

**Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra fyziologie živočichů**

---

*Charles University, Faculty of Science,  
Department of Physiology*



**Autoreferát disertační práce**  
*Synopsis of the PhD thesis*

**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**

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

**Mgr. Jana Kohútová**

**Praha 2019**

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie živočichů  
*Charles University, Faculty of Science, Department of Physiology*

---

Studijní program/ Study program: Fyziologie živočichu/ Animal Physiology

Předseda oborové rady/ President of Subject Area Board: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Školící pracoviště/ Training center: Katedra fyziologie živočichů

Autor/ Author: Mgr. Jana Kohútová

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

---

S disertační prací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

## Obsah/ Contents

<b>Zoznam skratiek/ List of abbreviations</b> .....	4
<b>SLOVENSKÁ ČASŤ (SLOVAK PART)</b> .....	5
<b>Abstrakt</b> .....	5
<b>Teoretický úvod</b> .....	6
<b>Ciele práce</b> .....	8
<b>Metódy a usporiadanie pokusov</b> .....	9
<b>Záver</b> .....	15
<b>Životopis</b> .....	16
<b>ANGLICKÁ ČASŤ (ENGLISH PART)</b> .....	18
<b>Abstract</b> .....	18
<b>Introduction</b> .....	19
<b>Aims of the thesis</b> .....	21
<b>Methods and experimental design</b> .....	22
<b>Results and discussions</b> .....	23
<b>Conclusion</b> .....	27
<b>Curriculum vitae</b> .....	30
<b>Zoznam všetkých impaktovaných publikácií/ List of scientific publications</b> .....	32
<b>Zoznam literatúry/ References</b> .....	33

## Zoznam skratiek/ List of abbreviations

AV ČR	Akadémia Vied Českej Republiky/ Academy of Science Czech Republic
°C	Stupeň Celsia/ Degree of celsius
CK 1	Kazeínkináza 1/ Casein kinase 1
CNH	Kontinuálna normobarická hypoxia/Continual normobaric hypoxia
Cx43	Konexín 43/ Connexin 43
FIO <sub>2</sub>	Parciálny tlak kyslíka/ Oxygen partial pressure
GJ	Gap junction
HK1,2	Hexokináza 1,2/ Hexokinase 1,2
CH	Chronický chlad/ Chronic cold
IHH	Intermitentná hypobarická hypoxia/ Intermitant hypobaric hypoxia
I/R	Ischemicko-reperfúzne/ Ischemic reperfusion
LV	Ľavá komora/ Left ventricle
MAPK	Mitogénom aktivovaná proteín kináza/ Mitogen-activated protein kinase
N	Normoxia/ Normoxia
np-Cx43	Nefosforylovaný Cx43/ Non-phosphorylated Cx43
n-3 PUFA	Omega-3 polynasýtené mastné kyseliny/ Omega-3 polyunsaturated fatty acids
p-Cx43	Fosforylovaný konexín 43/ Phosphorylated Cx43
PKA	Proteínkináza A/ Protein kinase A
PKB/Akt	Proteínkináza B/ Protein kinase B
PKC	Proteínkináza C/ Protein kinase C
PKC $\epsilon$	Proteínkináza Cepsilon/ Protein kinase Cepsilon
PKC $\delta$	Proteínkináza Cdelta/ Protein kinase Cdelta
PKG	Proteínkináza G/ Protein kinase G
R	Regresia/ Regression
ROS	Reaktívne formy kyslíka/ Reactive forms of oxygen
3D	3-dňový chlad/ 3-day cold
10D	10-dňový chlad/ 10-day cold

# SLOVENSKÁ ČASŤ (SLOVAK PART)

## 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 arytmogenézou. Za rôznych patologických stavov dochádza k zmene v expresii a/alebo distribúcii Cx43 v závislosti na jeho fosforylačnom stave. Taktiež dochádza k zmene asociácie hexokinázy s mitochondriami, ktorá tak znižuje tvorbu voľných radikálov a pravdepodobnosť aktivácie apoptózy. Adaptácia na intermitentnú hypobarickú hypoxiu posiluje endogénne ochranné cesty redukujúce výskyt ventrikulárnych arytmií zatiaľ čo, protektívna 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, fosforylovaný stav Cx43, (p-Cx43), hexokinázy (HK1, HK2) a ich distribúciu v kardiomyocytoch. Okrem toho bola analyzovaná expresia Cx43 upstream kináz, proteínkinázy A (PKA), proteínkinázy G (PKG), kazeínkinázy 1 (CK1) v normoxických (N) a hypoxických ľavých komorách (LV) potkanov spolu s distribúciou Cx43 počas krátkej ischémie a reperfúzneho poškodenia. Samce potkanov Wistar boli adaptované na hypoxiu (7 000 m, 8-h/deň, 5 týždňov alebo 10% kyslíka, 24-h/deň, 3 týždne) a následne boli špeciálne skupiny srdca vystavené krátkodobej ischémii (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 *side to side* spojeniach a lokalizácia HK na mitochondriách boli hodnotené 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 ( $6 \pm 1$  °C) počas 3 dní, 10 dní, 5 týždňov a následne 2 týždne pri teplote  $24 \pm 1$  °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

## Teoretický úvod

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, ktorá je dôsledkom zmeny expresie alebo distribúcie Cx43, ako hlavnej zložky gap junction (GJ) spojenia v ľavej komore myokardu.

Početné štúdie poukazujú na vznik patologických srdcových ochorení, ktoré často súvisia so štrukturálnou a elektrickou remodeláciou myokardu, zvýšeným rizikom ventrikulárnych arytmií a náhlejšou srdcovou smrťou. Experimentálne štúdie na geneticky upravených myšiach so zníženou hladinou Cx43 preukázali vzťah medzi oslabenou intercelulárnou komunikáciou a arytmiogenézou. Kľúčová úloha pri prestavbe GJ súvisiaca s arytmiami bola preukázaná v modeli infarktu myokardu u mačiek, kde zmena expresie Cx43 korelovala s lokalizáciou *reentry* arytmií.

Vedľa počtu Cx43 a vodivých vlastností GJ, lokalizácia Cx43 je taktiež dôležitým aspektom, ktorá prispieva k arytmiogenéze a zoslabenie jej abnormalít bolo opakovane preukázané ako kardioprotektívne. Za fyziologických podmienok sú Cx43 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). V rôznych patologických stavoch boli pozorované zmeny v expresii Cx43 a jeho funkčných vlastnostiach v dôsledku posttranslačných modifikácií, ovplyvňujúcich vodivosť a pravdepodobnosť otvárania kanálov. Znížená expresia Cx43, ako aj zvýšené vedenie vedú k tvorbe arytmogénneho substrátu, spôsobujú spomalenie a abnormálne vedenie. Zistenie, že upregulácia proteínu myokardu Cx43 je spojená s ochranou pred arytmiami je v súlade s predchádzajúcimi štúdiami.

Adaptácia na chronickú hypoxiu je tiež dobre známym kardioprotektívnym fenoménom. Predchádzajúce štúdie vypracované na Fyziologickom ústave Akadémie Vied Českej republiky (AV ČR) preukázali zvýšenú ischemickú toleranciu, zlepšenie post-ischemickej kontraktility a najmä zníženú tendenciu k vzniku arytmií po adaptácii na prerušovanú hypobarickú hypoxiu

(IHH, 7000 m, 5 týždňov) (Asemu et al. 1999; Asemu et al. 2000; Ostadal & Kolar 2007) zatiaľ čo, adaptácia na kontinuálnu normobarickú hypoxiu (CNH) tento antiarytmický účinok stráca. Taktiež bolo na našich pracoviskách preukázané, že v mechanizme endogénnej kardioprotekcie indukovanej IHH i CNH, hrajú úlohu reaktívne formy kyslíka (Kolar et al. 2007; Kasparova et al. 2015). Ďalej v IHH hrá úlohu mitochondriálna hexokináza (Waskova-Arnostova et al. 2015), proteín kináza C (PKC) (Hlavackova et al. 2007) a mitochondriálne K-ATP kanály (Neckar et al. 2002a). Avšak údaje o tom, či sa myokardiálny Cx43 môže zúčastniť na antiarytmickom účinku indukovanom IHH chýbajú.

Ďalším študovaným modelom je chladová adaptácia, ktorá predstavuje doposiaľ málo študovaný model vo vzťahu ku Cx43 i k ostatným kardioprotektívnym mechanizmom. Adaptácia na chlad je známa svojimi pozitívnymi účinkami, ktorá zlepšuje imunitnú a vaskulárnu odpoveď, termoreguláciu a má hypolipidemický účinok. Chladová adaptácia vedie k tvorbe hnedého tukového tkaniva, ktoré sa zvyčajne tvorí počas hibernácie a tak zachováva srdcovú činnosť aj pri nízkych teplotách (Blumberg 1997). Naše výsledky je možné porovnávať len s fyziológiou hibernácie, ktorá 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 práci sa zameriavame na možnú úlohu expresie, fosforylácie a distribúcie Cx43 ako aj jednotlivých kináz vzhľadom na antiarytmické účinky stimulované adaptáciou na IHH a chlad.

## Ciele práce

Cieľom dizertačnej práce bolo lepšie pochopiť význam distribúcie Cx43 a rôznych fosforylácií Cx43 a nájsť ich súvislosť s antiarytmickým účinkom adaptácie na IHH a na chlad. Vzhľadom na to, že výskyt malígnych arytmií, ako dôsledok ischemicko-reperfúzneho (I/R) poškodenia srdca má významnú úlohu v úmrtnosti v súčasnej populácii, preto poznanie endogénnych ochranných mechanizmov je celospoločensky významné a môže prispieť k zlepšeniu farmakologickej liečby.

**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 isoform hexokinázy HK1 a HK2 v LV N, CNH zvierat, po ischemickom insulte a I/R poškodení.

**Cieľ 3.** Stanovenie expresie myokardiálneho Cx43 a p-Cx43(Ser368), PKA, CK1 a 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 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, proteínkinázy B (PKB/Akt), PKC $\epsilon$ , PKC $\delta$ , mitogénom aktivovanej proteínkinázy (MAPK) v LV CH a R.



## Metódy a usporiadanie pokusov

### *Štúdia A, B*

Na experimenty boli použité dospelé samce laboratórneho potkana kmeňa Wistar (8 týždňov staré), pochádzajúce z chovnej stanice Fyziologického ústavu Akadémie vied (Česká Republika). Zvieratá mali voľný prístup k vode a ku štandardnej laboratórnej diéte v režimu 12 hod svetlo/12 hod tma. Potkany boli vystavené IHH alebo CNH.

Adaptácia na IHH prebiehala 8 hod denne, 5 dni v týždni, celkom 25 dní. Barometrický tlak bol znižovaný postupne tak, aby po 13 expozíciách odpovedal nadmorskej výške 7000 m. Potkany kontrolných skupín normoxie boli chované v normoxických podmienkach v nadmorskej výške 200 m pri teplote 21-23 °C. Barometrický tlak bol 99 kPa a parciálny tlak kyslíka 20,7 kPa ( $FIO_2 = 0,21$ ). Adaptácia na CNH prebiehala 24 hod denne, 7 dni v týždni, celkom 21 dní, ( $FIO_2 = 0,1$ ). Na konci každého pokusu boli potkany uvedené do hlbkej anestézie sódium pentobarbitálom, (60 mg/kg i.p.) za účelom získania tkaniva pre analýzy pomocou metód: Western blot, Imunoflorescencie, RT-PCR, Hmotnostnej spektrometrie a Analýzy lipidov. Jednotlivé srdečné oddiely boli zvážené a zmrazené v kvapalnom dusíku (-80 °C), kde boli uchovávané do ďalšieho spracovania.

Päť srdc z každej skupiny bolo podrobených krátkemu I/R poškodeniu in vivo (Štúdia A), ako bolo popísané v (Neckar et al. 2017) a/ alebo ex vivo na perfúznom systéme podľa Langendorfa (Kolar et al. 2017) (Štúdia B). V týchto experimentoch bola identifikovaná distribúcia celkového Cx43 (t-Cx43) a p-Cx43 na Ser368 (p-Cx43(Ser368)) medzi koncovými a laterálnymi spojmi (Štúdia A).

Ďalej bola pozorovaná lokalizácia izoforiem hexokinázy (HK1 a HK2) na mitochondriálnych subpopuláciách (Štúdia B) v LV normoxických a hypoxických zvierat, po ischemickom insulte a I/R poškodení pomocou imunofluorescenčného farbenia za použitia špecifických protilátok. Následne boli jednotlivé rezy nasnímané v fluorescenčnom mikroskope Olympus cell P (Carl Zeiss, Nemecko) a obrázky boli spracované pomocou softvéru FIJI za použitia vlastného skriptu pre poloautomatizáciu procesu hodnotenia koncových a laterálnych spojení. Myokardiálna expresia Cx43, p-Cx43(Ser368), PKA, CK1, PKG v LV normoxických a hypoxických zvierat bola stanovená pomocou metódy Western blot za použitia špecifických primárnych a sekundárnych protilátok. Pomocou hmotnostnej spektrometrie boli

identifikované fosforylačné miesta Cx43 v LV normoxických a hypoxických zvierat. Taktiež bola stanovená mRNA transkriptu Cx43 v LV normoxických a hypoxických zvierat pomocou RT-PCR analýzy.

### *Štúdia C*

Na experimenty boli použité dospelé samce laboratórneho potkana kmeňa Wistar (8 týždňov staré) (Velaz s.r.o.). 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 (Ka), 3D chlad, 10D chlad, chronická kontrola (Kc), CH chlad a 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 do kontrolnej teploty po 2 týždne. Ďalšie metodické prístupy boli obdobné štúdiám A, B

## **Výsledky a diskusia**

V spolupráci s Fyziologickým ústavom Akadémie vied Českej Republiky, Oddelením vývojovej kardiológie sme sledovali zmeny v expresii, distribúcii a fosforylácii Cx43 na hypobarickom modeli a kolokalizáciu HK1 a HK2 s mitochondriálnymi subpopuláciami na normobarickom modeli. Viaceré štúdie potvrdili kardioprotektívne účinky u IHH a to v dôsledku zvýšenej ischemickej tolerancie a zníženej tendencie k vzniku arytmií (Asemu et al. 1999; Neckar et al. 2002). Model normobarickej kontinuálnej hypoxie vykazuje kardioprotektívne účinky na úrovni zníženia veľkosti infarktu myokardu, avšak arytmie majú recipročný priebeh (Neckar et al. 2013) Tretím modelom bola chladová adaptácia, ktorú sme sledovali v celom priebehu od akútnej až po chronickú a následne zotavenie.

*Štúdia A: Anti-arrhythmic cardiac phenotype elicited by chronic intermittent hypoxia is associated with alterations in connexin-43 expression, phosphorylation and distribution.*

**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) *Frontiers in Endocrinology*. 25 January, <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00789>. IF = 3.519

Na IHH modeli sme prvýkrát demonštrovali, že IHH poskytuje antiarytmický účinok, ktorý je spojený so zvýšenou proteínovou expresiou celkového Cx43, fosforyláciou na seríne p-Cx43 (Ser364, Ser365, Ser368) a zníženou fosforyláciou na Ser279/282 a 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. Proteínová expresia PKA a PKG kináz bola taktiež zvýšená po adaptácii. 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. Zistenie, že zvýšená regulácia proteínov myokardu Cx43 je spojená s ochranou pred arytmiami, je v súlade s predchádzajúcimi štúdiami (pre prehľad Tribulova et al. 2015).

Posttranslačné modifikácie Cx43 hrajú dôležitú úlohu pri regulácii funkcie GJ kanálov, vodivosti a priepustnosti kanálov, v závislosti na fosforylačných 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 (2014) PKA, PKB/Akt, CK1, MAPK a 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 na 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, zatiaľ čo fosforylácia v-Src na Cx43

(Tyr247/Tyr265) podporuje zníženie regulácie GJ komunikácie a spôsobuje demontáž GJ (Dunn et al. 2012). Zdá sa, že fosforylácia na Ser279/Ser282 pomocou MAPK inhibuje Cx43 (Cottrell et al. 2003).

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 zlepšujú elektrickú remodeláciu, zvyšujú expresiu Cx43 a znižujú 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. Potravinová suplementácia potkanov počas adaptácie na IHH s n-3 PUFA mala za následok kumulatívny antiarytmický účinok, ktorý prakticky eliminoval komorové arytmie indukované I/ poškodením (Hlavackova et al. 2007). Predložená štúdia ukázala, že krátka ischémia 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, že IHH poskytuje antiarytmický účinok sprevádzaný zvýšenou expresiou Cx43 proteínu, fosforyláciou a pozitívnou redistribúciou Cx43 v ľavej komore. Aktivácia protizápalových kináz môže stimulovať signálne dráhy ovplyvňujúce obrat a zostavu GJ, čo vedie k zvýšenej endogénnej ochrane srdca pred život ohrozujúcimi arytmiami.

**Štúdia B:** *Adaptation to chronic continuous hypoxia potentiates Akt/HK2 anti-apoptotic pathway during brief myocardial ischemia/reperfusion insult.* 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). *Mol. Cell. Biochem.* 432, 99–108. IF= 2.669

Bolo preukázane, že zvýšený výskyt arytmií je tiež úzko spojený so zvýšenou produkciou reaktívnych foriem kyslíka (ROS) mitochondriami (Brown & Rourke 2010). Súčasne bolo ukázané, že zvýšená väzba hexokinázy na vonkajšiu mitochondriálnu membránu znižuje oxidatívny stres vyvolaný mitochondriami (Da-Silva et al. 2004). Zistili sme, že vplyvom adaptácie na CNH, ktorá nemá antiarytmický účinok, boli zvýšené hladiny HK1 a HK2 a celková HK aktivita po ischémii v porovnaní so zodpovedajúcou normoxickou skupinou. Srdce taktiež vykazovalo zvýšenú ischemickú hladinu Akt proteínu fosforylovaného na Ser473, ktorý je zodpovedný za jeho aktiváciu (Kolar et al. 2017). Podobne sa zvýšila expresia HK po

IHH adaptácii, u ktorej najviac došlo k zvýšeniu asociácie oboch HK1 aj HK2 izoforiem s mitochondriami (Waskova-Arnostova et al. 2015). To môže mať za následok zvýšenie dodávky ADP pre ATP-syntázu, primerané zníženie membránového potenciálu, zníženie produkcie ROS (Da-Silva et al. 2004) a následne môže prispievať k antiarytmickému účinku IHH.

Vedľa toho, aktivita Akt kontroluje stabilitu GJ a zúčastňuje sa tvorby väčších a stabilných GJ. Taktiež je zodpovedná za fosforyláciu HK na Thr473, ktorá je spojovaná so zvýšenou asociáciou HK2 s mitochondriami, a ktorá bola mnohokrát preukázaná ako protektívna. Za fyziologického stavu je HK naviazaná na napäťovo závislý aniontový kanál VDAC a zvyšuje dodávku ADP pre ATP-syntázu. Tým zvyšuje svoju aktivitu a stimuluje celú glykolýzu na jednej strane a transport glukózy do kardiomyocytov na strane druhej (Wilson 2003), čím 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 viac 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 CNH, zabránila odviazaniu HK2 z mitochondrií v priebehu reperfúzie, a to u všetkých mitochondriálnych subpopulácií rovnako (Kolar et al. 2017). V tejto súvislosti sme preukázali vysoko fosforylovanú 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 Akt, ktoré pretrvávajú počas 10-minútovej ischémie, a literatúra dokladá, že pri dlhšej expozícii ischémii dochádza k degradácii Cx43 i odpojeniu HK z mitochondrií.

**Štúdia C:** *Vplyv akútneho a chronického chladu na zmeny v expresii a distribúcii Cx43 a jeho kináz. (nepublikovaná)*

V tejto rozsiahlej doposiaľ nepublikovanej štúdii, 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 np-Cx43 sa znížil vplyvom 10D chladu. Imnoflorescenčné 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 v *end to end* spojeniach v myokarde po vystavení chronickému chladu. Zatiaľ neexistujú relevantné práce, s ktorými by sme mohli naše výsledky porovnať. Najbližším modelom je hibernácia, avšak u našich zvierat nedochádza k hypotermickému stavu. Aj napriek tomu 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.

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, ateroskleróza (Kanno & Saffitz 2001). Navyše je funkcia GJ regulovaná rôznymi faktormi, ako je fosforylácia, napätie,  $Ca^{2+}$ , pH, ale aj membránová fluidita a ďalšie. Niekoľko experimentálnych nálezov je v súlade s hypotézou, že dochádza k preťaženiu  $Ca^{2+}$  v kardiomyocytoch počas hypotermie u nehibernátorov (kráľika a potkan), ale nie u hibernátorov (Johansson 1996), čo by mohlo byť veľmi zaujímavou témou k štúdiu.

V prípade akútneho chladu bola popísaná úloha adrenergdného systému u človeka v termogenéze (Simeckova et al. 2000), čo by mohlo ovplyvniť distribúciu Cx43. Naše zistenia preukázali nesignifikantné zníženie expresie PKA u chronického chladu, ale v prípade Akt došlo k zníženiu aj vplyvom chronického chladu a regresie. WB analýza taktiež odhalila zvýšené protichodné zmeny v expresii PKC $\delta$  a PKC $\epsilon$ . Aj keď sú PKC $\epsilon$  a PKC $\delta$  členmi tej istej podskupiny, PKC $\delta$  (bežne označovaná ako kináza smrti) a PKC- $\epsilon$  (bežne označovaná ako kináza prežitia) sprostredkovávajú kontrastné a dokonca protikladné účinky (Singh et al. 2017). Ďalšou sledovanou kinázou bola CK1, ktorej proteínova expresia sa vplyvom chronického chladu a regresie nezmenila. CK1 fosforyluje Cx43 na Ser325/Ser328 Ser330 počas prechodu Cx43 z plazmatickej membrány do GJ (Cooper & Lampe 2002). Bolo zistené, že proteíny tepelného šoku sú zvýšené pri chlade a existujú dôkazy, že tieto proteíny, konkrétne heat shock proteín 70, chráni Cx43 pred degeneráciou (Laing et al. 1998). Tomu nasvedčujú aj zmeny v expresii MAPK, ktorá fosforyluje Cx43 na Ser279/Ser282, čím reguluje proces internalizácie a degradácie Cx43.

## Záver

Kardiovaskulárne ochorenia predstavujú významné príčiny úmrtnosti v dôsledku arytmií a následného kontraktlného 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.

Táto práca sa zaoberá úlohou konexínov a ich potenciálnych upstream kináz v dvoch protektívnych režimoch adaptácie na hypoxiu (IHH) a adaptácie na chlad. Súčasne 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, ktorý antiarytmické účinky nemá.

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 izoforiem. Dôležitým nálezom však je, že CNH znížila mieru odojdenia HK2 z mitochondrií v priebehu reperfúzie v porovnaní s kontrolami.

Naše výsledky na modeli IHH ukázali zvýšenú expresiu a fosforyláciu a súčasne zníženú 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 *upstream* kinázami. Zatiaľ čo v akútnej expozícii chladu nedochádza ani k podstatným zmenám v expresii a fosforylácii konexínov, u chronickej CH adaptácie sa znižuje lateralizácia. Nachádzame tiež zásadne rozdiely v aktivácii *upstream* kináz medzi IHH a CH. V priebehu I/R 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, avšak k úplnému porozumeniu týchto mechanizmov je nutné ďalšie štúdium.

# Životopis

Jana Kohútová

Narodená: 1.8.1990 v Bardejove

---

## Vzdelanie

- 2014-2019 Postgraduálne štúdium (Katedra Fyziológie živočíchov)  
Univerzita Karlova, Prírodovedecká fakulta, Praha  
*Dizertačná práca:* Kardioprotektívni úloha adaptácií na hypoxii a chlad:  
Konexín 43 a hexokináza 2  
*Školiteľ:* RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.
- 2012-2014 Magisterské štúdium (Katedra Fyziológie živočíchov a etológie)  
Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Bratislava  
*Diplomová práca:* Vplyv veku a pohlavia na expresiu konexínu-43 v srdci  
laboratórneho morčat'a.  
*Školiteľ:* RNDr. Narcisa Tribulová, DrSc
- 2009-2012 Bakalárske štúdium (Katedra Biológie)  
Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Bratislava  
*Bakalárska práca:* Význam melatonínu v ochrane srdca pred závažnými  
poruchami srdcového rytmu.  
*Školiteľ:* Mgr. Tamara Beňová

## Vedecká aktivita

Posterová prezentácia na konferenciách:

- 11.- 14.11.2018 *Antiarrhythmic fenotype of rat heart adapted to chronic hypoxia is associated with changes in connexin-43 expression, phosphorylation and distribution.* New Frontiers in Basic Cardiovascular Research: France-New EU Member (Prague)
- 30.8.- 3.9.2018 *Alterations of connexin-43 expression, distribution and phosphorylation in response to intermittent hypobaric hypoxia in the rat,* European Muscle Conferences (Budapest)



- 23.- 26.5.2018 *Regulation of connexin 43 phosphorylation under intermittent hypobaric hypoxia in the rat left ventricular myocardium*, Advances in Cardiovascular Research (Smolenice, Slovakia)
- 18.- 20.10. 2017 *Enhanced expression of connexin 43 in the rat left ventricular myocardium induced by hypobaric hypoxia*, Komise experimentální kardiologie (Kutná Hora, Czech Republic)
- 19.- 22. 9. 2017 *Hypobaric hypoxia enhances expression of connexin 43 in the left ventricular myocardium*, European Muscle Conferences (Potsdam, Germany)
- 21.- 23.10. 2015 *Adaptace na hypoxii snižuje pravděpodobnost aktivace apoptózy v průběhu ischemie a reperfuze*, Komise experimentální kardiologie (Buchlov, Czech Republic)

## ANGLICKÁ ČASŤ (ENGLISH PART)

### Abstract

Ventricular arrhythmias are the main cause of death worldwide. An increased incidence of arrhythmias in the heart of mammals is accompanied by remodelling of the GJ channels consisted mainly of connexin 43 (Cx43). Recently is 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 arrhythmias, whereas continuous normal hypoxia does not have this effect. Another studied model is cold acclimatization which has been known for several decades for its beneficial effects on human health. However, the heart study of these models in relation to Cx43 are missing. Therefore, our goal was to determine the expression of the phosphorylated state of Cx43, (p-Cx43) and hexokinase (HK1, HK2) and their distribution in cardiomyocytes. In addition, the expression of Cx43 upstream kinases, protein kinase A (PKA), protein kinase G (PKG), casein kinase 1 (CK1) in normoxic (N) and hypoxic left ventricle (LV) of rats, along with Cx43 distribution during short ischemia and reperfusion injury were 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 minutes) and reperfusion (15 minutes) in vivo. Expression and phosphorylation were assessed by specific antibodies and mass spectrometry. The Cx43 distribution at *end to end* and *side to side* longitudinal junctions was evaluated by quantitative immunofluorescence microscopy. Cx43 on longitudinal sections of the left ventricle and protein expression of Cx43 in LV of animals 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 benefits in changes of 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

## Introduction

Proper intercellular communication is essential for normal electrical activation of the myocardium and for synchronized cardiac contraction. Contractile heart failure and arrhythmias are the main cause of death due to heart disease. Myocardial remodelling in these pathologies may be associated with reduced intercellular communication resulting from a change in the expression and/or distribution of connexin 43 (Cx43) as the major component of the gap junction (GJ) of the left ventricular myocardium.

Numerous studies have pointed to the development of pathological heart disease, often related to structural and electrical remodelling of the myocardium, an increased risk of ventricular arrhythmias and sudden cardiac death. Experimental studies on genetically engineered/modified mice with reduced Cx43 showed the relationship between weakened intercellular communication and arrhythmogenesis. A key role in arrhythmia reconstruction of GJ has been demonstrated in a catheter cardiac infarct model, where the change in Cx43 expression correlated with localization of re-entry arrhythmias.

In addition to the number of Cx43 and conductive properties of GJ, Cx43 localization is also an important aspect that contributes to arrhythmogenesis and the attenuation of its abnormalities has been repeatedly shown to be cardioprotective. Under physiological conditions, GJ are predominantly located on intercalar disks, where they provide *end to end* conduction between adjacent cardiomyocytes. In addition, small amounts of Cx43 outside the intercalar discs are provided in the lateral plasma membrane which allow for a *side to side* connection between cardiomyocytes (i.e., side connection). Differences in Cx43 expression and its functional properties have been observed in various pathological states due to posttranslational modifications affecting conduction and probability of channel opening. Reduced Cx43 expression as well as increased conduction leads to the formation of an arrhythmogenic substrate, causing slowing and abnormal conduction. The finding that upregulation of the Cx43 myocardial protein is associated with protection from arrhythmias is consistent with previous studies.

Adaptation to chronic hypoxia is also a well-known cardioprotective phenomenon. Previous studies performed at the Institute of Physiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic showed an increased ischemic tolerance, improvement of post-ischemic contractility

and especially a decreased tendency to arrhythmias after the adaptation to intermittent hypobaric hypoxia (IHH, 7000 m, 5 weeks) (Asemu et al. 2000, Ostadal & Kolar 2007), whereas the adaptation to continuous normobaric hypoxia (CNH) did not provide any beneficial antiarrhythmic effect. Both of our workplaces have demonstrated that reactive forms of oxygen play a role in the mechanism of endogenous cardioprotection induced by IHH and CNH (Kolar et al., 2007, Kasparova et al., 2015). In addition, IHH plays a role in mitochondrial hexokinase translocation (Waskova-Arnostova et al., 2015), protein kinase C activation (Hlavackova et al., 2007) and mitochondrial K-ATP channels opening (Neckár et al. 2002). However, data whether myocardial Cx43 may participate in IHH-induced antiarrhythmic effects are missing.

Another studied model is the adaptation to cold, which is still a not very well studied model in relation to Cx43 and other cardioprotective mechanisms. Adaptation to cold is known for its positive effects, which improves the immune and vascular response, thermoregulation and has a hypolipidemic effect. Cold adherence leads to the formation of brown fat tissue, which is usually formed during hibernation and thus keeps heart activity steady even at low temperatures (Blumberg 1997). Our results can only be compared with the physiology of hibernation, which is characterized by a dramatic decrease in heart rate, breathing, metabolism, blood pressure and body temperature, and resistance to ventricular fibrillation. GJs provide low-resistance pathways in the heart that facilitate the electrical and metabolic bond between heart muscle cells, coordinated cardiac action and tissue homeostasis. The conductivity of these GJs, and therefore their function, is likely to be affected by physiological changes occurring during hibernation.

In this work we focus on the possible role of expression, phosphorylation and distribution of Cx43 as well as individual kinases with respect to antiarrhythmic effects stimulated by adaptation to IHH and cold.

## **Aims of the thesis**

The aim of the dissertation was to better understand the importance of the distribution of Cx43 and the various Cx43 phosphorylations and to find their connection with the antiarrhythmic effect of adaptation to IHH and cold. Since the occurrence of malignant arrhythmias as a consequence of ischemia-reperfusion injury to the heart has an important role in mortality in the current population, the knowledge of endogenous protective mechanisms is of great importance and can contribute to the improvement of pharmacological treatment.

**Objective 1.** Identification of the distribution of t-Cx43 and p-Cx43 (Ser368) between end and lateral connections in LV N, IHH animals, after ischemic insult and I / R injury.

**Objective 2.** Identify the distribution of HK1 and HK2 isoforms in LV N, CNH animals, after ischemic insult and I / R injury.

**Objective 3.** Determination of expression of myocardial Cx43 and p-Cx43 (Ser368), PKA, CK1 and PKG in LV N and IHH animals.

**Objective 4.** Identification of phosphorylation sites and other post-translational modifications of Cx43 in LV N and IHH animals by mass spectrometry.

**Objective 5.** Determination of Cx43 transcript mRNA and lipid analysis in LV N and IHH animals.

**Objective 6.** Determination of myocardial Cx43 expression in LV after 3-day and 10-day cold exposure (3D, 10D) and after 5-week cold exposure followed by 2-week regression (CH and R).

**Objective 7.** Identification of total Cx43 distribution between end and lateral LV connections in acute and chronic cold exposure and subsequent regression.

**Objective 8.** Determination of expression of PKA, CK1, Protein kinase B (PKB / Akt), PKC $\epsilon$ , PKC $\delta$ , Mitogen-activated protein kinase (MAPK) in LV CH and R.

## Methods and experimental design

### *Study A, B*

Experimental adult male 8-week-old Wistar rats from the breeding station of the Academy of Science, Institute of Physiology (Czech Republic) were used. The animals had free access to water and a standard 12-hour light / 12-hour dark regime and standard laboratory diet.

The rats were subjected to IHH and CNH. Adaptation to the IHH occurred 8 hours a day, 5 days a week, a total of 25 days. The barometric pressure was gradually reduced to 13 exposures that represent an altitude of 7,000 m. Control groups were kept under normoxic conditions corresponding to an altitude of 200 m at 21-23 ° C. Barometric pressure was 99 kPa and oxygen partial pressure 20.7 kPa (FIO<sub>2</sub> = 0.21). The specific conditions of CNH occurred 24 hours a day, 7 days a week, a total of 21 days, (FIO<sub>2</sub> = 0.1).

At the end of each experiment, pentobarbital (60 mg / kg i.p.) was administered and the tissue for Western blotting, Immunofluorescence, RT-PCR, Mass Spectrometry, and Lipid Analyses was obtained. The individual heart sections were weighed and frozen in liquid nitrogen (-80 ° C), where they were stored for further processing. Five hearts from each group were subjected to short ischemia-reperfusion injury (I / R) *in vivo* (Study A) as described in (Neckar et al., 2017) and *ex vivo* on a Langendorff apparatus perfusion system (Kolar et al., 2017 ) (Study B).

In this experiment, the distribution of total Cx43 (t-Cx43) and phospho-Cx43 on Ser368 (p-Cx43 (Ser368)) between terminal and lateral connections and / or two hexokinase (HK1 and HK2) were analyzed in LV normoxic and hypoxic animals, after ischemic insult and I / R injury by immunofluorescence staining using specific antibodies. Subsequently, the individual sections were scanned in the Olympus cell P fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany) and the images were processed using the FIJI software and using its own script for semi-automation of the end and lateral junction evaluation process. Myocardial expression of Cx43, p-Cx43 (Ser368), PKA, CK1, PKG in LV of normoxic and hypoxic animals was determined by Western blot using specific primary and secondary antibodies. Cx43 phosphorylation sites were identified in LV in normoxic and hypoxic animals by mass spectrometry. The mRNA transcript of Cx43 was also determined in LV in normoxic and hypoxic animals by RT-PCR analysis.

### *Study C*

Adult male Wistar rats (8 weeks old) (Velaz s.r.o.) were used in this study. The animals were bred in a breeding facility and had free access to water and a 12-hour light / 12-hour dark cycle, including a standard laboratory diet, caged by pairs. The rats were divided into six groups in the experiment as follows: acute control (K), 3-day cold (3D), 10 day cold (10D), chronic control (K), chronic cold (CH), and regression group (R). Control groups were kept at room temperature  $24 \pm 1$  ° C. The 3D group was exposed for 3 days to the ambient temperature of  $6 \pm 1$  ° C. Group 10D was exposed to the ambient temperature of  $6 \pm 1$  ° C for 10 days. CH and R groups were kept in a separate room from the control groups. Both groups had been progressively adapted to the ambient temperature of  $6 \pm 1$  °C within one week after which they remained for another 5 weeks. The R group was subsequently transferred to the control temperature in which it stayed for 2 weeks.

Other methodological approaches were similar to studies A, B

## **Results and discussions**

In cooperation with the Physiology Institute Academy of Science Czech Republic, the Department of Developmental Cardiology monitored changes in the expression, distribution and phosphorylation of Cx43 on the hypobaric model. Several studies have confirmed cardioprotective effects due to increased ischemic tolerance and reduced tendency to arrhythmias (Asemu et al., 1999, Neckar et al., 2002). In addition, we used a model of normobaric continuous hypoxia, which shows cardioprotective effects at the level of myocardial infarction size, but the arrhythmias have a reciprocal course (Neckar et al, 2013). The third model was the cold adaptation that we observed from the acute to the chronic periods, and then also from the recovery point of view.

***Study A: Anti-arrhythmic cardiac phenotype elicited by chronic intermittent hypoxia is associated with alterations in connexin-43 expression, phosphorylation and distribution.***  
*Kohutova, J., Elsnicova, B., Holzerova, K., Neckar, J., Sebesta, O., Jezkova, J., Vecka, M., Vebr, P., Hornikova, Szeiffova-Bacova, B., Egan Benova, T., Hlavackova, M., Tribulova, N.,*

Kolar, F., Novakova, O., Zurmanova, JM. (2019) *Frontiers in Endocrinology*. 25 January, <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00789>. IF = 3.519

In the IHH model, we have demonstrated for the first time that IHH provides an antiarrhythmic effect which is associated with increased protein expression of total Cx43, phosphorylation of serine p-Cx43 (Ser364, Ser365, Ser368) and decreased serine Ser279 / 282 phosphorylation and tyrosine Tyr265. In this context, the IHH induced Cx43 mRNA transcript reduction suggests post-transcriptional control of the Cx43 protein level. Additionally, improved localization of the total Cx43 and p-Cx43 (Ser368) in *end to end* connections and the concomitant *side to side* reduction of GJ by IHH in the left ventricle were documented. Protein expression of PKA and PKG kinases was also increased after adaptation. We found that protein expression of Cx43 and its phosphorylated forms P1 + P2 Cx43 increased, whereas non-phosphorylated form Cx43 (np-Cx43) or also referred to as low phosphorylated form was decreased by IHH. The finding that increased regulation of Cx43 myocardial proteins is associated with protection from arrhythmias is consistent with previous studies (for the review see Tribulova et al., 2015).

Post-translational modifications Cx43 play an important role in regulating the function of the channels of the connecting slots, conductivity and channel penetration, depending on phosphorylated sites (Axelsen et al., 2013). Accordingly, it is known that the opening of GJ channels, assembly and disassembly of Cx43 into the plasma membrane is determined by the phosphorylated Cx43 state (Pogoda et al., 2016). In this study we have shown that IHH affects the phosphorylated Cx43 state at its six phosphorylation sites (Ser364, Ser365, Ser368, Ser279/282, Tyr265). As shown in the Solan and Lampe study, PKA, PKB/Akt, CK1, MAPK, and v-Src tyrosine kinase are involved in controlling the phosphorylation of Cx43 (Solan & Lampe 2014).

Our findings also showed that both PKA and PKG expression increased, whereas CK1 was unchanged in the left ventricle of IHH adapted animals. Overall, our findings support the idea that GJ communication in the left ventricle of rats exposed to IHH is most likely regulated by Cx43 modifications through multiple phosphorylation sites. Enhanced GJ communication occurs after activation of PKA on Cx43 Ser364 / Ser365, resulting in increased Cx43 transfer to the plasma membrane (Tenbroek et al., 2001). Subsequently, CK1 phosphorylates Cx43 at Ser325 / Ser328 / Ser330 sites during Cx43 transition from the plasma membrane to GJ (Cooper & Lampe 2002). Dunn *et al.* found that the Akt activity regulates the stability of GJ



and its activity was involved in the formation of larger and more stable GJs while the phosphorylation of v-Src on Cx43 (Tyr247 / Tyr265) supports the reduction of GJ communication regulation and causes GJ disassembly (Dunn et al., 2012) . It appears that phosphorylation on Ser279/Ser282 by MAPK inhibits Cx43 (Cottrell et al., 2003).

Generally, the antiarrhythmic effect may also depend on the integrity and lipid composition of membranes that affect the conductivity and function of membrane-bound proteins. For example, n-3 PUFA improves electrical remodeling, increases Cx43 expression and reduces arrhythmias in hypertensive rats (Fischer et al., 2008, Radosinska et al., 2013), suggesting the close relationship between Cx43 and the antiarrhythmic effect of n-3 PUFA. Food supplementation of rats during adaptation to IHH with n-3 PUFA resulted in a cumulative antiarrhythmic effect that practically eliminated I/R-induced ventricular arrhythmias (Hlavackova et al., 2007). The present study has shown that short ischemia further increases the already high proportion of n-3 PUFA in membrane phospholipids in the heart by IHH, which is consistent with the elevated level of p-Cx43 (Ser368) in the *end to end* GJ.

In conclusion, IHH provides an antiarrhythmic effect accompanied by increased expression of the Cx43 protein, phosphorylation and positive Cx43 redistribution in the left ventricle. Activation of anti-inflammatory kinases can stimulate signal pathways affecting the turnover and GJ assembly, resulting in increased endogenous.

**Study B:** *Adaptation to chronic continuous hypoxia potentiates Akt/HK2 anti-apoptotic pathway during brief myocardial ischemia/reperfusion insult.* 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). *Mol. Cell. Biochem.* 432, 99–108. IF= 2.669

It has been shown that increased occurrence of arrhythmias is also closely associated with higher production of reactive forms of oxygen (ROS) by mitochondria (Brown & Rourke 2010). At the same time, increased binding of hexokinase to the outer mitochondrial membrane has been shown to reduce oxidative stress induced by mitochondria (Da-Silva et al., 2004). We have found that due to adaptation to CNH that did not have an antiarrhythmic effect, elevated levels of HK1 and HK2 and overall HK activity after ischemia were compared with the corresponding normoxic group. The heart has also shown an elevated ischemic level of Akt

protein phosphorylated Ser473 which is responsible for its activation (Kolar et al., 2017). Similarly, HK expression increased after IHH adaptation, with greatest association of both HK1 and HK2 isoforms with mitochondria (Waskova-Arnostova et al., 2015). This may result in increased ADP supply for ATP synthase, adequate reduction of membrane potential, reduction of ROS production (Da-Silva et al., 2004) and consequently may contribute to the antiarrhythmic effect of IHH.

In addition, the Akt activity controls the stability of GJ and participates in the formation of larger and stable GJs. It is also responsible for the phosphorylation of HK on Thr473, which is associated with a higher association of HK2 with mitochondria, which has been shown protective. In the physiological conditions HK is bound to the voltage-dependent anionic channel of VDAC and increases ADP delivery for ATP synthase. This enhances its activity and stimulates total glycolysis on the one hand and glucose transport to the cardiomyocytes on the other hand (Wilson 2003), thereby improving the energetic situation of cardiomyocytes under hypoxic conditions. Therefore, we have focused on mitochondrial subpopulation (Kolar et al., 2017) and we have observed that this increase would not be more pronounced in subsarcomal populations of mitochondria that would directly promote glucose uptake under hypoxic or ischemic conditions. This hypothesis has not been confirmed, but CNH adaptation has been shown to prevent the removal of HK2 from mitochondria during reperfusion, in all mitochondrial subpopulations as well (Kolar et al., 2017). In this context, we have demonstrated a highly phosphorylated Akt after a 10-minute ischemia in hypoxic heart in both works (Kolar et al., 2017, Kohutova et al., 2019). Hence, hypoxia activates Akt protective signaling pathways that persist during 10-minute ischemia, demonstrating that Cx43 degradation and HK dissociation from mitochondria occur when prolonged ischemia is exerted.

***Study C: Influence of acute and chronic cold on changes and expressions of Cx43 and its kinases. (unpublished)***

In this extensive, unpublished study, we have pointed for the first time change in Cx43 expression and distribution after exposure to acute and chronic cold. It has been found that protein expression of Cx43 and its phosphorylated forms of P1 + P2 Cx43 did not increase with 3D and 10D cold, while np-Cx43 was decreased at 10D cold. Immunofluorescence did not show changes in Cx43 distribution due to 3D and 10D cold. In the case of chronic cold, we have seen increased protein expression of total Cx43. Quantitative analysis

of immunofluorescence images revealed a slight increase in Cx43 in endpoints in the myocardium after exposure to chronic cold. So far, there are no relevant works to compare our results. The closest model is hibernation, but there is no hypothermic condition in our animals. However, our findings correlate with the work of Saitongde (2000), where quantitative analysis have shown significantly higher Cx43 immunoexpression in plaque count and plaque area during hibernation compared to control.

Since different types of channels have different channel properties, including pore size, conductivity and ion selectivity, the change in the amount and distribution of connexins in cells is associated with a number of pathological conditions such as arrhythmia, atherosclerosis (Kanno & Saffitz 2001). In addition, GJ function is regulated by various factors such as phosphorylation, voltage,  $\text{Ca}^{2+}$ , pH, but also membrane fluidity and others. Several experimental findings are consistent with the hypothesis that there is  $\text{Ca}^{2+}$  overload in cardiomyocytes during hypothermia in nonhibernators (rabbit and rat), but not in hibernators (Johansson 1996), which could be a very interesting topic for the study.

In the case of acute cold, the role of the adrenergic system in humans in thermogenesis was described (Simeckova et al., 2000), which could affect the distribution of Cx43. Our findings have shown a significant decrease in PKA expression in chronic cold, but in the case of Akt there was also a decrease in the effect of chronic cold and regression. WB analysis have also revealed increased inverse changes in the expression of PKCs and PKC $\epsilon$ . Although PKC $\epsilon$  and PKC $\delta$  are members of the same subgroup, PKCs (commonly referred as the death kinase) and PKC- $\epsilon$  (commonly referred as survival kinase) mediate contrast and even adverse effects (Singh et al., 2017). Another observed kinase was CK1, which protein expression was not altered due to chronic cold and regression. CK1 phosphorylates Cx43 on Ser325 / Ser328 / Ser330 during the transition of Cx43 from the plasma membrane to GJ (Cooper & Lampe 2002). Heat shock proteins were found to be elevated in the cold, and there is evidence that these proteins, specifically the heat shock protein 70 protect Cx43 from degradation (Laing et al., 1998). This also indicates changes in MAPK expression, which phosphorylates Cx43 on Ser279 / Ser282, thereby regulating the Cx43 internalization and degradation process.

## Conclusion

Cardiovascular diseases are major causes of mortality due to arrhythmias and subsequent contractile cardiac failure, which are alarming for the prevalence of risk factors in young people. Heart illnesses are often accompanied by impaired mitochondrial function, developing oxidative stress, decreasing total Cx43 and increasing lateral joints, thereby increasing the tendency of the heart to malignant arrhythmias.

This work deals with the role of connexins and their potential upstream kinases in two protective modes of adaptation to hypoxia (IHH) and adaptation to cold (CH). At the same time, the results of this work are related to the already published data on the protection of mitochondria by the increased hexokinase association in the IHH antiarrhythmic regimen, by studying this phenomenon in the CNH hypoxic regime, which does not have antiarrhythmic effects.

Regarding the protection of mitochondria from excessive production of ROS in hypoxia and subsequent I/R injury by increased association of hexokinase, we found differences between antiarrhythmic IHH where the association of hexokinase 1 and 2 significantly increased and proarythmic CNH, where the association did not change even in one isoform. An important finding is that CNH reduced the rate of HK2 dissociation from mitochondria during reperfusion as compared to controls.

Our IHH results have shown increased expression, phosphorylation and decreased lateral ligation of connexins, which can contribute significantly to the already known antiarrhythmic effect. We found that IHH affects the phosphorylated state of Cx43 at its six phosphorylation sites (Ser364, Ser365, Ser368, Ser279/282, Tyr265), consistent with detectable or even published kinases. Since there is no significant change in the expression and phosphorylation of connexins in active cold exposure that does not alter the arrhythmia, chronic lateralisation is reduced in chronic CH adaptation in accordance with its antiarrhythmic effect. There are also fundamental differences in upstream kinase activation between IHH and CH. During I/R in the adapted animals on IHH, further down-regulation of Cx43 was observed, which was consistent with an increase in n-3 PUFA.

Concludingly, our work has produced original results that open up new insights into cardioprotective regimes of adaptation, and further study is needed to fully understand these mechanisms.

# Curriculum vitae

Jana Kohútová

Born: 1.8.1990 in Bardejov

---

## Education

- 2014-2019                      PhD. Study (Department of Physiology)
- Charles University, Faculty of Science, Prague  
*Thesis:* Cardioprotective effect of adaptations to hypoxia and cold:  
Connexin 43 and hexokinase 2  
*Supervisor:* RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.
- 2012-2014                      Master's degree (Department of Physiology and ethology)
- Comenius University in Bratislava, Faculty of Science, Bratislava  
*Thesis:* The effect of age and gender on the expression of connexin-43 in  
the heart of laboratory guinea pigs.  
*Supervisor:* RNDr. Narcisa Tribulová, DrSc
- 2009-2012                      Bachelor's degree (Department of Physiology)
- Comenius University in Bratislava, Faculty of Science, Bratislava  
*Thesis:* The importance of melatonin in protecting the heart from serious  
disturbances in heart rhythm.  
*Supervisor:* Mgr. Tamara Beňová

## Scientific activity

Poster presentations at conferences:

- 11.- 14.11.2018                      *Antiarrhythmic fenotype of rat heart adapted to chronic hypoxia is associated with changes in conexin-43 expression, phosphorylation and distribution.* New Frontiers in Basic Cardiovascular Research: France- New EU Member (Prague)
- 30.8.- 3.9.2018                      *Alterations of connexin-43 expression, distribution and phosphorylation in response to intermittent hypobaric hypoxia in the rat,* European Muscle Conferences (Budapest)
- 23.- 26.5.2018                      *Regulation of connexin 43 phosphorylation under intermittent hypobaric hypoxia in the rat left ventricular myocardium,* Advances in Cardiovascular Research (Smolenice, Slovakia)

- 18.- 20.10. 2017 *Enhanced expression of connexin 43 in the rat left ventricular myocardium induced by hypobaric hypoxia*, Komise experimentální kardiologie (Kutná Hora, Czech Republic)
- 19.- 22. 9. 2017 *Hypobaric hypoxia enhances expression of connexin 43 in the left ventricular myocardium*, European Muscle Conferences (Potsdam, Germany)
- 21.- 23.10. 2015 *Adaptace na hypoxii snižuje pravděpodobnost aktivace apoptózy v průběhu ischemie a reperfuze*, Komise experimentální kardiologie (Buchlov, Czech Republic)

## Zoznam všetkých impaktovaných publikácií/ List od scientific publications

**Kohutova, J.**, Elsnicova, B., Holzerova, K., Neckar, J., Sebesta, O., Jezkova, J., Vecka, M., Vebr, P., Hornikova, D., Szeiffova-Bacova, B., 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*. 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., et al. (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



## Zoznam literatúry/ References

- 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.
- 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.
- Brown, D.A. & Rourke, B.O., 2010. Cardiac mitochondria and arrhythmias. *Cardiovascular Research*, 88, pp.241–249.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Johansson, B., 1996. The hibernator heart- nature's model of resistance to ventricular

- fibrillation. *Cardiovasc Res.*, 31(5), pp.826–832.
- Kanno, S. & Saffitz, J.E., 2001. The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovascular Pathology*, 10, pp.169–177.
- Kasparova, D. et al., 2015. Cardioprotective and nonprotective regimens of chronic hypoxia diversely affect the myocardial antioxidant systems. *Physiol Genomics*, 47(12), pp.612–620.
- 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*. in press
- 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.
- 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.
- Neckar, J. et al., 2013. Brief Daily Episode of Normoxia Inhibits Cardioprotection Conferred by Chronic Continuous Hypoxia. Role of Oxidative Stress and BKCa Channels. *Current Pharmaceutical Design*, 19(39), pp.6880–6889.
- Neckar, J. et al., 2002. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res Cardiol*, 97, pp.161–167.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- Solan, J.L. & Lampe, P.D., 2014. Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS Letters*, 588(8), pp.1423–1429.
- 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.
- 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.
- 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.
- Wilson, J.E., 2003. Review Isozymes of mammalian hexokinase : structure, subcellular localization and metabolic function. *The Journal of Experimental Biology*, 206, pp.2049–2057.