresiu nefosforylovanej formy a fosforylovaných foriem Cx43 v ľavej komore potkana v porovnaní s normoxiou (N). A, nefosforylovaná forma Cx43; B, fosforylovaná forma Cx43 na Ser368; C, fosforylovaná forma Cx43 na Ser279/282; D, fosforylovaná forma Cx43 na Tyr265. Hodnoty sú priemerné \pm SD, (n = 5), ** P < 0,01.



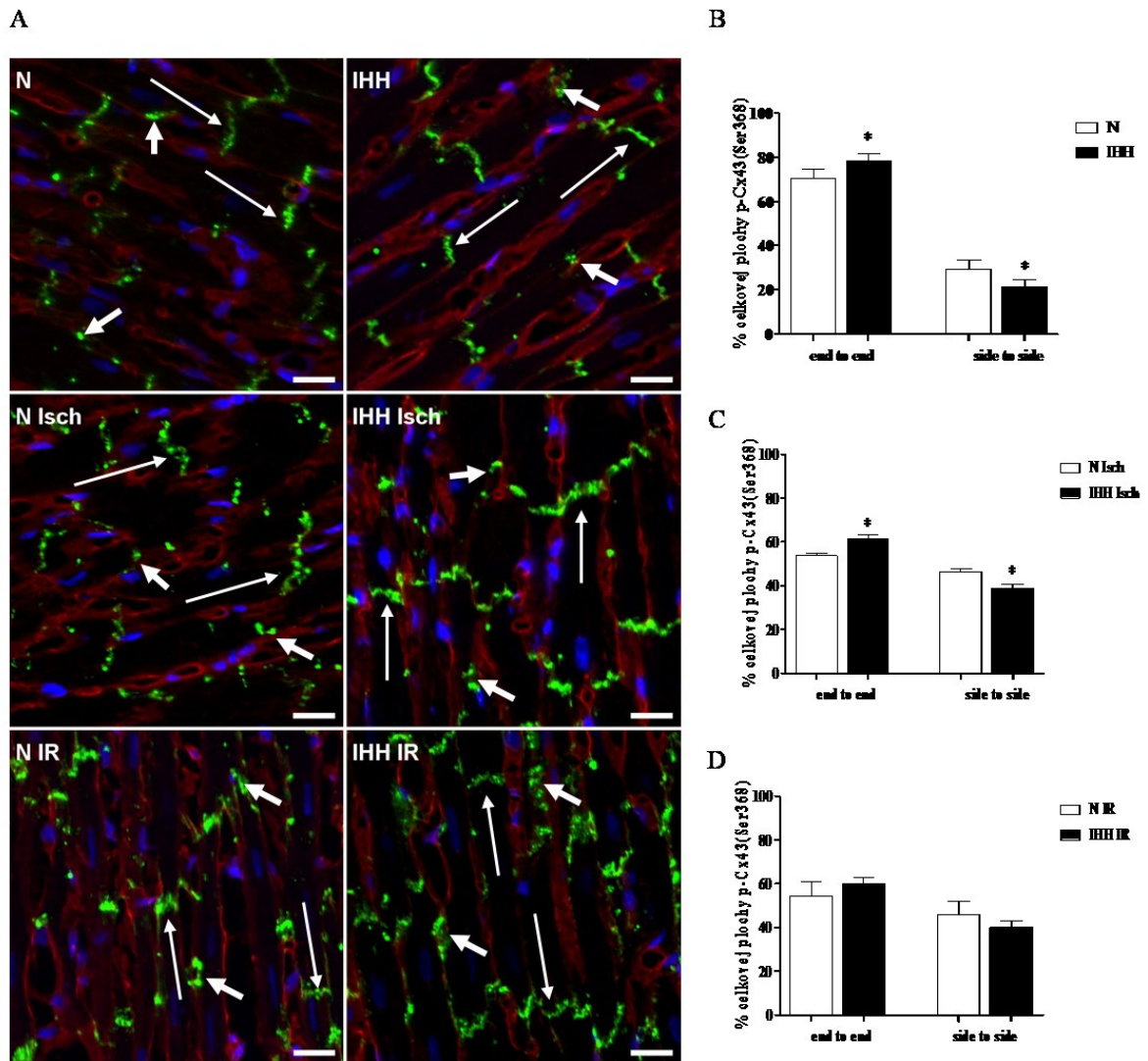
Obrázok 7. Účinok intermitentnej hypobarickej hypoxie (IHH) na fosforyláciu Cx43 v ľavej komore potkana v porovnaní s normoxiou (N) pomocou hmotnostnej spektrometrie. A, fosforylovaná forma Cx43 na Ser364; B, fosforylovaná forma Cx43 na Ser365; C, fosforylovaná forma Cx43 na Ser368. Hodnoty sú priemerné \pm SD, (n = 4), ** P < 0,01.



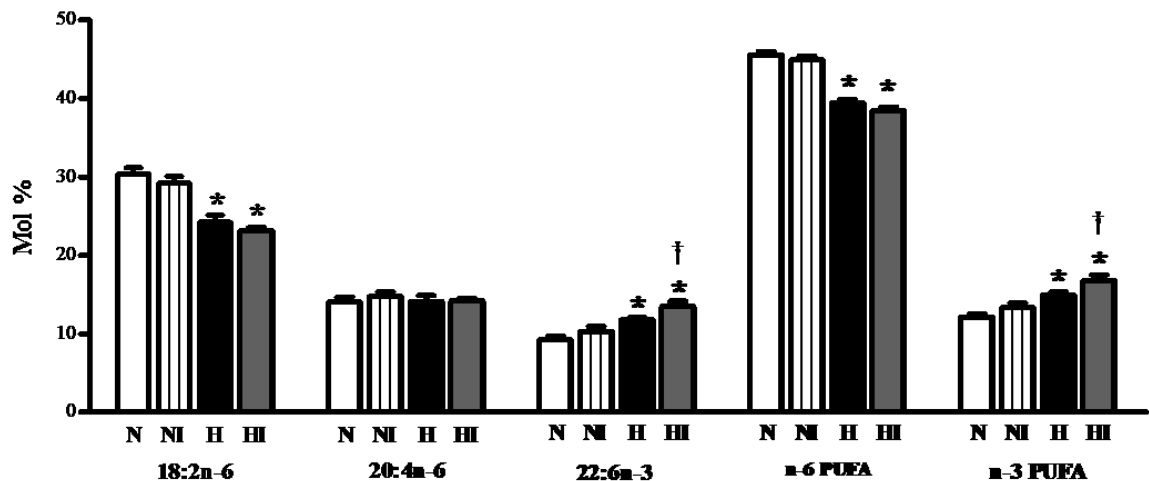
Obrázok 8. Účinok intermitentnej hypobarickej hypoxie (IHH) na proteínovú expresiu proteínkináz fosforylujúcich Cx43 v ľavej komore potkana v porovnaní s normoxiou (N). A, proteínkináza A (PKA); B, kazeínkináza 1 (CK1); C, proteínkináza G (PKG). Hodnoty sú priemerné ± SD, (n = 5), ** P < 0,01.



Obrázok 9. Účinok intermitentnej hypobarickej hypoxie (IHH) na distribúciu Cx43 počas krátkej ischemie (Isch) a reperfúzie (IR) v ľavej komore potkana v porovnaní s normoxiou (N). A, reprezentatívne mikrofotografie. B, C, D, redistribúcia 100% plochy Cx43 v *end to end* a *side to side* spojeniach v interkalárnych diskoch v ľavej komore potkanov u normoxických (N) a hypoxických (IHH) skupín, počas krátkej ischemie (Isch) a reperfúzie (IR). Zelená farba zodpovedá špecifickému farbeniu Cx43, červená farba predstavuje sarkolemmu (kontrastované s WGA) a modrá farba označuje zafarbenie jadra (DAPI). Pozitívne spojenie Cx43 je umiestnené prevažne na interkalárnych diskoch (dlhé tenké šípky) a sporadicky na bočných plochách (krátke šípky) kardiomyocytov. Stupnica mierky predstavuje 20 μ m. Hodnoty sú priemerné \pm SD, (n = 3), *** P < 0,001.

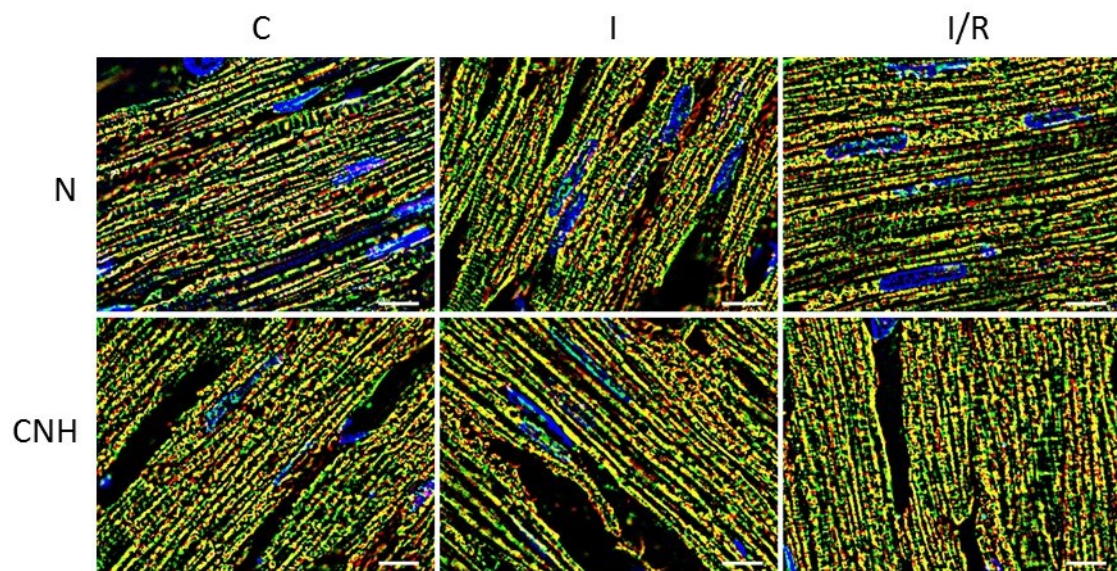


Obrázok 10. Účinok intermitentnej hypobarickej hypoxie (IHH) na distribúciu p-Cx43(Ser368) počas krátkej ischémie (Isch) a reperfúzie (IR) v ľavej komore potkana v porovnaní s normoxiou (N). A, reprezentatívne mikrofotografie. B, C, D, redistribúcia 100% plochy p-Cx43(Ser368) v *end to end* a *side to side* spojeniach v interkalárnych diskoch v ľavej komore potkanov u normoxických (N) a hypoxických (IHH) skupín, počas krátkej ischémie (Isch) a reperfúzie (IR). Zelená farba zodpovedá špecifickému farbeniu Cx43, červená farba predstavuje sarkolemmu (kontrastované s WGA) a modrá farba označuje zafarbenie jadra (DAPI). Pozitívne spojenie p-Cx43(Ser368) je umiestnené prevažne na interkalárnych diskoch (dlhé tenké šípky) a sporadicky na bočných plochách (krátke šípky) kardiomyocytov. Stupnica mierky predstavuje 20 μ m. Hodnoty sú priemerné \pm SD, (n = 3), *** P < 0,001.

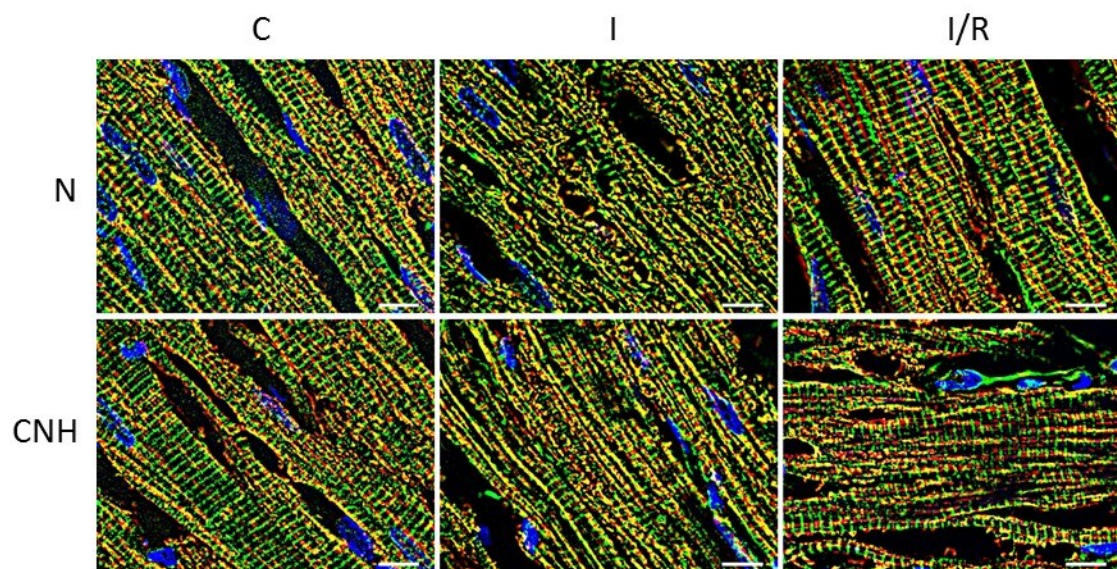


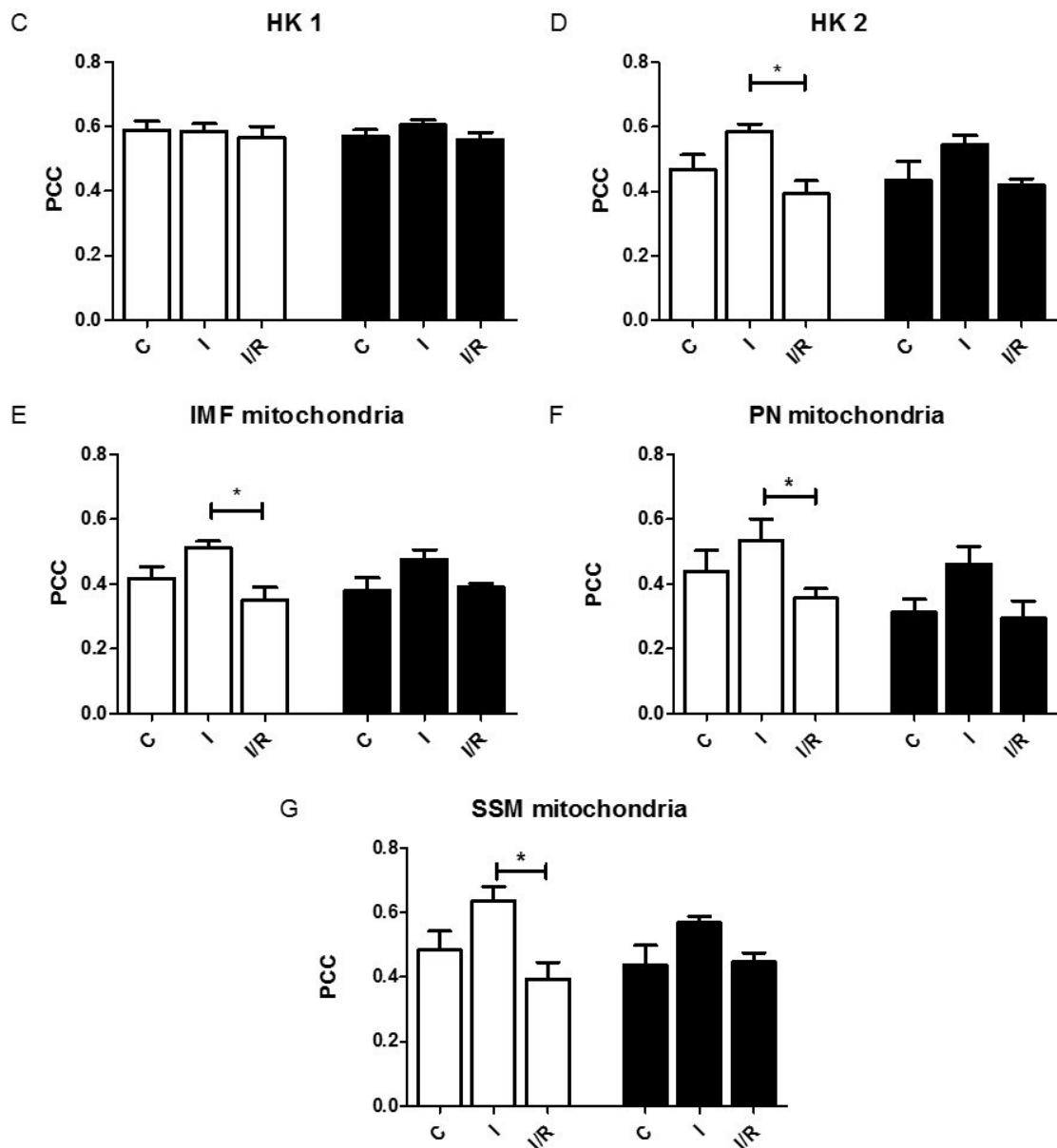
Obrázok 11. Účinok intermitentnej hypobarickej hypoxie (IHH) na hlavné polynenasýtené mastné kyseliny v ľavej komore potkana [kyselina linolová (18: 2n-6), kyselina arachidónová (20: 4n-6), kyselina dokosahexaéonová (22: 6n-3)]. Podiel n-3 PUFA na celkových fosfolipidoch v myokarde ľavej komory normoxických (N) a hypoxických (H) potkanov pri kontrolných (neischemických) podmienkach a po 10-minútovej ischémii (NI a HI). Hodnoty sú priemerné \pm SEM, (n = 7), * P <0,05 oproti normoxii, † P <0,05 oproti zodpovedajúcej kontrolnej skupine.

A



B





Obrázok 12. Účinok ischemie a reperfúzie na ko-lokalizáciu HK izoforiem s mitochondriami v srdci potkana. Repräsentatívne mikrofotografie ukazujú rozloženie HK1 (A) a HK2 (B) v pozdĺžnych kryosekciách ľavej komory kontrolného (C), ischemického (I) a reperfúзованého (IR) srdca z normoxických (horných panelov) a CNH (dolné panely). Zelená farba zodpovedá špecifickému HK farbeniu, červená farba predstavuje mitochondriálnu oblasť a modrá farba indikuje farbenie DAPI v jadre. Stupnica na mierke predstavuje 13 μ m. Ko-lokalizácia HK1 (C) a HK2 (D) s mitochondriami bola kvantifikovaná Pearsonovým korelačným koeficientom (PCC). Kolokalizácia HK2 s intermofibrilovými (MM) (E), peri-nukleárnymi (PN) (F) a subsarkolemárnymi (SSM) (G) mitochondriálnymi subpopuláciami v LV normoxických (biele stĺpce) a CNH (čierne stĺpce) potkanov. Hodnoty sú priemerné \pm SEM, (n = 5), * p < 0,05.

5.2 Cx43 v srdci po adaptácii na chlad

Vplyv akútneho chladu na expresiu celkového Cx43

Obrázok 13 znázorňuje, že expresia t-Cx43 sa nezmenila ani po 3D ani po 10D chlade (13B). Paralelne sa taktiež nezmenila expresia fosforylovaných foriem P1 + P2 Cx43 (13C). Po 3D chlade sme pozorovali len tendenciu k poklesu nefosforylovanej formy Cx43 (np-Cx43), pričom po 10D adaptácii sa expresia np-Cx43 znížila o 32 % (13D).

Vplyv akútneho chladu na redistribúciu celkového Cx43 pomocou imunofluorescencie

Kvantitatívna analýza na obrázku 14 preukázala prevažnú distribúciu t-Cx43 v *end to end* spojeniach kontrolných srdciach. t-Cx43 bol pozorovaný v menšej miere taktiež v *side to side* spojeniach (14A). Tento trend distribúcie t-Cx43 bol zachovaný aj po 3D chlade, zatiaľ čo po 10D adaptácii na chlad sa v *end to end* spojeniach prítomnosť t-Cx43 znížila a *side to side* zvýšila o 3 % (14B).

Vplyv chronického chladu a regresie na expresiu celkového Cx43

Obrázok 15 ukazuje, že expresia t-Cx43 mala tendenciu narastať po vystavení CH chladu. Tento trend pretrvával aj po R (15B). Podobná tendencia bolo pozorovaná aj u fosforylovaných foriem P1 + P2 Cx43 (15C). Naopak u np-Cx43 bola pozorovaná tendencia opačná, t.j. k zníženiu v oboch experimentálnych skupinách.

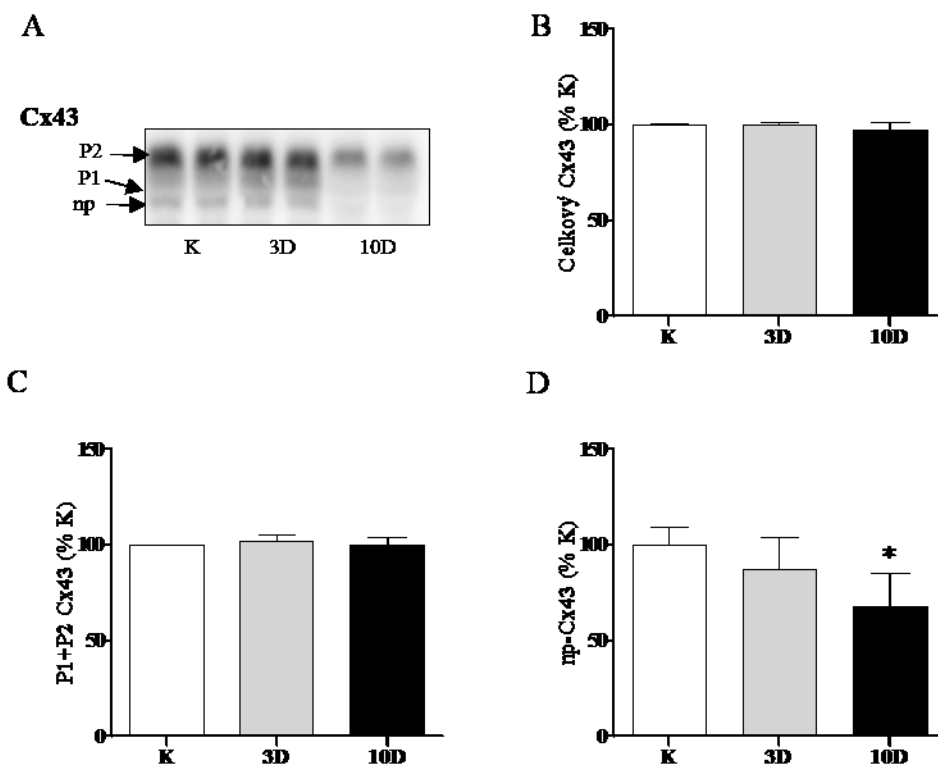
Vplyv chronického chladu a regresie na redistribúciu celkového Cx43 pomocou imunofluorescencie

Imunofarbenie (obrázok 16) preukázalo prevládajúce umiestnenie t-Cx43 na *end to end* spojeniach a v malom množstve boli tiež pozorované v *side to side* spojeniach (16A). Adaptácia na CH chlad zvýšila plochu v *end to end* spojeniach t-Cx43 o 7 % a taktiež zmenšila plochu Cx43 v *side to side* spojeniach o 7 % (16B). Po R sa distribúcia t-Cx43 vrátila na kontrolné hodnoty (16A, B).

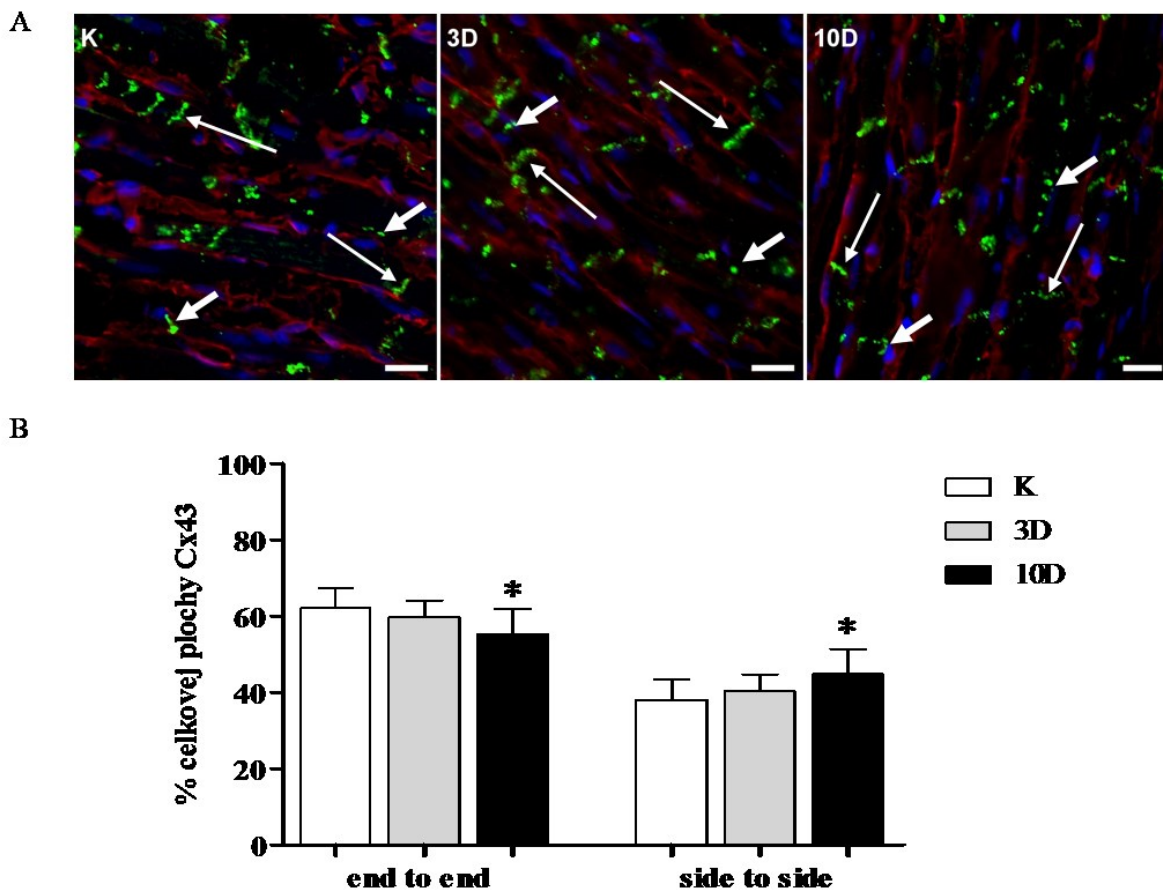
Vplyv chronického chladu a regresie na expresiu proteinkináz fosforylujúcich Cx43

Obrázok 17 prezentuje expresiu PKA, CK1, Akt, MAPK. PKA vykazovala tendenciu k poklesu po CH chlade a návrat ku kontrolnej hodnote po R (17A). CK1 sa nemenila (17B). Akt sa znížila o 9 % po CH chlade a o 17 % po R (17C). MAPK sa znížila o 21 % po CH, pričom po R sa zvýšila o 11% v porovnaní s kontrolou (17D).

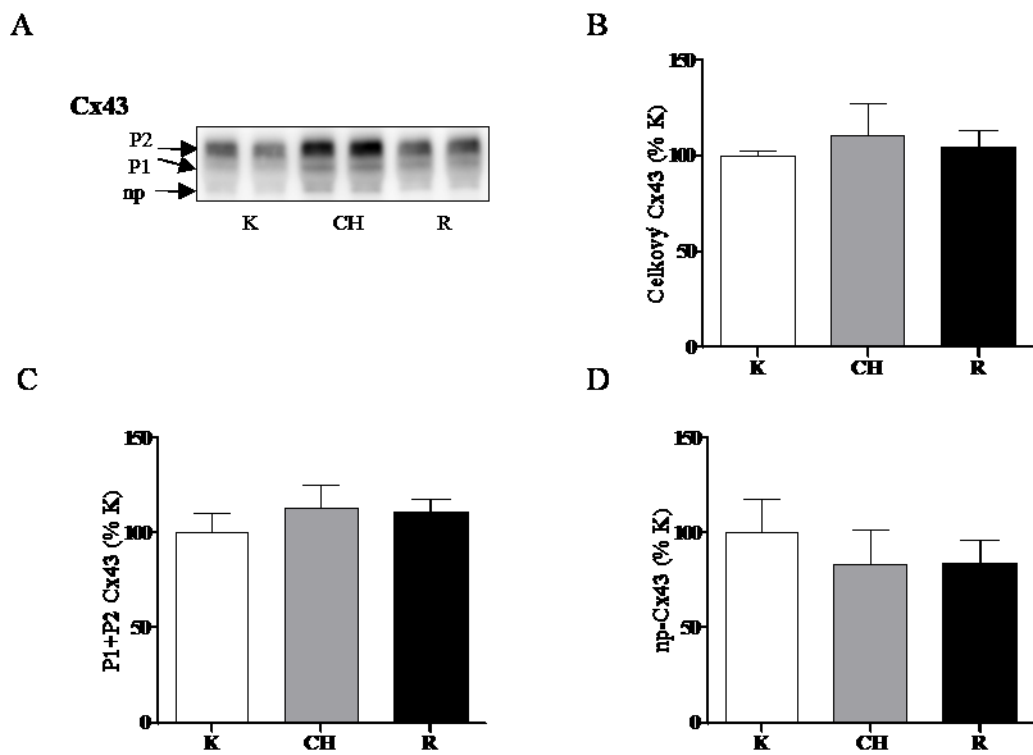
Obrázok 18 znázorňuje expresiu PKCε a PKCδ. PKCε sa zvýšila v regresii o 47 % a taktiež bola zvýšená v porovnaní s chronickým chladom o 48%. PKCδ sa zvýšila o 37 % v chronickom chlade a o 93 % v regresii. Bol pozorovaný aj nárast v regresii oproti chronickému chladu o 56 %.



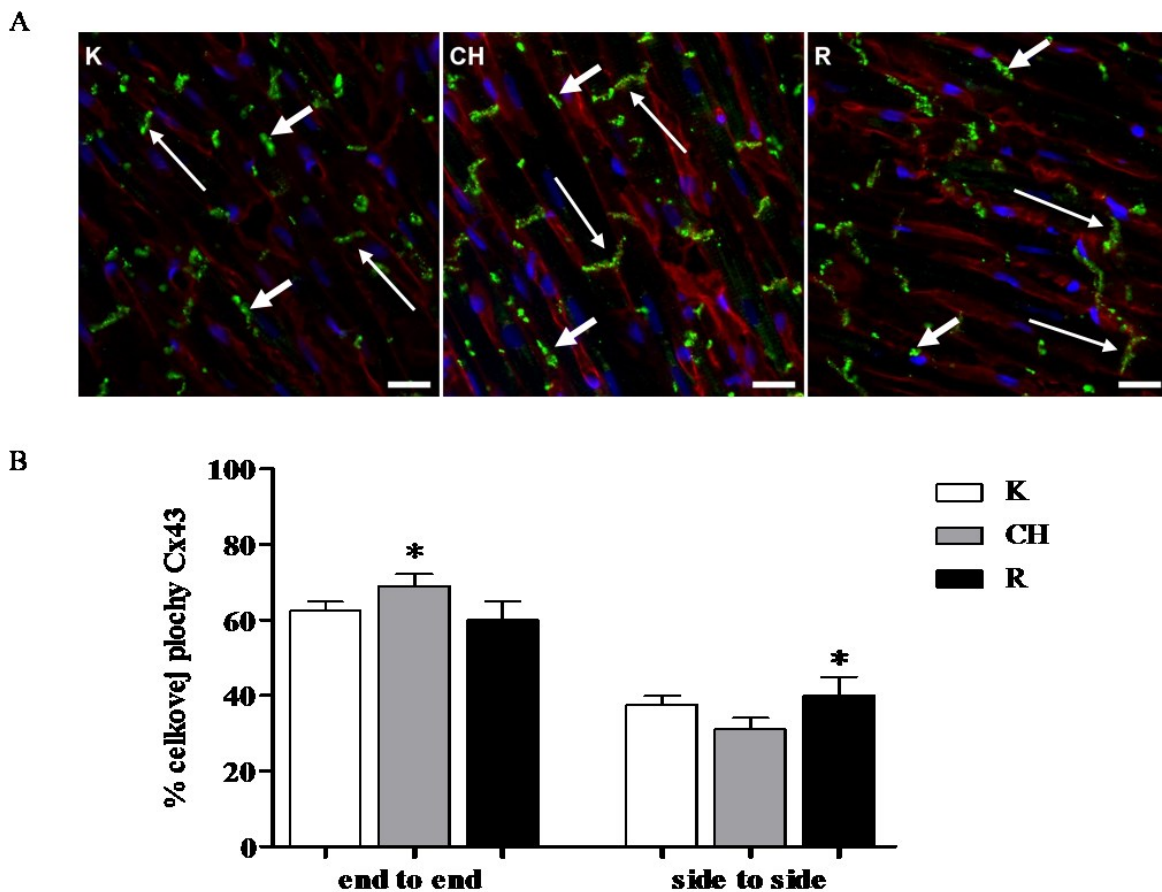
Obrázok 13. Účinok akútneho 3-dňového chladu (3D) a akútneho 10-dňového chladu (10D) na proteínovú expresiu Cx43 v ľavej komore potkana v porovnaní s kontrolou (K). A, reprezentatívny blot; B, expresia celkového Cx43; C, expresia fosforylovaných foriem P1+P2 Cx43; D, expresia nefosforylovanej formy Cx43. Hodnoty sú priemerné ± SD, (n = 5), * P < 0,05.



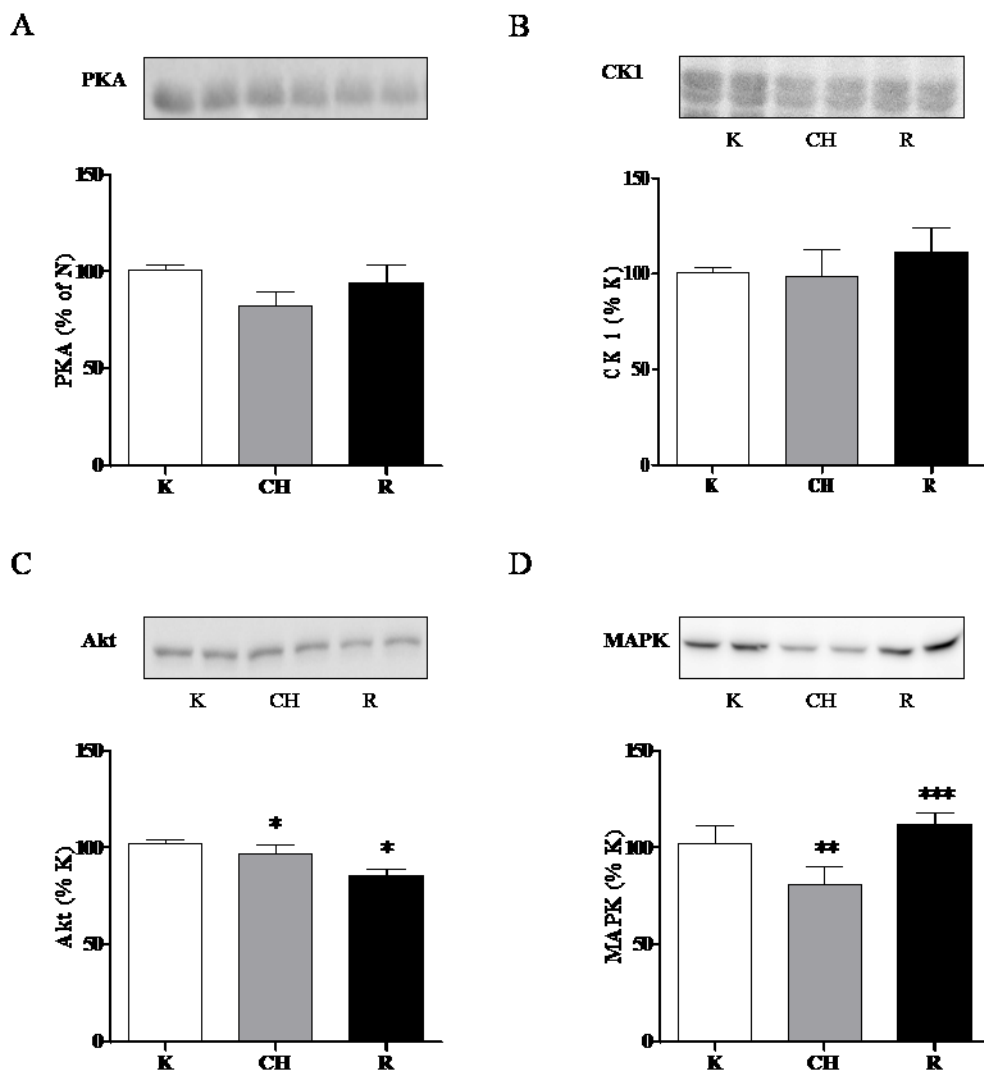
Obrázok 14. Účinok akútneho 3-dňového chladu (3D) a akútneho 10-dňového chladu (10D) na distribúciu Cx43 v ľavej komore potkana v porovnaní s kontrolou (K). A, reprezentatívne mikrofotografie. B, redistribúcia 100% plochy Cx43 v *end to end* a *side to side* spojeniach v interkalárnych diskoch v ľavej komore potkanov u K, 3D, 10D. Zelená farba zodpovedá špecifickému farbeniu Cx43, červená farba predstavuje sarkolemmu (kontrastované s WGA) a modrá farba označuje zafarbenie jadra (DAPI). Pozitívne spojenie Cx43 je umiestnené prevažne v interkalárnych diskoch (dlhé tenké šípky) a sporadicky na bočných plochách (krátke šípky) kardiomyocytov. Stupnica mierky predstavuje 20 μ m. Hodnoty sú priemerné \pm SD, (n = 4), * P < 0,05.



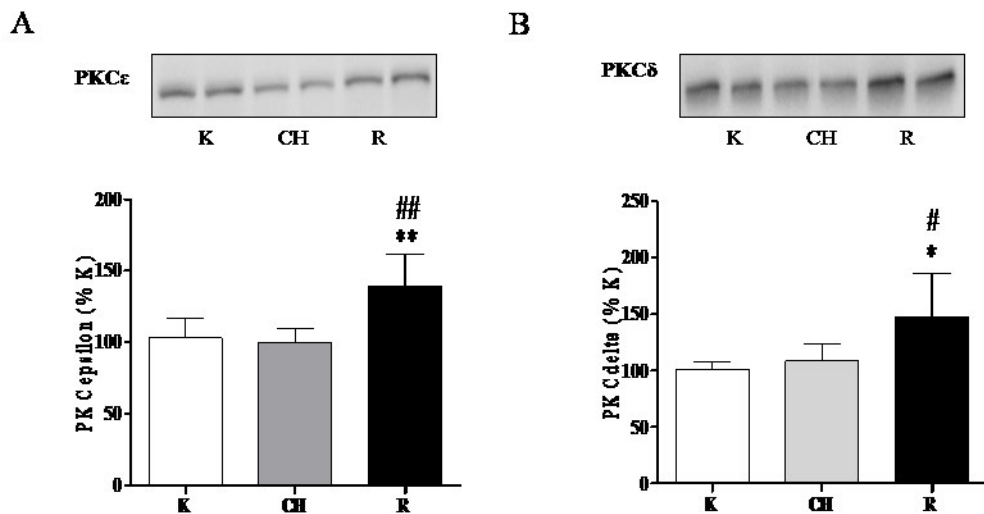
Obrázok 15. Účinok chronického chladu (CH) a regresie (R) na proteínovú expresiu Cx43 v ľavej komore potkana v porovnaní s kontrolou (K). A, reprezentatívny blot; B, expresia celkového Cx43; C, expresia fosforylovaných foriem P1+P2 Cx43; D, expresia nefosforylovanej formy Cx43. Hodnoty sú priemerné \pm SD, (n = 5).



Obrázok 16. Účinok chronického chladu (CH), regresie (R) na distribúciu Cx43 v ľavej komore potkana v porovnaní s kontrolou (K). A, reprezentatívne mikrofotografie. B, redistribúcia 100% plochy Cx43 v *end to end* a *side to side* spojeniach v interkalárnych diskoch v ľavej komore potkanov u K, CH, R. Zelená farba zodpovedá špecifickému farbeniu Cx43, červená farba predstavuje sarkolemmu (kontrastované s WGA) a modrá farba označuje zafarbenie jadra (DAPI). Pozitívne spojenie Cx43 je umiestnené prevažne v interkalárnych diskoch (dlhé tenké šípky) a sporadicky na bočných plochách (krátke šípky) kardiomyocytov. Stupnica mierky predstavuje 20 μm . Hodnoty sú priemerné \pm SD, (n = 4), * P < 0,001.



Obrázok 17. Účinok chronického chladu (CH) a regresie (R) na proteínovú expresiu proteínkináz fosforylujúcich Cx43 v ľavej komore potkana v porovnaní s kontrolou (K). A, proteínkináza A (PKA); B, kazeínkináza 1 (CK1); C, proteínkináza B (Akt), D, mitogénom aktivovaná proteínkináza (MAPK-MEK3). Hodnoty sú priemerné \pm SD, (n = 5), * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.



Obrázok 18. Účinok chronického chladu (CH) a regresie (R) na proteínovú expresiu proteínkináz C fosforylujúcich Cx43 v ľavej komore potkana v porovnaní s kontrolou (K). A, proteínkináza Cε (PKCε); B, proteínkináza Cδ (PKCδ) (B). Hodnoty sú priemerné ± SD, (n = 5), * P <0,05 voči K; ** P <0,01 voči K; # P <0,05 voči CH; ## P <0,01 voči CH.

6 DISKUSIA

6.1 Cx43 a hypoxia

V tejto štúdií sme vychádzali z predpokladu, že v mechanizme antiarytmického účinku adaptácie na IHH, sa vedľa aktivácie celej rady signálnych dráh uplatňuje taktiež aj Cx43.

Na tomto modeli sme prvýkrát demonštrovali (Kohutova et al. 2019), že antiarytmický účinok IHH je spojený so zvýšenou proteínovou expresiou celkového Cx43, fosforyláciou na seríne p-Cx43 (Ser364, Ser365, Ser368) a zníženou fosforyláciou na seríne Ser279/282 a tyrozíne Tyr265. V tomto kontexte IHH indukované zníženie mRNA transkriptu Cx43 naznačuje post-transkripčnú kontrolu hladiny proteínu Cx43. Navyše bolo zdokumentované zlepšenie lokalizácie celkového Cx43 a p-Cx43(Ser368) v *end to end* spojeniach a súčasná redukcia *side to side* spojení GJ pomocou IHH v ľavej komore potkanov. Navyše proteínová expresia PKA a PKG kináz bola taktiež zvýšená po adaptácii.

Je potrebné poznamenať, že náš experimentálny model chronickej IHH sa líši od modelov intermitentnej hypoxie pozostávajúcej z viacerých cyklov krátkej závažnej hypoxie a epizód reoxygénácie, ktoré sa používajú na simuláciu syndrómu obštrukčnej spánkovej apnoe (OSA) ako dôležitého rizikového faktora kardiovaskulárnych ochorení. Ukázalo sa, že OSA vedie k redukcii a remodelácii myokardu Cx40 a Cx43, čo môže naopak prispieť k vzniku arytmogénneho substrátu (Gemel et al. 2017).

Zistili sme, že proteínová expresia Cx43 a jeho fosforylovaných foriem P1 + P2 Cx43 sa zvýšila, zatiaľ čo nefosforylovaná forma Cx43 (np-Cx43) alebo taktiež označovaná ako nízko fosforylovaná forma sa znížila vplyvom IHH. Naša hypotéza, že upregulácia proteínov Cx43 je spojená s ochranou pred arytmiami myokardu, sú kompenzované up-reguláciou srdcového Cx43 (Vicenzova et al. 2017). Adaptácia srdca na diabetes (Lin et al. 2008) alebo stav hypotyreózy (Bacova et al. 2017) je tiež sprevádzaná zvýšenou up-reguláciou Cx43 v ľavej komore srdca, ktorá je spojená so zníženou tendenciou ku vzniku letálnych arytmií. Podobne podmienený knockout Cx43 uľahčuje proarytmický stav a prispieva ku kontraktilnej dysfunkcii srdca (Kaprielian et al. 1998; Saffitz & Yamada 1998). Je zaujímavé, že odlišná miera expresie Cx43 v myokarde (ženy viac ako muži)

s najväčšou pravdepodobnosťou spočíva v medzipohlavných rozdieloch a v sklone srdca mužov k vzniku život ohrozujúcim arytmiám a mechanickej dysfunkcii (Knezi et al. 2008; Tribulova et al. 2005). Celkovo možno predpokladať, že adaptácia srdca na chronickú hypoxiu môže byť sprevádzaná zmenami expresie a topológie Cx43 v myokarde.

Cx43 je vysoko dynamický proteín a dospelé srdce je charakterizované rýchlym obratom životného cyklu približne 1,5 hodiny (Beardslee et al. 1998). Posttranslačné modifikácie Cx43 hrajú dôležitú úlohu pri regulácii funkcie kanálov spojovacích štrbín, tzn. vodivosti a priepustnosti kanálov, v závislosti na fosforylovaných miestach (Axelsen et al. 2013). V súlade s tým je známe, že otváranie GJ kanálov, montáž a demontáž Cx43 do plazmatickej membrány je determinovaný fosforylovaným stavom Cx43 (Pogoda et al. 2016). V tejto štúdii sme preukázali, že IHH ovplyvňuje fosforylovaný stav Cx43 na jeho šiestich fosforylačných miestach (Ser364, Ser365, Ser368, Ser279/282, Tyr265). Ako sa uvádza v štúdii Solan a Lampe, PKA, proteín kináza B/Akt (Akt), CK1, MAPK a v-Src tyrozín kináza (v-Src) sa zúčastňujú kontroly fosforylácie Cx43 (Solan & Lampe 2014).

Naše zistenia ukázali, že expresia PKA aj PKG sa zvýšila, zatiaľ čo CK1 bola nezmenená v ľavej komore zvierat adaptovaných na IHH. Celkovo naše zistenia podporujú myšlienku, že GJ komunikácia v ľavej komore potkanov vystavených IHH je s najväčšou pravdepodobnosťou regulovaná modifikáciami Cx43 prostredníctvom viacerých fosforylačných miest. Zosilnená GJ komunikácia nastáva po aktivácii PKA na Cx43 Ser364/Ser365, čo vedie k zvýšeniu prenosu Cx43 na plazmatickú membránu (Tenbroek et al. 2001). Následne CK1 fosforyluje Cx43 v miestach Ser325/Ser328/Ser330 počas prechodu Cx43 z plazmatickej membrány do GJ (Cooper & Lampe 2002). Dunn a kol. 2012 zistili, že aktivita Akt reguluje stabilitu GJ a jej aktivita sa podieľala na tvorbe väčších a stabilných GJ (Dunn et al. 2012), zatiaľ čo fosforylácia v-Src na Cx43 (Tyr247/Tyr265) podporuje zníženie regulácie GJ komunikácie a spôsobuje demontáž GJ (Lin et al. 2001). Zdá sa, že fosforylácia na Ser279/Ser282 pomocou MAPK inhibuje Cx43 (Cottrell et al. 2003).

MS analýza ukázala zvýšenú PKA cieleňú fosforyláciu na miestach p-Cx43 (Ser364, Ser365), ktoré by mohli prispieť k zvýšeniu GJ spojení u p-Cx43 (Ser364) (Tenbroek et al.

2001), zatiaľ čo fosforylácia na Cx43 (Ser365) predstavuje „gatekeeper“ (Solan et al. 2007). MS analýza a Western blot tiež odhalili zvýšenú fosforyláciu Cx43 (Ser368), ktorá sa väčšinou pripisuje PKC ϵ . V práci, Hlaváčková et al. (2010) publikovali zvýšený pomer p-PKC ϵ (Ser729)/PKC ϵ indikujúci zvýšenú aktiváciu enzýmu v podmienkach IHH (Hlavackova et al. 2010). Dôležité je, že zvýšená hladina p-Cx43 (Ser368) PKC ϵ zoslabuje vodivosť Cx43 kanálov (Bao et al. 2004) a zabraňuje indukovanej komorovej fibrilácii (Lin et al. 2008). Zdá sa teda, že aktivácia PKC ϵ môže byť zapojená v potlačení arytmií súvisiacich s IHH, najpravdepodobnejšie v dôsledku spomalenia vedenia v prospech elektrickej stability.

Je známe, že aktivita Akt kontroluje stabilitu GJ a zúčastňuje sa tvorby väčších a stabilných GJ. Priama inhibícia Akt viedla k strate GJ internalizáciou. Fosforylácia Cx43 na Ser373 pomocou Akt sa javí ako kontrola veľkosti GJ prostredníctvom inhibície interakcie Cx43: ZO-1 (Dunn & Lampe 2014). Je zaujímavé, že za podmienok poškodenia alebo liečenia rastovým faktorom sa Cx43 postupne fosforyluje Akt (5 až 15 minút po ošetrení na p-Ser373), MAPK (v 15 až 30 minútach na p-Ser279/Ser282) a v-Src (počas 30 minút sa predlžuje na p-Tyr247), čo vedie k sekvenčným zmenám v GJ, vrátane zvýšenej veľkosti s následnou inhibíciou komunikácie GJ a ich internalizáciou z plazmatickej membrány (Solan & Lampe 2014). Asociácia HK s vonkajšou mitochondriálnou membránou je tiež stimulovaná Akt signálnou dráhou a bola mnohokrát preukázaná ako protektívna. Za fyziologického stavu je HK1 naviazaná na napäťovo závislý aniontový kanál a zvyšuje dodávku ADP pre ATPsyntázu. Tým zvyšuje svoju aktivitu a stimuluje glykolýzu na jednej strane a transport glukózy do kardiomyocytov na druhej strane (Southworth et al. 2006) a tak zlepšuje energetický stav kardiomyocytov za hypoxických podmienok. Preto sme sa zamerali na mitochondriálne subpopulácie (Kolar et al. 2017) a sledovali sme, či nebude toto zvýšenie prejavené v subsarkolemálnej populácii mitochondrií, ktorá by priamo podporila uptake glukózy za hypoxických či ischemických podmienok. Táto hypotéza sa nepotvrdila, ale ukázalo sa, že adaptácia na hypoxiu, zabránila odviazaniu HK2 z mitochondrií v priebehu reperfúzie, a to u všetkých mitochondriálnych subpopulácií (Kolar et al. 2017).

V tejto súvislosti sme preukázali vysoko aktivovanú Akt po 10-minútovej ischémii v hypoxickom srdci v oboch prácach (Kolar et al. 2017; Kohutova et al. 2019). Z toho vyplýva, že hypoxia aktivuje protektívne signálne dráhy, ktoré pretrvávajú počas 10-minútovej ischémie, pričom pri dlhšej expozícii ischémie dochádza k degradácii Cx43 i odpojení HK z mitochondrií.

GJ sú konzistentné a rýchlo remodelované rôznymi stimulmi. Rozdiel medzi Cx43 mRNA transkriptom a hladinou proteínu celkovým Cx43 po IHH môže súvisieť s i) transláciou a stabilitou mRNA, ktorá je regulovaná miRNA a RNA-viažúcimi proteínmi (RBP) alebo ii) zníženou rýchlosťou degradácie, ktorá môže byť ovplyvnená (MAPK, v-Src a PKC) (Solan & Lampe 2008; Sirnes et al. 2009; Salat-Canela et al. 2015; Calderon & Retamal 2016). V dôsledku toho bola redukcia Cx43 génového transkriptu uverejnená aj v hypertenznom srdci potkana, čo môže byť tiež spojené s miernou hypertrofiou ľavej komory (Egan Benova et al. 2016). Napriek tomu môžeme špekulovať, že supresia génu CXA1 v dôsledku IHH pravdepodobne aktivuje kompenzačné posttranslačné mechanizmy na zvýšenie hladín Cx43 v prospech srdcovej funkcie.

Početné štúdie naznačujú, že elektrické odpojenie GJ počas akútnej ischémie myokardu prispieva k abnormalitám pri vedení vzruchu a podporuje vznik malígnych arytmií (Peters et al. 1997; Beardslee et al. 2000; Danik et al. 2004). Bol preukázaný abnormálny nárast Cx43 lateralizácie v dôsledku ischémie sprevádzanej jej defosforyláciou (Beardslee et al. 2000; Lerner et al. 2000). V zhode s antiarytmickou ochranou indukovanou IHH, súčasná práca tiež ukazuje zmeny v distribúcii Cx43. Kvantitatívna analýza imnofluorescenčných obrázkov odhalila mierny, ale významný nárast celkového Cx43 a p-Cx43 (Ser368) na GJ *end to end* v IHH myokarde. Zatiaľ čo 10-minútová ischémia zrušila redistribúciu t-Cx43 indukovanú IHH, avšak nárast p-Cx43 (Ser368) na *end to end* pretrvával a zvýšil sa tak pomer p-Cx43 (Ser368)/t-Cx43.

V kontexte topológie Cx43 je potrebné poznamenať, že jej výrazné prerozdelenie z *end to end* na laterálne *side to side* GJ bolo pozorované v rôznych podmienkach vrátane akútnej ischémie (Beardslee et al. 2000; Duffy 2012). Znížená celková expresia Cx43 a zvýšená lateralizácia urýchľujú nástup, incidenciu, frekvenciu a trvanie ventrikulárnej tachyarytmie po oklúzii koronárnej artérie (Lerner et al. 2000). Vysoká priečna vodivosť GJ a zvýšený

priemer buniek zvýšili citlivosť na vodivý blok poskytujúcu substrát pre arytmiu (Seidel et al. 2010). Srdcové ochorenia sú často sprevádzané ako nedostatok celkového Cx43, tak aj zvýšením laterálnych spojení, čím sa zvyšuje náchylnosť srdca k malígnym arytmiám (Tribulova et al. 2015; Egan Benova et al. 2016). Na rozdiel od tohto zistenia, štúdie naznačujú, že adaptácia srdca na IHH nie je sprevádzaná takými nepriaznivými procesmi. Táto skutočnosť aspoň čiastočne vysvetľuje antiarytmické vlastnosti srdca po adaptácii na IHH.

Všeobecne platí, že antiarytmický účinok môže tiež závisieť od integrity a lipidového zloženia membrán, ktoré ovplyvňujú vodivosť a funkciu membránovo viazaných proteínov. Napríklad sa uvádza, že n-3 PUFA zlepšuje elektrickú remodeláciu, zvyšuje expresiu Cx43 a znižuje vznik arytmií u hypertenzných potkanov (Fischer et al. 2008; Radosinska et al. 2013), čo naznačuje úzky vzťah medzi Cx43 a antiarytmickým účinkom n-3 PUFA. Ukázalo sa, že IHH zvyšuje podiel n-3 PUFA v srdcových fosfolipidoch (Jezkova et al. 2002). Potravinová suplementácia potkanov počas adaptácie na IHH s n-3 PUFA mala za následok kumulatívny antiarytmický účinok, ktorý prakticky eliminoval komorové arytmie indukované I/R zranením (Hlavackova et al. 2007). Predložená štúdia ukázala, že krátka ischemia ešte viac zvyšuje už vysoký podiel n-3 PUFA v membránových fosfolipidoch v srdci vplyvom IHH, čo je v súlade so zvýšenou hladinou p-Cx43(Ser368) v *end to end* spojeniach.

Záverom môžeme povedať, IHH poskytuje antiarytmický účinok sprevádzaný zvýšenou expresiou Cx43 proteínu, fosforyláciou a pozitívnou Cx43 redistribúciou v ľavej komore. Aktivácia protizápalových kináz môže stimulovať signálne dráhy ovplyvňujúce obrat a zostavu GJ, čo vedie k zvýšenej endogénnej ochrane srdca pred životom ohrozujúcimi arytmiami.

6.2 Cx43, akútne a chronický chlad

Štúdium chladovej adaptácie má dlhodobú tradíciu, prevažne v oblasti chladového stresu. Jansky et al. (1996, 2006) sa venovali štúdiu expozície chladovému stresu u otužilcov a taktiež lokálnemu ochladzovaniu ponorením ruky do studenej vody. Pričom výsledky sa líšili v závislosti od doby trvania expozície (Jansky et al. 1996; Jansky et al. 2006).

V našej práci sme použili trochu iný model, ako sa vo väčšine prípadov uvádza, aby sme odstránili detrimentálne účinky chladu (Fregly 1982). Model bol viackrát overený voči nepriaznivým účinkom, bola vylúčená aj hypertrofia, ktorá je v literatúre často uvádzaná ako negatívny účinok chladu. Adaptácia na chlad však predstavuje doposiaľ málo študovaný model. Približne do roku 2000 bol záujem o Cx43 vo vzťahu k chladu zvýšený, avšak po tomto roku dostupnosť literatúry značne klesla a záujem o tento model na niekoľko rokov utíchol (Saitongdee et al. 2000). Pokiaľ ide o srdcový sval, informácie o chladovej adaptácii na molekulárnej úrovni úplne chýbajú. Najviac dostupnej literatúry týkajúcej sa adaptácie na chlad, prípadne Cx43 je v súvislosti s hibernáciou. Hibernácia, ako jeden zo stavov prispôsobenia sa organizmu na zníženú teplotu okolia predstavuje komplex adaptívnych procesov, ktoré zabezpečujú zachovanie životných funkcií počas nepriaznivých podmienok. Počas hibernácie bolo pozorované dramatické zníženie srdcovej frekvencie, rýchlosti dýchania, metabolizmu a krvného tlaku, po ktorom nasleduje značný pokles telesnej teploty (Saitongdee et al. 2000). Model hibernujúceho organizmu sa zásadne líši od nehibernujúceho a to v prítomnosti mechanizmov, ktoré u hibernantov zachovávajú bunkové funkcie vo veľmi nízkych teplotách (Vybiral & Jansky 1997).

V tejto práci sme prvýkrát poukázali na zmeny expresie a distribúcie Cx43 po vystavení akútnemu a chronickému chladu. Zistili sme, že proteínová expresia Cx43 a jeho fosforylovaných foriem P1 + P2 Cx43 sa nezvýšila vplyvom 3D a 10D chladu, zatiaľ čo nefosforylovaná forma Cx43 (np-Cx43) alebo taktiež označovaná ako nízko fosforylovaná forma sa znížila vplyvom 10D chladu. Imnofluorescenčné farbenie nepreukázalo zmeny v distribúcii Cx43 vplyvom 3D a 10D chladu. V prípade chronického chladu sme zaznamenali zvýšenú proteínovú expresiu celkového Cx43. Kvantitatívna analýza imunofluorescenčných obrázkov odhalila mierny nárast Cx43 *end to end* spojení

v myokarde po vystavení chronickému chladu. Naše zistenia korelujú s prácou Saitongdee (2000), kde kvantitatívna analýza ukázala výrazne vyššiu imunoexpresiu Cx43 z hľadiska počtu plakov a v oblasti plochy plakov počas hibernácie v porovnaní s kontrolou u škrečka. Keďže škrečok predstavuje hibernujúci organizmus, otázkou ostáva, môžu byť tieto poznatky prenesené aj na nehibnujúce organizmy?

Experimentálne štúdie ukázali, že izolované srdce hibernátora toleruje nízke teploty a je schopné udržiavať kontrakcie pri 0-7 °C, pričom izolované srdce u nehibernátorov sa stáva ťažko arytmické pri znížení teploty z 30 na 16 °C a zvyčajne prestane biť pri ďalšom znížení teploty zo 16 na 10 °C (Burlington & Darvish 1988). Veľkosť svalovej kontrakcie s elektrickou stimuláciou rastie u nehibernantov, keď sa teplota zníži z 37 °C na 20 °C. Ďalšie zníženie teploty vedie k zníženiu svalovej kontrakcie. Podobná inotropia vyvolaná nízkou teplotou sa prejavuje aj u hibernantov, avšak veľkosť kontrakcie sa naďalej zvyšuje, keď sa teplota ďalej znižuje na 15-10 °C a v prípade ježkov zostáva na relatívne vysokej úrovni dokonca aj pri teplote 5 °C (Liu et al. 1990).

Vzhľadom na to, že rôzne typy medzibunkových kanálov majú rozdielne vlastnosti kanálov vrátane veľkosti pórov, vodivosti a iontovej selektivity, zmeny v množstve a distribúcii konexínov v bunkách sú spojené s množstvom patologických stavov, ako je arytmia (Kanno & Saffitz 2001). Navyše je funkcia GJ regulovaná rôznymi faktormi, ako je fosforylácia, napätie, Ca^{2+} , pH. Jedným z faktorov ktorý môže ovplyvniť kontraktilitu srdca je už spomínaný Ca^{2+} . Preťaženie vápnikom pravdepodobne prispieva ku krátkodobému uchovaniu srdca pred transplantáciu srdca, a preto by sa malo pri hypotermickom zachovaní srdca zväziť zníženie voľného cytosolického vápnika. Liu et al (1994) zistili, že perfúzia s 0,5 mM Ca^{2+} pred vystavením srdca chladu zlepšuje jeho funkčné zotavenie u potkana po perfúznej konzervácii pri 5 °C počas 18 hodín (Liu et al. 1994). Niekoľko experimentálnych nálezov je v súlade s hypotézou, že dochádza k preťaženiu Ca^{2+} v srdcových bunkách počas hypotermie u nehibernátorov (králika a potkana), ale nie u hibernátorov. Toto bolo potvrdené meraním voľného cytosolického Ca^{2+} , ktoré sa významne zvýšilo u potkanov s klesajúcou teplotou, zatiaľ čo izolované komorové myocyty z hibernátora (Richardsonova veвериčka) boli značne menej ovplyvnené (Johansson 1996).

V prípade akútneho chladu bola popísaná úloha adrenergdného systému u človeka v termogenéze (Simeckova et al. 2000). Naše zistenia preukázali nesignifikantné zníženie expresie u PKA chronického chladu, ale u Akt došlo vplyvom chronického chladu a regresie k signifikantnému zníženiu. Rozhodujúcou signalizačnou dráhou, ktorá reguluje srdcový rytmus, je β 1-adrenergná signalizácia, ktorá vedie pomocou cAMP k aktivácii PKA (Madamanchi 2007). Hoci cAMP je potrebný pre aktiváciu PKA, existujú ďalšie regulačné mechanizmy, ktoré presne diktujú, kde a kedy je kináza aktivovaná v reakcii na špecifické podnety. Aj keď mnoho extracelulárnych signálov používa rovnaký systém druhého posla, protikladné účinky adenylátcyklázy a fosfodiesteráz generujú lokalizované gradienty cAMP a majú najväčší vplyv na koncentrované zásoby PKA v neaktívnej konformácii (Sim & Scott 1999). Bolo preukázané, že počas hibernácie dochádza k poklesu tvorby cAMP v komorách, čo môže taktiež znižovať GJ komunikáciu (Pleschka et al. 1996). Tieto zistenia sú v súlade s našimi doposiaľ nepublikovanými výsledkami, kde sme pozorovali zníženú expresiu adenylátcyklázy vplyvom chronického chladu.

Akt signalizácia môže tiež zlepšiť kontraktilnú funkciu tým, že ovplyvní cyklus vápnika v myokarde, ktorý hrá rozhodujúcu úlohu pri kontraktilite a relaxácii kardiomyocytov (Chaanine & Hajjar 2011). Zvyšovanie Ca^{2+} prúdu ($I_{\text{Ca}, \text{L}}$) cez kanálový komplex Ca^{2+} typu L a zvýšené uvoľňovania Ca^{2+} zo SR sú dva mechanizmy, ktorými sa môže zvýšiť inotropizmus. Pokiaľ ide o prvý mechanizmus, Catalucci et al. 2009 preukázali, že Akt priamo kontroluje hustotu proteínu komplexu Ca^{2+} -kanál typu L a $I_{\text{Ca}, \text{L}}$ tým, že zabraňuje degradácii $\text{Ca}_v\alpha 1$, podjednotky tvoriacej póry Ca^{2+} -kanálu typu L (Catalucci et al. 2009). Kim et al. (2003) popísali zvýšenú hodnotu $I_{\text{Ca}, \text{L}}$ na modeli myši Akt-E40K Tg, čo naznačuje prítomnosť mechanizmu závislého od Akt schopného modulovať manipuláciu s Ca^{2+} na sarkoleme (Kim et al. 2003). V súlade s tým bol zvýšený $I_{\text{Ca}, \text{L}}$ izolovaný z kardiomyocytov myši s deficitnou fosfatázou a tenzínovým homológom, antagonistom PI3K a aktivátorom Akt (Sun et al. 2006). Avšak srdcová funkcia sa ukázala byť znížená in vivo. Negatívny inotropný účinok bol vysvetlený ako dôsledok zvýšenej regulácie izoformy γ PI3K, ktorá reguluje cAMP fosfodiesterázu a vedie k zníženiu hladín cAMP (Crackower et al. 2002).

WB analýza taktiež odhalila zvýšenú expresiu PKC δ v chronickom chlade a v regresii, pričom expresia PKC ϵ mala tendenciu sa znižovať vplyvom chronického chladu, v regresii bol naopak pozorovaný jej nárast. Aj keď sú PKC ϵ a PKC δ členmi tej istej podskupiny, PKC δ (bežne označovaná ako kináza smrti) a PKC- ϵ (bežne označovaná ako kináza prežitia) sprostredkovávajú kontrastné a dokonca protikladné účinky (Singh et al. 2017). Hoci majú tieto kinázy protišľahlé úlohy, obe pôsobia v rovnakom smere počas vývoja hypertrofiie (Dorn & Force 2005). Bolo pozorované, že v kultivovaných kardiomyocytoch regulujú izoformy PKC kontraktilitu a hypertrofiu (Dorn & Mochly-Rosen 2002). Song et al (2015) vytvorili myši, ktoré nemali PKC ϵ a PKC δ v kardiomyocytoch, a to buď na začiatku vývoja srdca, alebo po narodení. Zatiaľ čo nedostatok buď samotnej PKC δ alebo PKC ϵ mal minimálne dôsledky na rozvoj srdca alebo jeho funkciu, ich kombinovaný deficit vyvolal nekontrolovaný rast kardiomyocytov, masívnu proliferáciu fetálnych kardiomyocytov a prehnanú hypertrofiu v dospelých srdciach (Song et al. 2015). Selektívna aktivácia PKC ϵ inhibuje Ca²⁺-kanál typu L v srdci (Hu et al. 2000). V súlade s týmto poznatkom je aj práca Liu et al, kde ako odpoveď na hypotermiu bola taktiež pozorovaná znížená pokojová sila po kontrakcii myokardu, čo je pravdepodobne ovplyvnené zníženým výlevom Ca²⁺. Nárast intracelulárneho vápnika nad normálnu diastolickú hodnotu by aktivoval prechodný vnútorný prúd (Colquhoun et al. 1981), čo by mohlo spôsobiť následnú depolarizáciu, ktorá by mohla iniciovať extrasystoly, a tak vyvolať vznik ťažkých arytmií v srdci (Cranefield 1977).

Ako už bolo niekoľkokrát spomenuté fosforylácia taktiež prispieva k regulácii otvárania/zatvárania GJ kanálov. Ďalšou sledovanou kinázou bola CK1, ktorej proteínova expresia sa vplyvom chronického chladu a regresie nezmenila. CK1 fosforyluje Cx43 v miestach Ser325/Ser328 Ser330 počas prechodu Cx43 z plazmatickej membrány do GJ (Cooper & Lampe 2002). Proteíny tepelného šoku sú zvýšené pri chlade a existujú dôkazy, že tieto proteíny, konkrétne heat shock protein 70 (HSP70), chráni Cx43 pred degeneráciou (Laing et al. 1998). Tomu nasvedčujú aj naše zistenia, kde v chronickom chlade bola pozorovaná znížená expresia MAPK vplyvom chronického chladu, pričom v regresii bola zvýšená. MAPK fosforyluje Cx43 na Ser279/Ser282, čím reguluje proces internalizácie a degradácie Cx43.

7 ZÁVER

Kardiovaskulárne ochorenia predstavujú významné príčiny úmrtnosti v dôsledku arytmií a následného kontraktilného srdcového zlyhania, pri ktorých je alarmujúca prevalencia rizikových faktorov u mladých ľudí. Srdcové ochorenia sú často sprevádzané zhoršenou funkciou mitochondrií, rozvíjajúcim oxidatívnym stresom, poklesom celkového Cx43 a zvýšením laterálnych spojení, čím sa zvyšuje sklon srdca k malígnym arytmiám.

Tato práca sa prevažne zaoberá úlohou konexínov a ich potenciálnych upstream kináz v dvoch protektívnych antiarytmických režimoch adaptácie na hypoxiu (IHH) a adaptácie na chlad (CH). Vedľa toho výsledky tejto práce nadväzujú na už publikované dáta týkajúce sa ochrany mitochondrií zvýšenou asociáciou hexokinázy u antiarytmického režimu IHH a študovaním tohto javu u CNH a následných ischemických podmienkach. Ochrana mitochondrií pred nadmernou produkciou ROS v hypoxii a následným I/R poškodením pomocou zvýšenej asociácie hexokinázy preukázala rozdiely medzi antiarytmickou IHH a proarytmickou CNH. V prípade IHH asociácia hexokinázy 1 aj 2 významne rastie, pričom vplyvom CNH sa asociácia nezmenila ani u jednej z izoform. Dôležitým nálezom však je, že CNH znížila mieru odojenia HK2 z mitochondrií v priebehu reperfúzie v porovnaní s kontrolami.

Naše výsledky na modeli IHH ukázali, zvýšenú expresiu, fosforyláciu a súčasne zníženou lateralizáciu konexínov, čo môže závažne prispievať k už známemu antiarytmickému účinku. Zistili sme, že IHH ovplyvňuje fosforylovaný stav Cx43 na jeho šiestich fosforylačných miestach (Ser364, Ser365, Ser368, Ser279/282, Tyr265), čo bolo v súlade s detekovanými alebo už publikovanými upstram kinázami. Zatiaľ čo v akútnej expozícii chladu, ktorá arytmie nemení, nedochádza ani k podstatným zmenám v expresii a fosforylácii konexínov. U chronickej CH adaptácie sa znižuje lateralizácia v súlade s jej antiarytmickým účinkom. Nachádzame tiež zásadne rozdiely v aktivácii upstream kináz medzi IHH a CH. V priebehu I/R poškodenia u adaptovaných zvierat na IHH, došlo k ďalšiemu zníženiu lateralizácie konexínov, čo bolo v súlade s navýšením n-3 PUFA,

Záverom môžeme povedať, že naše práce priniesli originálne výsledky, ktoré otvárajú nové pohľady na kardioprotektívne režimy adaptácií a k úplnému porozumeniu týchto mechanizmov je nutné ďalšie štúdium.

8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Ahmad, S. & Evans, W., 2002. Post-translational integration and oligomerization of connexin 26 in plasma membranes and evidence of formation of membrane pores: implications for the assembly of gap junctions. *Biochem J*, 365(Pt 3), pp.693–699.
- Akita, Y., 2002. Protein kinase C-epsilon (PKC-epsilon): its unique structure and function. *Journal of biochemistry*, 132(6), pp.847–52.
- Ambrosi, C. et al., 2016. Connexin43 Forms Supramolecular Complexes through Non-Overlapping Binding Sites for Drebrin, Tubulin, and ZO-1. *PLoS One*, 11(6), p.e0157073.
- Andersson, C. & Vasan, R., 2018. Epidemiology of cardiovascular disease in young individuals. *Nat Rev Cardiol.*, 15(4), pp.230–240.
- Archard, H. & Denys, F., 1979. Development of annular gap junctions in guinea pig epithelia. *J. Oral Pathol.*, 8(4), pp.187–197.
- Arnostova, P. et al., 2011. Electrophoretic Mobility of Cardiac Myosin Heavy Chain Isoforms Revisited : Application of MALDI TOF / TOF Analysis. *J Biomed Biotechnol*, 2011, p.634253.
- Arora, K.K. & Pedersen, L., 1988. Functional Significance of Mitochondrial Bound Hexokinase in Tumor Cell Metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(33), pp.17422–17428.
- Asemu, G. et al., 1999. Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia- induced arrhythmias. involvement of mitochondrial KATP channel. *J Mol Cell Cardiol*, 31, pp.1821–1831.
- Asemu, G. et al., 2000. Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats. *Physiol. Res.*, 49, pp.597–606.
- Axelsen, L.N., Calloe, K. & Nielsen, M.S., 2013. Managing the complexity of communication : regulation of gap junctions by post-translational modification. *Front Pharmacol*, 4(October), pp.1–18.
- Bacova, B. et al., 2017. Altered thyroid status affects myocardial expression of connexin-43 and susceptibility of rat heart to malignant arrhythmias that can be partially normalized by red palm oil intake. *Histochem Cell Biol*, 147(1), pp.63–73.
- Bacova, B. et al., 2010. Omega-3 fatty acids and atorvastatin suppress ventricular fibrillation inducibility in hypertriglyceridemic rat hearts: implication of intracellular coupling protein, connexin-43. *J Physiol Pharmacol*, 61(6), pp.717–723.
- Bao, X., Reuss, L. & Altenberg, G.A., 2004. Regulation of Purified and Reconstituted Connexin 43 Hemichannels by Protein Kinase C-mediated Phosphorylation of Serine 368. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), pp.20058–20066.
- Batra, N. et al., 2014. Direct regulation of osteocytic connexin 43 hemichannels through AKT

- kinase activated by mechanical stimulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(15), pp.10582–10591.
- Beardslee, M.A. et al., 2000. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res*, 87(8), pp.656–663.
- Beardslee, M.A. et al., 1998. Rapid Turnover of Connexin43 in the Adult Rat Heart. *Circ Res*, 83(6), pp.629–635.
- Berthoud, V.M. et al., 1997. The gap-junction protein connexin 56 is phosphorylated in the intracellular loop and the carboxy-terminal region. *Eur J Biochem*, 244(1), pp.89–97.
- Beyer, E. & Berthoud, V., 2009. The Family of Connexin Genes. In *Connexins: A Guide*. New York.
- Billman, G.E. et al., 2006. Endurance exercise training attenuates cardiac β_2 -adrenoceptor responsiveness and prevents ventricular fibrillation in animals susceptible to sudden death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, (290), pp.2590–2599.
- Blumberg, M.S., 1997. Ontogeny of cardiac rate regulation and brown fat thermogenesis in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J. Comp. Physiol. B*, 167, pp.552–557.
- Boehr, D.D., Nussinov, R. & Wright, P.E., 2009. The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nat Chem Biol*, 5(11), pp.789–796.
- Boengler, K., Schulz, K. & Heusch, K., 2006. Connexin 43 signalling and cardioprotection. *Heart*, 92, pp.1724–1727.
- Borchet, G., Yang, C. & Kolar, F., 2011. Mitochondrial BKCa channels contribute to protection of cardiomyocytes isolated from chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300(2), pp.H507–H513.
- Brown, D.A. & Rourke, B.O., 2010. Cardiac mitochondria and arrhythmias. *Cardiovascular Research*, 88, pp.241–249.
- Bryson, J.M. et al., 2002. Increased Hexokinase Activity, of Either Ectopic or Endogenous Origin, Protects Renal Epithelial Cells against Acute Oxidant-induced Cell Death*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(13), pp.11392–11400.
- Bukauskas, F.F. et al., 2000. Clustering of connexin 43 – enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, pp.2556–2561.
- Burghardt, R. et al., 1995. Cyclic AMP induces rapid increases in gap junction permeability and changes in the cellular distribution of connexin43. *J Membr Biol*, 148(3), pp.243–253.
- Burlington, R. & Darvish, A., 1988. Low-Temperature Performance of Isolated Working Hearts from a Hibernator and a Nonhibernator. *Physiological Zoology*, 61(5), pp.387–395.

- Calderon, J.F. & Retamal, M.A., 2016. Regulation of connexins expression levels by MicroRNAs, an update. *Frontiers in Physiology*, 7(NOV), pp.1–8.
- Cameron, S.J. et al., 2003. Regulation of epidermal growth factor-induced connexin 43 gap junction communication by big mitogen-activated protein kinase1/ERK5 but not ERK1/2 kinase activation. *J Biol Chem*, 278(20), pp.18682–18688.
- Catalucci, D. et al., 2009. Akt regulates L-type Ca²⁺ channel activity by modulating Cav α 1 protein stability. *J Cell Biol*, 184(6), pp.923–933.
- Chaanine, A.H. & Hajjar, R.J., 2011. AKT signalling in the failing heart. *European Journal of Heart Failure*, 13(8), pp.825–829.
- Chinkers, M. et al., 1989. A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature*, 338(6210), pp.78–83.
- Chkourko, H. et al., 2012. Remodeling of mechanical junctions and of microtubule-associated proteins accompany cardiac connexin43 lateralization. *Heart Rhythm*, 49(6), pp.1133–1140.
- Chung, T. et al., 2007. 18 β -glycyrrhetic acid promotes src interaction with connexin43 in rat cardiomyocytes. *J Cell Biochem*, 100(3), pp.653–664.
- Colquhoun, D. et al., 1981. Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells. *Nature*, 294, pp.752–754.
- Cooper, C.D. & Lampe, P.D., 2002. Casein Kinase 1 regulates Connexin-43 gap junction assembly. *J Biol Chem*, 277(47), pp.44962–44968.
- Cottrell, G.T. et al., 2003. Mechanism of v-Src- and mitogen-activated protein kinase-induced reduction of gap junction communication. *AM J Physiol Cell Physiol*, 284(2), pp.C511-520.
- Cox, J. et al., 2014. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics*, 13(9), pp.2513–2526.
- Crackower, M. et al., 2002. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell*, 110(6), pp.737–749.
- Cranefield, P., 1977. Action potentials, afterpotentials, and arrhythmias. *Circ Res.*, 41(4), pp.415–423.
- Crow, D.S. et al., 1990. Phosphorylation of Connexin43 Gap Junction Protein in Uninfected and Rous Sarcoma Virus-Transformed Mammalian Fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 10(4), pp.1754–1763.
- Cruciat, C., 2014. Casein kinase 1 and Wnt/ β -catenin signaling. *Curr Opin Cell Biol.*, (31), pp.46–55.
- Da-Silva, S.W. et al., 2004. Mitochondrial Bound Hexokinase Activity as a Preventive Antioxidant Defense. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(38), pp.39846–39855.

- Danik, S.B. et al., 2004. Modulation of cardiac gap junction expression and arrhythmic susceptibility. *Circulation Research*, 95(10), pp.1035–1041.
- Davis, L. et al., 1995. Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 10 Pt 1, pp.813–22.
- Dbouk, H. a et al., 2009. Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell commun Signal*, 7, p.4.
- Desseyn, J., Burton, K.A. & Mcknight, G.S., 2000. Expression of a nonmyristylated variant of the catalytic subunit of protein kinase A during male germ-cell development. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 97(12), pp.6433–6438.
- Dhein, S., 2006. Cardiac ischemia and uncoupling: gap junctions in ischemia and infarction. *Advances in cardiology*, 42, pp.198–212.
- Dhein, S., 1998. Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation. *Trends in pharmacological sciences*, 19(6), pp.229–41.
- Doble, B.W., Ping, P. & Kardami, E., 2000. The epsilon subtype of protein kinase C is required for cardiomyocyte connexin-43 phosphorylation. *Circulation research*, 86(3), pp.293–301.
- Dorn, G. & Force, T., 2005. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*, 115, pp.527–537.
- Dorn, G. & Mochly-Rosen, D., 2002. Intracellular transport mechanisms of signal transducers. *Annu Rev Physiol*, 64, pp.407–429.
- Duffy, H.S. et al., 2002. pH-Dependent Intramolecular Binding and Structure Involving Cx43 Cytoplasmic Domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(39), pp.36706–36714.
- Duffy, H.S. et al., 2004. Regulation of connexin 43 protein complexes by intracellular acidification. *Circ Res*, 94, pp.215–222.
- Duffy, H.S., 2012. The Molecular Mechanisms of Gap Junction Remodeling. *Heart Rhythm*, 9(8), pp.1331–1334.
- Dunn, C.A. et al., 2012. Activation of Akt, not connexin 43 protein ubiquitination, regulates gap junction stability. *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), pp.2600–2607.
- Dunn, C.A. & Lampe, P.D., 2014. Injury-triggered Akt phosphorylation of Cx43: a ZO-1-driven molecular switch that regulates gap junction size. *J Cell Sci*, 127(2), pp.455–464.
- Dupont, E. et al., 2001. Altered connexin expression in human congestive heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 33(2), pp.359–71.
- Egan Benova, T. et al., 2016. Protection of cardiac cell-to-cell coupling attenuate myocardial remodeling and proarrhythmia induced by hypertension. *Physiological research*, 65 Suppl 1, pp.29–42.
- Ek-Vitorin, J.F. et al., 1996. pH regulation of connexin43: Molecular analysis of the gating

- particle. *Biophysical Journal*, 71(3), pp.1273–1284.
- Ek-Vitorin, J.F. et al., 2006. Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C-dependent phosphorylation. *Circulation Research*, 98(12), pp.1498–1505.
- Elenes, S. et al., 2001. Heterotypic docking of Cx43 and Cx45 connexons blocks fast voltage gating of Cx43. *Biophysical Journal*, 81(3), pp.1406–1418.
- Elfgang, C. et al., 1995. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.*, 129(3), pp.805–817.
- Falk, M., Kells, R. & Berthoud, V., 2014. Degradation of connexins and gap junctions. *FEBS Letters*, 588(8), pp.1221–1229.
- Ferreira, J.C.B., Mochly-Rosen, D. & Boutjdir, M., 2012. Regulation of cardiac excitability by protein kinase C isozymes. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 4, pp.532–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22202075>.
- Fialová, M. et al., 2008. Adaptation of the Heart to Hypertension is Associated with Maladaptive Gap Junction Connexin-43 Remodeling. *Physiol. Res.*, 8408, pp.7–11.
- Fiedler, J. et al., 2006. Cold stress induces metabolic activation of thyrotrophin-releasing hormone-synthesising neurones in the magnocellular division of the hypothalamic paraventricular nucleus and concomitantly changes ovarian sympathetic activity parameters. *J Neuroendocrinol*, 18(5), pp.367–376.
- Fischer, R. et al., 2008. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and direct renin inhibition improve electrical remodeling in a model of high human renin hypertension. *Hypertension*, 51(2), pp.540–546.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 55(5), pp.999–1033.
- Fontes, M.S.C. et al., 2012. Functional consequences of abnormal Cx43 expression in the heart. *BBA - Biomembranes*, 1818, pp.2020–2029.
- Frantz, S. et al., 2013. Stress-dependent dilated cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of cyclic GMP-dependent protein kinase I. *European Heart Journal*, (34), pp.1233–1244.
- Fregly, M., 1982. Thermogenic drinking: mediation of osmoreceptors and angiotensin II pathway. *Fed Proc*, 41, pp.2515–2519.
- Gaietta, G. et al., 2002. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science*, 296(5567), pp.503–507.
- Gao, L. et al., 2016. A rabbit pulmonary vein myocyte isolation method based on simultaneous heart and pulmonary vein perfusion. *Sheng Li Xue Bao*, (68), pp.50–56.
- Garcia-Dorado, D., Rodriguez-Sinovas, A. & Ruiz-Meana, M., 2004. Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovascular Research*, 15(61), pp.386–401.

- Gemel, J. et al., 2017. Intermittent hypoxia causes NOX2-dependent remodeling of atrial connexins. *BMC Cell Biology*, 18(Suppl 1), pp.1–10.
- Gerdes, A.M. & Iervasi, G., 2010. Contemporary Reviews in Cardiovascular Medicine Thyroid Replacement Therapy and Heart Failure. *Circulation*, (122), pp.385–393.
- Giepman, B.N.G. et al., 2001. Interaction of c-Src with Gap Junction Protein Connexin-43. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(11), pp.8544–8549.
- Giorgione, J.R. et al., 2006. Increased Membrane Affinity of the C1 Domain of Protein Kinase C δ Compensates for the Lack of Involvement of Its C2 Domain in Membrane Recruitment. *J Biol Chem*, 281(3), pp.1660–1669.
- Goldberg, G. et al., 1996. Evidence That Disruption of Connexon Particle Arrangements in Gap Junction Plaques Is Associated with Inhibition of Gap Junctional Communication by a Glycyrrhetic Acid Derivative. *Experimental cell research*, 222(1), pp.48–53.
- Gonzalez, D., Gomez-Hernandez, J. & Barrio, L., 2007. Molecular basis of voltage dependence of connexin channels: An integrative appraisal. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, (94), pp.66–106.
- Goodenough, D., Goliger, J. & Paul, D., 1996. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem*, (65), pp.475–502.
- Goodenough, D.A. & Paul, D.L., 2009. Gap junctions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(1), pp.1–19.
- Gurel, E. et al., 2013. Hexokinase cellular trafficking in ischemia-reperfusion and ischemic preconditioning is altered in type I diabetic heart. *Mol Biol Rep.*, 40, pp.4153–4160.
- Gustein, D. et al., 2001. Conduction Slowing and Sudden Arrhythmic Death in Mice With Cardiac-Restricted Inactivation of Connexin43. *Circ Res*, 88(3), pp.333–339.
- Guthrie, C.R., Skålhegg, B.S. & Mcknight, G.S., 1997. Two novel brain-specific splice variants of the murine Cbeta gene of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 272(47), pp.29560–29565.
- Hausenloy, D.J. & Yellon, D.M., 2003. New directions for protecting the heart against ischaemia – reperfusion injury : targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK) -pathway. *Cardiovascular Research*, 61, pp.448–460.
- Heikkinen, S. et al., 2000. Mouse hexokinase II gene : structure , cDNA , promoter analysis , and expression pattern. *Mammalian Genome*, 11, pp.91–96.
- Hennan, J.K. et al., 2006. Rotigaptide (ZP123) Prevents Spontaneous Ventricular Arrhythmias and Reduces Infarct Size During Myocardial Ischemia / Reperfusion Injury in Open-Chest Dogs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(1), pp.236–243.
- Hervé, J.C., 2012. The communicating junctions, composition, structure and characteristics. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(8), pp.1803–1806.
- Hirst-Jensen, B.J. et al., 2007. Characterization of the pH-dependent Interaction between the

- Gap Junction Protein Connexin43 Carboxyl Terminus and Cytoplasmic Loop Domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(8), pp.5801–5813.
- Hlavackova, M. et al., 2007. Dietary polyunsaturated fatty acids alter myocardial protein kinase C expression and affect cardioprotection induced by chronic hypoxia. *Exp Biol Med (Maywood)*, 232(6), pp.823–832.
- Hlavackova, M. et al., 2010. Up-regulation and redistribution of protein kinase C- δ in chronically hypoxic heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 345(1–2), pp.271–282.
- Hu, K. et al., 2000. Evidence for functional role of ϵ PKC isozyme in the regulation of cardiac Ca²⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279(1), pp.2658–2664.
- Huang, X., Sandusky, G. & Zipes, D., 1999. Heterogeneous loss of connexin43 protein in ischemic dog hearts. *J Cardiovasc Electrophysiol*, (10), pp.79–91.
- Huang, Y., Tsai, M. & Lin, K., 2008. Thyroid Hormone Dependent Regulation of Target Genes and Their Physiological Significance. *Chang Gung Med J*, 104(2), pp.325–334.
- Hund, T. et al., 2007. Protein kinase C ϵ mediates salutary effects on electrical coupling induced by ischemic preconditioning. *Heart Rhythm*, 4(9), pp.1183–1193.
- Iakoucheva, L.M. et al., 2004. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acid Res*, 32(3), pp.1037–1049.
- Imanaga, I. et al., 2004. Phosphorylation of connexin in functional regulation of the cardiac gap junction. *Experimental and clinical cardiology*, 9(3), pp.161–4.
- Iordanidou, A., Hadzopoulou-Cladaras, M. & Lazou, A., 2010. Non-genomic effects of thyroid hormone in adult cardiac myocytes: relevance to gene expression and cell growth. *Mol Cell Biochem*, (340), pp.291–300.
- Jain, S.K., Schuessler, R.B. & Saffitz, J.E., 2003. Integrative Physiology Mechanisms of Delayed Electrical Uncoupling Induced by Ischemic Preconditioning. *Circ Res.*, 92, pp.1138–1145.
- Jansky, J. et al., 2006. Thermal, Cardiac and Adrenergic Responses to Repeated Local Cooling. *Physiol. Res.*, 55, pp.543–549.
- Jansky, L. et al., 1996. Immune system of cold-exposed and cold-adapted humans. *Eur J Appl Physiol*, 72, pp.445–450.
- Jansky, L. et al., 2008. Modulation of adrenergic receptors and adrenergic functions in cold adapted humans. *Eur J Appl Physiol*, 104(2), pp.131–5.
- Jansky, L. & Jansky, P., 2002. Sites and cellular mechanisms of human. adrenergic thermogenesis. *J Therm Biol*, 27(4), pp.269–277.
- Jeyaraman, M.M. et al., 2012. Connexin43 phosphorylation and cytoprotection in the heart. *Biochimica et biophysica acta*, 1818(8), pp.2009–13.
- Jezkova, J. et al., 2002. Chronic hypoxia alters fatty acid composition of phospholipids in

- right and left ventricular myocardium. *Mol Cell Biochem.*, 232(1–2), pp.49–56.
- Johansen, D. et al., 2011. Cellular Physiology and Biochemistry Ischemia Induces Closure of Gap Junctional Channels and Opening of Hemichannels in Heart-derived Cells and Tissue. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 28, pp.103–114.
- Johansson, B., 1996. The hibernator heart- nature's model of resistance to ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res.*, 31(5), pp.826–832.
- John, S., Weiss, J.N. & Ribalet, B., 2011. Subcellular localization of hexokinases I and II directs the metabolic fate of glucose. *PLoS one*, 6(3), p.e17674.
- Johnson, K.E. et al., 2013. Phosphorylation on Ser-279 and Ser-282 of connexin43 regulates endocytosis and gap junction assembly in pancreatic cancer cells. *Mol Biol Cell*, 24(6), pp.715–733.
- Kanemitsu, M.Y. et al., 1997. Tyrosine Phosphorylation of Connexin 43 by v-Src Is Mediated by SH2 and SH3 Domain Interactions *. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(36), pp.22824–22831.
- Kanemitsu, M.Y. & Lau, A.F., 1993. Epidermal Growth Factor Stimulates the Disruption of Gap Junctional Communication and Connexin43 Phosphorylation Independent of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-sensitive Protein Kinase C : The Possible Involvement of Mitogen-activated Protein Kinase. *Molecular Biology of the Cell*, 4(August), pp.837–848.
- Kanno, S. & Saffitz, J.E., 2001. The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovascular Pathology*, 10, pp.169–177.
- Kaprielian, R.R. et al., 1998. Downregulation of immunodetectable connexin43 and decreased gap junction size in the pathogenesis of chronic hibernation in the human left ventricle. *Circulation*, 97(7), pp.651–660.
- Kar, R. et al., 2012. Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. *Archives of biochemistry and biophysics*, 524(1), pp.2–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430362>.
- Van Kempen, M. et al., 1995. Differential connexin expression accommodates cardiac function in different species. *Microsc. Res. Tech.*, 31, pp.420–436.
- Kim, B., Carvalho-Bianco, S. & Larsen, P., 2004. Thyroid Hormone and Adrenergic Signaling in the Heart. *Arq Bras Endocrinol Metabol.*, 48(1), pp.171–175.
- Kim, D.Y. et al., 1999. Gating Connexin 43 Channels Reconstituted in Lipid Vesicles by Mitogen-activated Protein Kinase Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(9), pp.5581–5587.
- Kim, Y. et al., 2003. Mechanism of Enhanced Cardiac Function in Mice with Hypertrophy Induced by Overexpressed Akt. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(48), pp.47622–47628.
- Knezl, V. et al., 2008. Distinct lethal arrhythmias susceptibility is associated with sex-related

- difference in myocardial connexin-43 expression. *Neuro Endocrinol Lett.*, 29(5), pp.798–801.
- Kohutova, J. et al., 2019. Anti-arrhythmic cardiac phenotype elicited by chronic intermittent hypoxia is associated with alterations in connexin-43 expression, phosphorylation and distribution. *Frontiers in Endocrinology-Diabetes*.
- Kolar, D. et al., 2017. Adaptation to chronic continuous hypoxia potentiates Akt/HK2 anti-apoptotic pathway during brief myocardial ischemia/reperfusion insult. *Molecular and Cellular Biology*, 432(1–2), pp.99–108.
- Kolar, F. et al., 2007. Role of oxidative stress in PKC- delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292, pp.224–230.
- Kondo, R. et al., 2000. Metabolic Inhibition Activates a Non-selective Current Through Connexin Hemichannels in Isolated Ventricular Myocytes. *JMCC*, 32(10), pp.1859–1872.
- Koschinski, A. & Zaccolo, M., 2017. Activation of PKA in cell requires higher concentration of cAMP than in vitro : implications for compartmentalization of cAMP signalling. *Scientific Reports*, (May), pp.1–12.
- Kravtsova-Ivantsiv, Y. & Ciechanover, A., 2012. Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. *Journal of Cell Science*, 125(Pt3), pp.539–548.
- Kreuzberg, M. et al., 2005. Functional Properties of Mouse Connexin30.2 Expressed in the Conduction System of the Heart. *Circ Res*, 96(11), pp.1169–1177.
- Kuhn, M., 2016. Molecular physiology of membrane guanylyl cyclase receptors. *Physiol Rev*, (96), pp.751–804.
- Kwak, B. & Jongsma, H., 1996. Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 157(1–2), pp.93–99.
- Kyle, J.W. et al., 2008. junction formation. , 121(Pt 16), pp.2744–2750.
- Laing, J.G. et al., 1997. Degradation of Connexin43 Gap Junctions Involves both the Proteasome and the Lysosome. *Exp Cell Res*, 492(236), pp.482–492.
- Laing, J.G. et al., 1998. Proteolysis of connexin43-containing gap junctions in normal and heat-stressed cardiac myocytes. *Cardiovascular research*, 38, pp.711–718.
- Laing, J.G. & Beyer, E.C., 1995. The Gap Junction Protein Connexin43 Is Degraded via the Ubiquitin Proteasome Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(44), pp.26399–26403.
- Laird, D., Puranam, K. & Revel, J., 1991. Turnover and phosphorylation dynamics of connexin 43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem Journal*, 273(1), pp.67–72.
- Laird, D.W., 2005. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction

- internalization and degradation. *Biochimica et biophysica acta*, 1711(2), pp.172–82.
- Laird, D.W., 2006. Life cycle of connexins in health and disease. *The Biochemical journal*, 394(Pt 3), pp.527–43.
- Lampe, P. & Lau, A., 2004. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(7), pp.1171–1186.
- Lampe, P.D. et al., 2006. Analysis of Phosphorylation of Connexin43 at S325/328/330 in Normoxic and Ischemic Heart. *J Cell Sci*, 119(Pt 16), pp.3435–3442.
- Lau, A.F., 2009. c-Src: Bridging the Gap Between Phosphorylation- and Acidification-Induced Gap Junction Channel Closure. *Sci STKE*, 2005(291), pp.1–7.
- Lau, A.F. et al., 1992. Epidermal growth factor disrupts gap-junctional communication and induces phosphorylation of connexin43 on serine. *Molecular Biology Of The Cell*, 3(8), pp.865–874.
- Lauf, U. et al., 2002. Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), pp.10446–51.
- Lee, A. & States, D., 2006. Colony-stimulating factor-1 requires PI3-kinase-mediated metabolism for proliferation and survival in myeloid cells. *Cell Death Diffe*, 13, pp.1900–1914.
- Lerner, D.L. et al., 2000. Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in Cx43-deficient mice. *Circulation*, 101(5), pp.547–552.
- Leslie, C., 2004. Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2. *PLEFA*, 70(4), pp.373–376.
- Li, Z. et al., 2004. [Separating independent components in heart period signal]. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi = Journal of biomedical engineering = Shengwu yixue gongchengxue zazhi*, 21(3), pp.401–5.
- Liang, L. et al., 2008. Effects of 18-glycyrrhetic acid on serine 368 phosphorylation of connexin43 in rat neonatal cardiomyocytes. *Cell Biol Int*, 32(11), pp.1371–1379.
- Lin, H. et al., 2008. Thyroid hormones suppress ϵ -PKC signalling, down-regulate connexin-43 and increase lethal arrhythmia susceptibility in non-diabetic and diabetic rat hearts. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 59(2), pp.271–285.
- Lin, R. et al., 2001a. Tyr265 disrupts gap junctional communication. *The Journal of Cell Biology*, 154, pp.815–827.
- Lin, R. et al., 2001b. v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. *J Cell Biol*, (154), pp.815–827.
- Liu, B., Lopaschuk, G. & Wang, L., 1994. Improved rat heart function after low Ca²⁺ perfused preservation at 5 degrees C for 18 hours. *Cryobiology*, 31(3), pp.254–262.

- Liu, B., Wohlfart, B. & Johansson, B., 1990. Effects of low temperature on contraction in papillary muscles from rabbit, rat, and hedgehog. *Cryobiology*, 27(5), pp.539–546.
- Loewenstein, W. & Kanno, Y., 1966. Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature*, (209), pp.1248–1249.
- Lohse, M., Engelhardt, S. & Eschenhagen, T., 2003. What Is the Role of β -Adrenergic Signaling in Heart Failure? *Circulation Research*, 93(10), pp.896–906.
- Lubkemeier, I. et al., 2013. Deletion of the last five C-terminal amino acid residues of connexin43 leads to lethal ventricular arrhythmias in mice without affecting coupling via gap junction channels. *Basic Res Cardiol*, 108(3), p.348.
- Luciakova, K. & Nelson, B., 1992. Transcript levels for nuclear-encoded mammalian mitochondrial respiratory-chain components are regulated by thyroid hormone in an uncoordinated fashion. *Eur J Biochem*, 207(1), pp.247–251.
- Madamanchi, A., 2007. β -Adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *MJM*, 10(2), pp.99–104.
- Magne, S. et al., 2001. β_2 -Adrenergic Receptor Agonists Increase Intracellular Free Ca^{2+} Concentration Cycling in Ventricular Cardiomyocytes through p38 and p42 / 44 MAPK-mediated Cytosolic Phospholipase A 2 Activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(43), pp.39539–39548.
- Majewski, N. et al., 2004. Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Molecular Cell*, 16(5), pp.819–30.
- Márquez-Rosado, L. et al., 2012. Connexin43 phosphorylation in brain, cardiac, endothelial and epithelial tissues. *Biochimica et biophysica acta*, 1818(8), pp.1985–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21819962>.
- Martinez, A. et al., 2002. Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ Res*, 90(10), pp.1100–7.
- McCommis, K.S. et al., 2013. Cardiac-specific hexokinase 2 overexpression attenuates hypertrophy by increasing pentose phosphate pathway flux. *Journal of the American Heart Association*, 2(6), p.e000355.
- Meerson, F., Ustinova, E. & Manukhina, E., 1989. Prevention of cardiac arrhythmias by adaptation to hypoxia: regulatory mechanisms and cardiotropic effect. *Biomed Biochim Acta.*, 48(2–3), pp.S83-8.
- Meerson, F., Ustinova, E. & Orlova, E., 1987. Prevention and Elimination of Heart Arrhythmias by Adaptation to Intermittent High Altitude Hypoxia. *Clin Cardiol*, 10(12), pp.783–789.
- Meves, H., 2008. Arachidonic acid and ion channels: an update. *British Journal of Pharmacology*, (155), pp.4–16.

- Micova, P. et al., 2017. Antioxidant tempol suppresses heart cytosolic phospholipase A2 α stimulated by chronic intermittent hypoxia. *Can J Physiol Pharmacol.*, 95(8), pp.920–927.
- Milks, L.C. et al., 1988. Topology of the 32-kd liver gap junction protein determined by site-directed antibody localizations. *EMBO J*, 7(10), pp.2967–2975.
- Montfort, W.R., Wales, J.A. & Weichsel, A., 2017. Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor. *Antioxid Redox Signal*, 26(3), pp.107–121.
- Moreno, A., 2004. Biophysical properties of homomeric and heteromultimeric channels formed by cardiac connexins. *Cardiovascular research*, 62(2), pp.276–286.
- Moreno, A.P., 2004. Biophysical properties of homomeric and heteromultimeric channels formed by cardiac connexins. *Cardiovascular research*, 62(2), pp.276–286.
- Muhlfeld, C. et al., 2010. Phosphorylation of Extrajunctional Cx43 in Ischemic-Preconditioned Rat Hearts. *Journal of Surgical research*, 162, pp.1–8.
- Musil, L.S. & Goodenough, D.A., 1993. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell*, 74(6), pp.1065–77.
- Naus, C. et al., 1993. Ultrastructural Analysis of Gap Junctions in C6 Glioma Cell Transfected with Connexin43 cDNA. *Experimental cell research*, 206, pp.72–84.
- Neckar, J., Papousek, F., et al., 2002. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res Cardiol*, 97, pp.161–167.
- Neckar, J., Szarszoi, O., et al., 2002. Effects of mitochondrial K ATP modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovascular Research*, 55(3), pp.567–575.
- Neckar, J. et al., 2005. Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-delta in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288(4), pp.H1566-72.
- Neckar, J. et al., 2017. Selective replacement of mitochondrial DNA increases the cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia in spontaneously hypertensive rats. *Clinical Science*, 131(9), pp.865–881.
- Neckar, J., Ostadal, F. & Kolar, F., 2004. Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol Res*, 53(6), pp.621–628.
- Newton, A.C., 2003. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J*, 371, pp.361–371.
- Nimlamool, W., Andrews, R.M.K. & Falk, M.M., 2015. Connexin43 phosphorylation by PKC and MAPK signals VEGF-mediated gap junction internalization. *Molecular Biology of the Cell*, 26(15), pp.2755–2768.
- Okruhlicova, L. et al., 2002. Gap junction remodelling is involved in the susceptibility of diabetic rats to hypokalemia-induced ventricular fibrillation. *Acta histochemica*, 104(4),

pp.387–91.

- Ostadal, B. & Kolar, F., 2007. Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respir Physiol Neurobiol*, 158(2–3), pp.224–236.
- Oyamada, M., Oyamada, Y. & Takamatsu, T., 2005. Regulation of connexin expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1719(1–2), pp.6–23.
- Pääkkönen, T. & Leppäluoto, J., 2002. Cold exposure and hormonal secretion. *Int J Circumpolar Health*, 61(3), pp.265–276.
- Pantos, C., Mourouzis, I. & Cokkinos, D., 2012. Thyroid hormone and cardiac repair/regeneration: from Prometheus myth to reality? *Can J Physiol Pharmacol*, 90(8), pp.977–987.
- Patel, L.S. et al., 2006. Regulation of gap junction coupling through the neuronal connexin Cx35 by nitric oxide and cGMP. *cell Commun Adhes*, 13(1–2), pp.41–54.
- Pathak, A. et al., 2005. Enhancement of Cardiac Function and Suppression of Heart Failure Progression By Inhibition of Protein Phosphatase 1. *Circ Res.*, 96, pp.756–766.
- Paulson, A.F. et al., 2000. Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *Journal of Cell Science*, (113), pp.3037–3049.
- Pears, C.J. et al., 2008. Differential roles of the PKC novel isoforms, PKCdelta and PKCepsilon, in mouse and human platelets. *PloS one*, 3(11), p.e3793.
- Pearson, G. et al., 2001. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways : Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews*, 22(2), pp.153–183.
- Pedersen, P.L., Caro, J. & Semenza, G., 2007. Warburg , me and Hexokinase 2 : Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers ’ most common phenotypes , the “ Warburg Effect ” , i . e . , elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J Bioenerg Biomembr*, 39, pp.211–222.
- Peracchia, C., 2004. Chemical gating of gap junction channels: roles of calcium, pH and calmodulin. *Biochim Biophys Acta*, 1662(1–2), pp.61–80.
- Peters, N. et al., 1997. Disturbed Connexin43 Gap Junction Distribution Correlates With the Location of Reentrant Circuits in the Epicardial Border Zone of Healing Canine Infarcts That Cause Ventricular Tachycardia. *Circulation*, 95, pp.988–996.
- Pleschka, K. et al., 1996. Diurnal and seasonal changes in sympathetic signal transduction in cardiac ventricles of European hamsters. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 270, pp.304–309.
- Pogoda, K. et al., 2016. Regulation of gap junction channels and hemichannels by phosphorylation and redox changes : a revision. *BMC Cell Biology*, 17(Suppl 1), p.11.
- Purnick, P.E.M. et al., 2000. Reversal of the Gating Polarity of Gap Junctions by Negative Charge Substitutions in the N-Terminus of Connexin 32. *Biophys J*, 79(5), pp.2403–2415.

- Qi, M. et al., 1996. Impaired hippocampal plasticity in mice lacking the Cf31 catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 93, pp.1571–1576.
- Qin, H. et al., 2003. Lysosomal and Proteasomal Degradation Play Distinct Roles in the Life Cycle of Cx43 in Gap Junctional Intercellular Communication- deficient and -competent Breast Tumor Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), pp.30005–30014.
- Qu, J. et al., 2009. Gap Junction Remodeling and Spironolactone-Dependent Reverse Remodeling in the Hypertrophied Heart. *Circ Res*, 104(3), pp.365–371.
- Rackauskas, M. et al., 2007. Gating properties of heterotypic gap junction channels formed of connexins 40, 43, and 45. *Biophysical Journal*, 92(6), pp.1952–1965.
- Radosinska, J. et al., 2013. 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. *Journal of hypertension*, 31(9), pp.1876–85.
- Rajagopalan, V. et al., 2016. Safe Oral Triiodo-L-Thyronine Therapy Protects from Post-Infarct Cardiac Dysfunction and Arrhythmias without Cardiovascular Adverse Effects. *PLoS ONE*, 11(3), p.e0151413.
- Rasola, A. et al., 2010. Signal Transduction to the Permeability Transition Pore. *FEBS Letters*, 584(10), pp.1989–1996.
- Rastaldo, R. et al., 2007. Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci*, 81(10), pp.779–793.
- Ravel, J. & Karnovsky, M., 1967. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol*, (22), pp.1516–1528.
- Ravingerova, T. et al., 2007. Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart. *Mol Cell Biochem*, 297, pp.111–120.
- Reinton, N. et al., 2000. Reinton, N., Ørstavik, S., Haugen, T. B., Jahnsen, T., Taskén, K., & Skålhegg, B. S. (2000). A Novel Isoform of Human Cyclic 3',5'-Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase, Ca_s , Localizes to Sperm Midpiece1. *Biology of Reproduction*, 63(2), pp.607–611.
- Remo, B.F. et al., 2011. Phosphatase Resistant Gap Junctions Inhibit Pathologic Remodeling and Prevent Arrhythmias. *Circ Res*, 108(12), pp.1459–1466.
- Retamal, M.A. et al., 2007. Opening of connexin 43 hemichannels is increased by lowering intracellular redox potential. *PNAS*, 104(20), pp.8322–8327.
- Rodriguez-Sinovas, A. et al., 2010. Effects of substitution of Cx43 by Cx32 on myocardial energy metabolism, tolerance to ischaemia and preconditioning protection. *J Physiol*, 7, pp.1139–1151.
- Rojas Gomez, D. et al., 2008. Alpha-1-adrenoceptor subtype selective regulation of connexin 43 expression in rat cardiomyocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, (377),

pp.77–85.

- Rose, I. & Warms, J., 1967. Mitochondrial hexokinase. Release, rebinding, and location. *J Biol Chem*, 242, pp.1635–1645.
- Rucker-Martin, C. et al., 2006. Chronic hemodynamic overload of the atria is an important factor for gap junction remodeling in human and rat hearts. *Cardiovascular Research*, 72(1), pp.69–79.
- Rybin, V. & Steinberg, S., 1996. Thyroid hormone represses protein kinase C isoform expression and activity in rat cardiac myocytes. *Circ Res*, (79), pp.388–389.
- Saez, J. et al., 1990. Phosphorylation of connexin 32, a hepatocyte gap-junction protein, by CAMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur J Biochem*, (192), pp.263–273.
- Saez, J. et al., 2003. Plasma Membrane Channels Formed by Connexins: Their Regulation and Functions. *Physiol Rev*, pp.1359–1400.
- Saez, J.C. et al., 1986. cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27-kDa principal gap junction polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 83, pp.2473–2477.
- Saffitz, J.E. & Yamada, K.A., 1998. Do alterations in intercellular coupling play a role in cardiac contractile dysfunction? *Circulation*, 97(7), pp.630–632.
- Saitongdee, P. et al., 2000. Increased connexin43 gap junction protein in hamster cardiomyocytes during cold acclimatization and hibernation. *Cardiovascular Research*, 47, pp.108–115.
- Salameh, A. et al., 2009. THEMED ISSUE: GPCR The signal transduction cascade regulating the expression of the gap junction protein connexin43 by β -adrenoceptors Abbreviations: *British Journal of Pharmacology*, (158), pp.198–208.
- Salat-Canela, C. et al., 2015. Post-transcriptional regulation of connexins. *Biochemical Society transactions*, 43(3), pp.465–70.
- Schindelin, J. et al., 2012. Fiji: An open source platform for biological image analysis. *Nature Methods*, 9(7), pp.676–682.
- Schittek, B. & Sinnberg, T., 2014. Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis. *Mol Cancer*, 11(13), p.231.
- Seidel, T., Salameh, A. & Dhein, S., 2010. A simulation study of cellular hypertrophy and connexin lateralization in cardiac tissue. *Biophysical Journal*, 99(9), pp.2821–2830.
- Severs, N.J., 2001. Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis: cause or coincidence? *Journal of cellular and molecular medicine*, 5(4), pp.355–66.
- Severs, N.J. et al., 2008. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovascular Research*, 80(1), pp.9–19.
- Sim, A. & Scott, J., 1999. Targeting of PKA, PKC and protein phosphatases to cellular

- microdomains. *Cell Calcium*, 26(5), pp.209–217.
- Simeckova, M. et al., 2000. Role of beta adrenoceptors in metabolic and cardiovascular responses of cold exposed humans. *J Therm Biol.*, 25, pp.437–442.
- Singh, R.M. et al., 2017. Protein kinase C and cardiac dysfunction : a review. *Heart Fail Rev*, 22, pp.843–859.
- Sirnes, S. et al., 2009. Interplay between PKC and the MAP kinase pathway in Connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382(1), pp.41–45.
- Skalhegg, S. et al., 2002. Mutation of the Calpha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Mol Endocrinol*, 16(3), pp.630–639.
- Smyth, J.W. et al., 2014. A 14-3-3 Mode-1 Binding Motif Initiates Gap Junction Internalization during Acute Cardiac Ischemia. *Traffic.*, 15(6), pp.684–699.
- Söhl, G. & Willecke, K., 2003. Cell Communication & Adhesion An Update on Connexin Genes and their Nomenclature in Mouse and Man An Update on Connexin Genes and their Nomenclature in Mouse and Man. *Cell communication & adhesion*, (10), pp.173–180.
- Solan, J.L. et al., 2003. Connexin43 phosphorylation at S368 is acute during S and G 2 / M and in response to protein kinase C activation. *Journal of Cell Science*, (116), pp.2203–2211.
- Solan, J.L. et al., 2007. Phosphorylation at S365 is a gatekeeper event that changes the structure of Cx43 and prevents down- regulation by PKC. *J Cell Biol*, 179(6), pp.1301–1309.
- Solan, J.L. & Lampe, P.D., 2008. Connexin43 in LA-25 cells with active v-src is phosphorylated on Y247, Y265, S262, S279/282 and S368 via multiple signaling pathways. *Cell Commun Adhes*, 15(1), pp.75–84.
- Solan, J.L. & Lampe, P.D., 2009. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J*, 419(2), pp.261–272.
- Solan, J.L. & Lampe, P.D., 2007. Key Connexin43 phosphorylation events regulate the gap junction life cycle. *J membr Biol*, 217(1–3), pp.35–41.
- Solan, J.L. & Lampe, P.D., 2014. Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS Letters*, 588(8), pp.1423–1429.
- Song, M. et al., 2015. Combined cardiomyocyte PKC δ and PKC ϵ gene deletion uncovers their central role in restraining developmental and reactive heart growth. *Sci Signal*, 8(373), p.ra39.
- Sorgen, P.L. et al., 2004. Structural Changes in the Carboxyl Terminus of the Gap Junction Protein Connexin43 Indicates Signaling between Binding Domains. *J Biol Chem*, 279(52), pp.54695–54701.
- Southworth, R. et al., 2006. A reevaluation of the roles of hexokinase I and II in the heart.

Am J Physiol Heart Circ Physiol, 292, pp.378–386.

- Sovari, A. et al., 2011. Inhibition of c-Src Tyrosine Kinase Prevents Angiotensin II-Mediated Connexin43 Remodeling and Sudden Cardiac Death. *J Am Coll Cardiol*, 58(22), pp.2332–2339.
- Spach, M. & Heidlage, J., 1995. The Stochastic Nature of Cardiac Propagation at a Microscopic Level Electrical Description of Myocardial Architecture and Its Application to Conduction. *Circulation Research*, (76), pp.366–380.
- Spach, M., Kootsey, J. & Sloan, J., 1982. Active modulation of electrical coupling between cardiac cells of the dog. A mechanism for transient and steady variations in conduction velocity. *Circ Res*, (51), pp.347–362.
- Srisakuldee, W. et al., 2006. Administration of FGF-2 to the heart stimulates connexin-43 phosphorylation at protein kinase C target sites. *Cell communication & adhesion*, 13(1–2), pp.13–9.
- Srisakuldee, W. et al., 2009. Phosphorylation of connexin-43 at serine 262 promotes a cardiac injury-resistant state. *Cardiovascular Research*, 83(4), pp.672–681.
- Sun, H. et al., 2006. Insulin-like growth factor-1 and PTEN deletion enhance cardiac L-type Ca²⁺ currents via increased PI3K α /PKB signaling. *Circ Res*, 98(11), pp.1390–1397.
- Sun, L. et al., 2008. Glucose Phosphorylation and Mitochondrial Binding Are Required for the Protective Effects of Hexokinases I and II $\square \dagger$. *Molecular and Cellular Biology*, 28(3), pp.1007–1017.
- Swenson, K. et al., 1989. Formation of gap junctions by expression of connexins in *Xenopus* oocyte pairs. *Cell*, 57(1), pp.145–155.
- Takeda, A. et al., 1987. Phosphorylation of liver gap junction protein by protein kinase C. *FEBS letters*, 210(2), pp.169–172.
- Takimoto, E. et al., 2005. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med*, 11(2), pp.214–222.
- Talbot, J. et al., 2015. *Gap junction in bone remodeling and in primary bone tumors : osteosarcoma and Ewing sarcoma* Second Edi., Elsevier Inc.
- Tenbroek, E.M. et al., 2001. Ser364 of connexin43 and the upregulation of gap junction assembly by cAMP. *The Journal of Cell Biology*, 155(7), pp.1307–1318.
- Teunissen, B., Jongasma, H. & Bierhuizen, M., 2004. Regulation of myocardial connexins during hypertrophic remodeling. *Eur Heart J*, (25), pp.1979–1989.
- Thibodeau, I.L. et al., 2010. Paradigm of Genetic Mosaicism and Lone Atrial Fibrillation Physiological Characterization of a Connexin 43 – Deletion Mutant. *Circulation*, 122(3), pp.236–245.
- Thomas, T. et al., 2005. Mechanisms of Cx43 and Cx26 transport to the plasma membrane and gap junction regeneration. *J Cell Sci*, 118(Pt 19), pp.4451–4462.

- Toyofuku, T. et al., 2001. c-Src Regulates the Interaction between Connexin-43 and ZO-1 in Cardiac Myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(3), pp.1780–1788.
- Traub, O. et al., 1989. Comparative Characterization of the 21-kD and 26-kD Gap Junction Proteins in Murine Liver and Cultured Hepatocytes Quantification of Gap Junctional Proteins. *The Journal of Cell Biology*, 108, pp.1039–1051.
- Tribulova, N. et al., 1999. Aged heart as a model for prolonged atrial fibrillo-flutter. *Exp Clin Cardiol*, (4), pp.64–72.
- Tribulova, N. et al., 2015. Can we protect from malignant arrhythmias by modulation of cardiac cell-to-cell coupling? *Journal of Electrocardiology*, 48(3), pp.434–440.
- Tribulova, N. et al., 2003. Factors involved in the susceptibility of spontaneously hypertensive rats to low K⁺-induced arrhythmias. *General physiology and biophysics*, 22(3), pp.369–82.
- Tribulova, N. et al., 2002. Hypertension-related intermyocyte junction remodelling is associated with a higher incidence of low-K⁽⁺⁾-induced lethal arrhythmias in isolated rat heart. *Experimental physiology*, 87(2), pp.195–205.
- Tribulova, N. et al., 2004. L-thyroxine increases susceptibility of adult rats to low K⁺-induced ventricular fibrillation, and sinus rhythm restoration in old rats. *Experimental physiology*, 89(5), pp.629–36.
- Tribulova, N. et al., 2006. Myocardial gap junction remodelling in hypertriglyceridemic rat heart is associated with increased vulnerability to ventricular fibrillation. *Cardiology*, 15(1), pp.32–33.
- Tribulova, N. et al., 2005. Sex differences in connexin-43 expression in left ventricles of aging rats. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 54(6), pp.705–8.
- Tribulova, N. et al., 2010. Thyroid hormones and cardiac arrhythmias. *Vascul Pharmacol*, (52), pp.102–112.
- Tsai, E.J. & Kass, D.A., 2009. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacol Ther*, 122(3), pp.216–238.
- Tvrzicka, E. et al., 2002. Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection: Quantitative aspects. *Analytica Chimica Acta*, 465(1–2), pp.337–350.
- Tyanova, S. et al., 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods*, 13(9), pp.731–740.
- Urschel, S. et al., 2006. Protein Kinase A-mediated Phosphorylation of Connexin36 in Mouse Retina Results in Decreased Gap Junctional Communication between AII Amacrine Cells. *J Biol Chem*, 281(44), pp.33163–33171.
- Valiunas, V. & Weingart, R., 2000. Electrical Properties of Gap Junction Hemichannels Identified In Transfected Hela Cells. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*,

(440), pp.366–379.

- Valle-Perez, B. et al., 2011. Coordinated Action of CK1 Isoforms in Canonical Wnt Signaling □. *Mol Cell Biol*, 31(14), pp.2877–2888.
- Verheule, S. et al., 1997. Characterization of gap junction channels in adult rabbit atrial and ventricular myocardium. *Circ Res*, 80(5), pp.673–81.
- Vicenczova, C. et al., 2017. Myocardial connexin-43 is upregulated in response to acute cardiac injury in rats. *Can J Physiol Pharmacol.*, 95(8), pp.911–919.
- Vuyst, E. De et al., 2006. Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening. *EMBO J*, 25(1), pp.34–44.
- Vybiral, S. & Jansky, L., 1997. Hibernation triggers and cryogens: do they play a role in hibernation? *Comp Biochem Physiol A Physiol.*, 118, pp.1125–1133.
- Vyssokikh, M. & Brdiczka, D., 2003. The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Pol.*, 50, pp.389–404.
- Wang, N. et al., 2012. Connexin mimetic peptides inhibit Cx43 hemichannel opening triggered by voltage and intracellular Ca²⁺ elevation. *Basic Res Cardiol*, 107(6), p.304.
- Wang, X. et al., 2012. Improvement of cardiac function and reversal of gap junction remodeling by Neuregulin-1 β in volume-overloaded rats with heart failure. *Journal of Geriatric Cardiology*, 9, pp.172–179.
- Warn-Cramer, B. & Lau, A., 2004. Regulation of gap junctions by tyrosine protein kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1662(1–2), pp.81–95.
- Warn-Cramer, B.J. et al., 1996. Characterization of the Mitogen-activated Protein Kinase Phosphorylation Sites on the Connexin-43 Gap Junction Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(7), pp.3779–3786.
- Warn-Cramer, B.J. et al., 1998. Regulation of Connexin-43 Gap Junctional Intercellular Communication by Mitogen-activated Protein Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(15), pp.9188–9196.
- Waskova-Arnostova, P. et al., 2015. Cardioprotective adaptation of rats to intermittent hypobaric hypoxia is accompanied by the increased association of hexokinase with mitochondria. *J Appl Physiol*, 119, pp.1487–1493.
- Wegener, J.W. et al., 2002. cGMP-Dependent Protein Kinase I Mediates the Negative Inotropic Effect of cGMP in the Murine Myocardium. *Circ Res*, (90), pp.18–20.
- Wolf, A. et al., 2011. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *J Exp Med.*, 208, pp.313–326.
- Wu, Y. et al., 2012. Sufentanil limits the myocardial infarct size by preservation of the phosphorylated connexin 43. *International Immunopharmacology*, 13(3), pp.341–346.

- Xing, J. et al., 2014. Effect of cold adaptation on activities of relevant enzymes and antioxidant system in rats. *Int J Clin Exp Med*, 7(11), pp.4232–4237.
- Yasui, K. et al., 2000. Cell-to-cell interaction prevents cell death in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*, 48(1), pp.68–76.
- Zaccolo, M., 2011. Spatial control of cAMP Signalling in Health and Disease Manuela. *Curr Opin Pharmacol.*, 11(6), pp.649–655.
- Zaninovich, A.A. et al., 2003. Mitochondrial respiration in muscle and liver from cold-acclimated hypothyroid rats. *J Appl Physiol*, (95), pp.1584–1590.
- Zhang, J. et al., 1996. Membrane Integration of In Vitro-translated Gap Junctional Proteins : Co- and Post-translational Mechanisms. *Mol Biol Cell*, 7(March), pp.471–482.
- Zhang, M. et al., 2010. Myocardial Remodeling is Controlled by Myocyte-targeted Gene Regulation of Phosphodiesterase Type-5. *J Am Coll Cardiol*, 56(24), pp.2021–2030.
- Zhao, Q. et al., 2013. Lipoxin A 4 Preconditioning and Postconditioning Protect Myocardial Ischemia / Reperfusion Injury in Rats. *Mediators of Inflammation*, 2013, p.231351.
- Zhong, N. et al., 2002. Myocardial capillary angiogenesis and coronary flow in ischemia tolerance rat by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. *Acta Pharmacologica Sinica*, 23(4), pp.305–310.
- Zhou, Y. et al., 2007. Identification of the Calmodulin Binding Domain of Connexin 43. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(48), pp.35005–35017.
- Zicha, J. et al., 2006. Hereditary hypertriglyceridemic rat: a suitable model of cardiovascular disease and metabolic syndrome? *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 55 Suppl 1, pp.S49-63.
- Zuurbier, C., Eerbeek, O. & Meijer, A., 2005. Ischemic preconditioning, insulin, and morphine all cause hexokinase redistribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289, pp.H496–H499.

Prílohy

Príloha 1

Zloženie roztokov pre prípravu hrubých membrán zo srdca

Zloženie TME (TRIS, MgCl₂, EDTA), 100ml, pH 7,4:

242 mg TRIS (TRIZMA® base, SIGMA)
61 mg MgCl₂ 3mM
29,2 mg EDTA 1mM (SIGMA)
2000 µl complete 50x koncentrovaný
10 tabletiék PhosphoSTOP

Zloženie TMES (TRIS, MgCl₂, EDTA, sacharóza), 100ml, pH 7,4:

242 mg TRIS (TRIZMA® base, SIGMA)
61 mg MgCl₂ 3mM
29,2 mg EDTA 1mM (SIGMA)
2000 µl complete 50x koncentrovaný
10 tabletiék PhosphoSTOP
8,6 g sacharóza

Príloha 2

Zloženie roztokov pre Imunofluorescenciu

Zloženie Phosphate Buffered Saline (PBS)

8g NaCl
0,2g KCl
1,72g Na₂HPO₄.12H₂O
0,24g KH₂PO₄

Následne bolo upravené pH pomocou NaOH na hodnotu 7,4 a doplnené do 1l.

Príloha 3

Zloženie roztokov pre Elektroforézu a Western blot analýzu

Zloženie homogenizačného média HM1, 10 ml, pH 7,4:

16,04 mg TRIS (TRIZMA® base, SIGMA)
9,52 mg EDTA (SIGMA)
2,92 mg EDTA (SIGMA)
0,86 g sacharóza
1 tableta inhibitory proteáz
200 µl complete 50x koncentrovaný
7,71 mg DTT (dithiotreitol)

Zloženie homogenizačného média HM2, 10 ml:

3 g močoviny

1,55 g thiomčoviny

45 mg tetrasodium pyrofosfát dekahydrát

Všetky chemikálie boli zmiešané a doriedené 2-merkptoethanolom do 10 ml mQ H₂O.

Zloženie gélov:

<i>Na 2 gély</i>	<i>12% deliaci gél</i>	<i>5% zaostrovací gél</i>
H ₂ O	2,9 ml	2,62 ml
AA	4 ml	0,83 ml
Tris pH=8,9	2,5 ml	0
Tris pH=6,9	0	1,25 ml
SDS	0,1 ml	0,05 ml
APS	0,5 ml	0,25 ml

AA – 30% akrylamidový roztok (SIGMA)

TRIS pufoer pH 8,9

9,1 g TRIS (TRIZMA® base; SIGMA) + 345 µl TEMED (SIGMA) bolo rozpustené v mQ H₂O. Následne bolo upravené pH pomocou HCl na hodnotu 8,8 a doplnené do 100 ml.

TRIS pufoer pH 6,8

10,462 g BIS-TRIS (SIGMA) + 345 µl TEMED (SIGMA) bolo rozpustené v mQ H₂O. Následne bolo upravené pH pomocou HCl na hodnotu 6,8 a doplnené do 100 ml.

SDS – sodium dodecyl sulfát (SERVA)

APS – ammonium persulfát 60 mg do 5 ml mQ H₂O (P-lab)

DTT – dithiotreitol

Zloženie elektrodového pufru, 1l:

30,3 g TRIS (TRIZMA® base; SIGMA)

144 g Glycin (SIGMA)

10 g SDS (SERVA)

Navážené množstvo bolo rozpustené v 1l mQ H₂O. Pred použitím bol roztok nariedený v pomere 1:9 – pufoer: mQ H₂O.

Zloženie Towbin pufru – blotovací pufoer, 1l:

3,03 g TRIS (25mM) - (TRIZMA® base; SIGMA)

14,4 g Glycin (192mM) - (SIGMA)

Navážené množstvo bolo rozpustené v 500 ml mQ H₂O. Následne pridané 200 ml metanolu (PENTA) a doplnené do 1 l mQ H₂O.

Zloženie TBS, 5l:

12,1 g TRIS (20mM) - (TRIZMA® base; SIGMA)

146,2 g NaCl (500mM) - (PENTA)

Navážené množstvo bolo rozpustené ve 4 l mQ H₂O a pH bolo upravené na 7,5 a doplnené mQ H₂O do 5 l.

Zloženie TTBS, 1l:

Pred použitím bolo do 1 l TBS pridané 500 µl Tween 20 (SIGMA)