

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie živočichů

**Úloha proteinkinasy C a jejích cílových
proteinů v mechanismu kardioprotekce**

**The role of protein kinase C and its targets
in cardioprotection**

Autoreferát dizertační práce
Summary of Ph.D. Thesis



Školitel: Mgr. Markéta Hlaváčková, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Olga Nováková, CSc.

RNDr. Kristýna Holzerová

2016

OBSAH

ABSTRAKT	1
ABSTRACT	2
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK/LIST OF ABBREVIATIONS	3
ČESKÁ ČÁST	4
1 ÚVOD	4
2 HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE	4
3 METODIKA	7
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	8
4.1 Cíl 1: Analýza isoform PKC po adaptaci na intermitentní hypobarickou (IHH) a kontinuální normobarickou hypoxii (CNH)	8
4.2 Cíl 2: Analýza cílových proteinů PKC δ a PKC ϵ po adaptaci na IHH v souvislosti s apoptosou, dynamikou mitochondrií, autofagií, metabolismem sfingolipidů, odstraňováním toxických aldehydů a komunikací přes gap junctions	10
5 ZÁVĚR	14
ENGLISH PART	15
1 INTRODUCTION	15
2 HYPOTHESIS AND AIM OF THE STUDY	15
3 METHODS	18
4 RESULTS AND DISCUSSION	19
4.1 Analysis of the PKC isoforms after the adaptation to intermittent hypobaric (IHH) and continuous normobaric hypoxia (CNH).....	19
4.2 Analysis of PKC δ and PKC ϵ target proteins after the adaptation to IHH in connection with apoptosis, mitochondrial dynamics, autophagy, metabolism of sphingolipids, elimination of toxic aldehydes and communication through gap junctions.....	21
5 CONCLUSION	26
POUŽITÁ LITERATURA/REFERENCES	27
CURRICULUM VITAE	33
SEZNAM PUBLIKACÍ/LIST OF PUBLICATIONS	36

ABSTRAKT

Mortalita kardiovaskulárních onemocnění je stále vysoká a pravděpodobně bude mít v budoucnu tendenci se spíše zvyšovat. Přestože byla popsána řada způsobů, jak odolnost myokardu vůči ischemicko-reperfúznímu poškození zvýšit, minimum z nich bylo přeneseno do klinické praxe. Kardioprotektivní působení chronické hypoxie bylo popsáno již v 60. letech minulého století. Jeho detailní mechanismus nebyl doposud objasněn, ale byla identifikována řada komponent, které se zde uplatňují. Jednou z nich je proteinkinasa C (PKC). Úloha PKC byla podrobně popsána v mechanismu ischemického preconditioningu, její zapojení v mechanismu kardioprotekce vyvolané hypoxií však zůstává nejasné. Jedním z důvodů je množství isoform PKC, které mají mnohdy protichůdné účinky, a také různorodost používaných hypoxických modelů. V souvislosti s kardioprotekcí jsou nejčastěji zmiňovány isoformy PKC δ a PKC ϵ . Cílem mé práce bylo analyzovat změny těchto isoform PKC na dvou různých kardioprotektivních modelech hypoxie – intermitentní hypobarické (IHH) a kontinuální normobarické hypoxii (CNH). Zároveň jsme po adaptaci na IHH sledovali cílové proteiny PKC δ a PKC ϵ , které by mohly být do mechanismu kardioprotekce zapojeny. Jednalo se o proteiny spojené s apoptosou a autofagií, s dynamikou mitochondrií, odstraňováním toxických aldehydů, metabolismem sfingolipidů a signalizací přes gap junctions. Ukázali jsme, že zatímco adaptace na IHH vede k aktivaci PKC δ , adaptace na CNH vede naopak k aktivaci PKC ϵ . Použití inhibičního peptidu KP-1633 specifického pro PKC ϵ potvrdilo, že je tato isoforma pro kardioprotekci vyvolanou CNH klíčová. Analýza cílových proteinů PKC ukázala, že přestože vede IHH ke zvýšení proapoptotických proteinů rodiny Bcl-2, počet apoptotických buněk je nižší. Zároveň došlo k aktivaci autofagie, díky které by mohlo docházet k rychlejšímu odstranění poškozených organel, a mohla by tak představovat mechanismus, kterým vede IHH ke kardioprotekci. Objasnění signálních drah spojených s kardioprotekcí vyvolanou adaptací na chronickou hypoxii by mohlo pomoci při léčbě ischemických stavů.

ABSTRACT

The mortality of cardiovascular diseases remains high and it likely tends to increase in the future. Although many ways how to increase the resistance against myocardial ischemia-reperfusion damage have been described, few of them were transferred into clinical practice. Cardioprotective effect of chronic hypoxia has been described during 60s of the last century. Its detailed mechanism has not been elucidated, but a number of components has been identified. One of these components presents protein kinase C (PKC). The role of PKC was described in detail in the mechanism of ischemic preconditioning, but its involvement in the mechanism of cardioprotection induced by chronic hypoxia remains unclear. One reason is the amount of PKC isoforms, which have often contradictory effects, and the diversity of hypoxic models used. The most frequently mentioned isoforms in connection with cardioprotection are PKC δ and PKC ϵ . The aim of my thesis was to analyze changes in these PKC isoforms at two different cardioprotective models of hypoxia – intermittent hypobaric (IHH) and continuous normobaric hypoxia (CNH). We also examined the target proteins of PKC δ and PKC ϵ after the adaptation to IHH, which could be involved in the mechanism of cardioprotection. These included proteins associated with apoptosis and autophagy, mitochondrial dynamics, removal of toxic aldehydes, metabolism of sphingolipids and gap junctional communication. We have shown that while adaptation to IHH leads to PKC δ activation, the adaptation to CNH leads to activation of PKC ϵ . The use of PKC ϵ inhibitory peptide KP-1633 confirmed that PKC ϵ is a key isoform in cardioprotection induced by CNH. The analysis of PKC target proteins showed that although IHH led to an increase of proapoptotic proteins of Bcl-2 family, the number of apoptotic cells was lower. Simultaneously, the adaptation to IHH activated autophagy, through which it could lead to a faster removal of damaged organelles, and thus might contribute to of IHH-induced cardioprotection. Elucidation of signaling pathways associated with cardioprotection induced by adaptation to chronic hypoxia could help in the treatment of ischemic heart disease.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK/LIST OF ABBREVIATIONS

4-HNE	4-hydroxynonenal
ALDH2	aldehyddehydrogenasa 2
Bcl-2	z angl. <i>B-cell lymphoma 2</i>
BNIP3	z angl. <i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3</i>
CNH	kontinuální normobarická hypoxie
Cx43	konexin 43
Drp1	z angl. <i>dynamin-related protein 1</i>
FIO2	inspirační koncentrace kyslíku
HPRT1	hypoxantinguaninfosforibosyltransferasa 1
IHH	intermitentní hypobarická hypoxie
IR	ischemicko-reperfúzní
KP-1633	blokační peptid pro PKCε
LC3	z angl. <i>microtubule-associated protein B-light chain 3</i>
LDH	laktátdehydrogenasa
Mfn1,2	mitofusin 1, 2
MI	metabolická inhibice
PKC	proteinkinasa C
R	re-energizace
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDS	dodecylsulfát sodný
SPHK	sfingosinkinasa
TUNEL	z angl. <i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
XIAP	z angl. <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

ČESKÁ ČÁST

1 ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění představují ve vyspělých zemích nejčastější příčinu úmrtí. I přes pokrok ve výzkumu vedoucí ke snížení mortality a morbidit těchto chorob bude podle odhadů Světové zdravotnické organizace jejich výskyt v budoucnosti spíše růst (WHO 2014). Byla popsána řada způsobů, jak zvýšit odolnost myokardu vůči ischemicko-reperfučnímu (IR) poškození, jedním z nich je adaptace na chronickou hypoxii.

Adaptace na chronickou hypoxii má kardioprotektivní účinky (Asemu 2000, Neckář 2005). Detailní mechanismus jejího působení nebyl doposud objasněn. Byla však identifikována řada signálních molekul a komponent, které se zde uplatňují. Jednou z nich je proteinkinasa C (PKC).

2 HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE

Obecný inhibitor PKC chelerytrin kompletně ruší kardioprotekci vyvolanou adaptací na intermitentní hypobarickou hypoxii (IHH), zatímco selektivní inhibitor PKC δ rottlerin vede k jejímu snížení (Neckář 2005). Není proto možné vyloučit uplatnění ostatních isoform PKC (PKC α a PKC ϵ) běžně spojovaných s kardioprotekcí vyvolanou ischemickým preconditioningem. Kardioprotektivní účinky byly pozorovány i na modelu kontinuální normobarické hypoxie (CNH) (Kašparová 2015, Neckář 2013). PKC doposud nebyla po adaptaci na CNH analyzována, výsledky ostatních studií však naznačují, že konkrétní model hypoxie může mít na expresi jednotlivých isoform PKC podstatný vliv. Je známo, že aktivita PKC je ovlivněna nejen změnami v proteinovém množství, ale také fosforylací enzymu a jeho translokací do konkrétních buněčných kompartmentů. PKC fosforyluje a tedy reguluje řadu cílových proteinů zapojených v apoptose a autofagii, dynamice mitochondrií, metabolismu sfingolipidů, odstraňování toxických aldehydů, nebo komunikaci přes gap junctions. Bylo zjištěno, že mnoho z nich se uplatňuje v mechanismu kardioprotekce vyvolané ischemickým preconditioningem. Jejich zapojení v mechanismu kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií však doposud nebylo objasněno. Zdá se však, že oba tyto protektivní přístupy sdílejí podobné signální dráhy, jelikož kombinace chronické hypoxie a ischemického preconditioningu nevede k prohloubení kardioprotekce (Neckář 2002).

Na základě výše uvedených údajů předpokládáme, že:

- exprese jednotlivých isoform PKC v myokardu je ovlivněna konkrétním modelem chronické hypoxie a u adaptace na IHH a CNH se proto může lišit
- aktivita PKC není závislá jen na změnách proteinového množství, ale i na fosforylaci či translokaci enzymu do jednotlivých kompartmentů
- v kardioprotekci vyvolané adaptací na CNH hraje klíčovou roli PKC ϵ
- cílovými proteiny PKC v chronicky hypoxickém myokardu by mohly být proteiny regulující apoptosu a autofagii, dynamiku mitochondrií, metabolismus sfingolipidů, odstraňování toxických aldehydů, nebo komunikaci přes gap junctions, které jsou spojovány s mechanismem kardioprotekce vyvolané ischemickým preconditioningem

Ve své práci jsem si proto stanovila tyto cíle:

Cíl 1: Analýza isoform PKC po adaptaci na intermitentní hypobarickou (IHH) a kontinuální normobarickou hypoxii (CNH)

■ po adaptaci na IHH stanovit

- PKC α , PKC δ , PKC ϵ a jejich fosforylované formy na úrovni proteinu
- PKC α , PKC δ , PKC ϵ na úrovni mRNA

■ po adaptaci na CNH stanovit

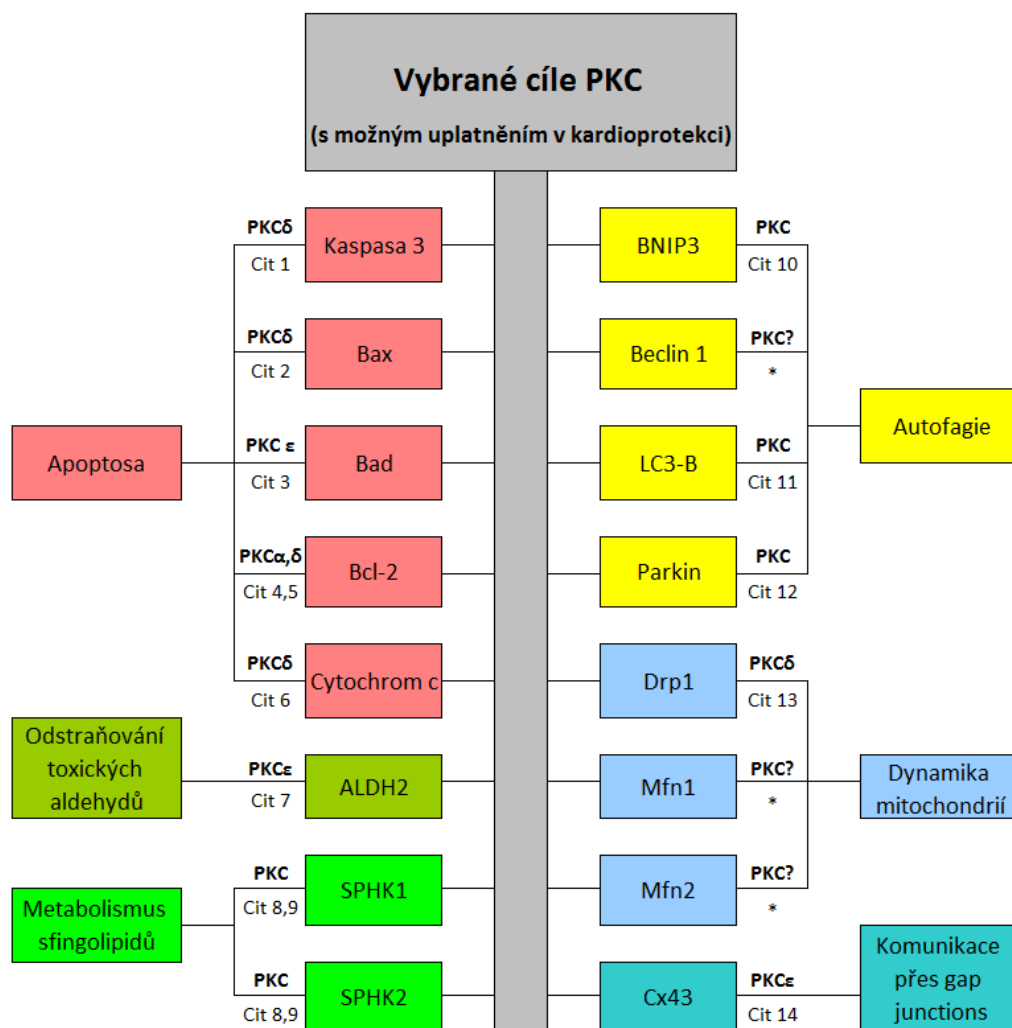
- PKC δ , PKC ϵ a jejich fosforylované formy na úrovni proteinu
- PKC δ a PKC ϵ na úrovni mRNA
- vliv inhibičního peptidu PKC ϵ KP-1633 na viabilitu a uvolnění LDH na kardiomyocytech izolovaných z myokardu levé komory

Cíl 2: Analýza cílových proteinů PKC δ a PKC ϵ po adaptaci na IHH

■ po adaptaci na IHH stanovit

- cílové proteiny PKC δ a PKC ϵ (shrnutí na obr. 1) v souvislosti s:
 - apoptosou – Bad, Bax, Bcl-2, kaspasa 3, cytochrom *c*
 - dynamikou mitochondrií – Drp1, Mfn1, Mfn2
 - autofagií – Beclin 1, LC3-B, BNIP3, Parkin

- metabolismem sfingolipidů – SPHK1, SPHK2
- odstraňováním toxických aldehydů – ALDH2
- komunikací přes gap junctions – Cx43
- apoptosu metodou TUNEL



Obr. 1: Vybrané cílové proteiny PKC uplatňující se v kardioprotekci.

U cílových proteinů jsou uvedeny konkrétní isoformy PKC, které daný protein fosforylují. * – tyto proteiny nebyly dosud identifikovány jako cílové proteiny PKC. ALDH2 – aldehyddehydrogenasa 2, Bcl-2 – *B-cell lymphoma 2*, BNIP3 – *BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3*, Cx43 – konexin 43, Drp1 – *dynamin-related protein 1*, LC3-B – *microtubule-associated protein B-light chain 3*, Mfn1 – mitofusin 1, Mfn2 – mitofusin 2, SPHK1 – sfingosinkinasa 1, SPHK2 – sfingosinkinasa 2, XIAP – *X-linked inhibitor of apoptosis protein*.

Použité citace: cit 1 – Voss 2005, cit 2 – Bertolotto 2000, cit 3 – Sitailo 2004, cit 4 – Chen 2009, cit 5 – Ruvolo 1998, cit 6 – Majumder 2000, cit 7 – Chen 2008, cit 8 – Hait 2007, cit 9 – Johnson 2002, cit 10 – Graham 2007, cit 11 – Jiang 2010, cit 12 – Sato 2006, cit 13 – Qi 2011, cit 14 – Lampe 2000.

3 METODIKA

K experimentům byli použiti dospělí samci laboratorního potkana kmene Wistar. Studie byla vedena ve shodě se zákonem na ochranu zvířat proti týrání „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” publikovaným *US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996)* a byla schválena příslušnou komisí Fyziologického ústavu AV ČR.

Experimentální modely chronické hypoxie

K pokusům byly používány dva základní modely chronické hypoxie:

intermitentní hypobarická hypoxie (IHH) – adaptace 8 hod/den, 5 dnů/týden, 5 týdnů, 7000 m; $PO_2=8,6$ kPa.

kontinuální normobarická hypoxie (CNH) – adaptace nepřetržitě 3 týdny, $FIO_2=0,1$.

Zvířata kontrolních skupin byla chována v normoxických podmínkách odpovídajících nadmořské výšce 200 m.

Frakcionace tkáně a metoda Western blot

Myokard levé komory byl homogenizován pod kapalným dusíkem a frakcionován na partikulární a cytosolickou frakci. Relativní zastoupení stanovovaných proteinů bylo analyzováno metodou Western blot na 10% bis-akrylamidových gelech v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS).

Izolace RNA a real time RT-PCR

Celková buněčná RNA byla z myokardu levých komor izolována Trizolem. Expres mRNA byla analyzována pomocí Real-time PCR (Light Cycler 480, dual hydrolysis probe). Hodnota analyzovaných transkriptů byla normalizována na hladinu referenčního genu hypoxantinguaninfosforibosyltransferasy 1 (Hprt1).

Metoda Tunel

Metoda Tunel (z angl. *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) byla provedena dle pokynů výrobce pomocí komerční soupravy In Situ Cell Death Detection

Kit, Fluorescein na řezech myokardu o tloušťce 7 μm . Preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu. Výsledný počet Tunel-pozitivních buněk byl vztažen k celkové ploše myokardu levé komory (případně pravé komory či septa).

Stanovení buněčné viability a uvolnění laktátdehydrogenasy po simulované ischemii/reperfúzi a vliv inhibičního peptidu PKC ϵ KP-1633

Kardiomyocyty izolované z myokardu levé komory byly inkubovány s inhibičním peptidem PKC ϵ KP-1633 a vystaveny metabolické inhibici (MI) a re-energizaci (MI/R). Buněčná viabilita a uvolnění laktátdehydrogenasy (LDH) byly měřeny na začátku experimentu, po MI a po re-energizaci. Toto stanovení bylo provedeno Dr. Hlaváčkovou.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Cíl 1: Analýza isoform PKC po adaptaci na intermitentní hypobarickou (IHH) a kontinuální normobarickou hypoxii (CNH)

Vliv IHH na PKC

Adaptace na IHH zvýšila množství celkové PKC δ , což je v souladu s našimi předchozími studii (Kolář 2007, Neckář 2005), i s prací Dinga a spol. na podobném modelu intermitentní hypoxie (5000 m, 6 hod/den, 42 dnů) (Ding 2004). Nově jsme ukázali, že roste i fosforylace PKC δ na Ser643 a pomocí imunofluorescenční analýzy zjistili, že IHH vede k translokaci PKC δ na mitochondriální a sarkolemální membrány (Hlaváčková 2010), což je považováno za znaky aktivace enzymu. Bylo zjištěno, že množství PKC δ v partikulární frakci negativně koreluje s velikostí infarktu myokardu (Hlaváčková 2007) a že inhibitor PKC δ rottlerin částečně ruší sníženou velikost infarktu myokardu pozorovanou po adaptaci na IHH (Neckář 2005). Současná studie ukázala, že rottlerin potlačil i translokaci PKC δ na sarkolemální a mitochondriální membrány (Hlaváčková 2010). Zároveň bylo zjištěno, že po adaptaci na IHH dochází ke zvýšené tvorbě nitrotyrosinu (Hlaváčková 2010). To je v souladu s našimi předchozími studii, které ukázaly, že adaptace na IHH vede ke zvýšené tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS) (Kolář 2007). Výsledky analýz ukazují, že pro kardioprotekci vyvolanou IHH má PKC δ klíčovou roli. Přesto je přesné zapojení PKC δ v kardioprotekci kontroverzní, některé studie ukazují její pozitivní, jiné negativní vliv na IR

poškození. Podstatnou roli ve výsledném účinku hraje pravděpodobně načasování aktivace enzymu (Inagaki 2003, 2005, Murriel 2004).

Adaptace na IHH snížila množství PKC ϵ v homogenátu a neovlivnila množství fosforylované PKC ϵ (Ser729). Došlo však k nárůstu poměru fosforylovaná vs. celková PKC ϵ v homogenátu a cytosolu. Zdá se tedy, že po adaptaci na IHH je v srdci zvýšené zastoupení fosforylované, tedy aktivní PKC ϵ . Nárůst fosforylace PKC ϵ pozorovali i Raffie a spol. u neonatálních králíků po adaptaci na CNH (10% O₂, 10 dnů) (Raffie 2002). V souladu s našimi výsledky je i studie Wanga a spol., kde byl po adaptaci na IHH (PO₂=11,2 kPa, 4 hod/den, 4 týdny) zjištěn zvýšený poměr fosforylované vs. celkové PKC ϵ (Wang 2011). Úlohu PKC ϵ ve zvýšené odolnosti vůči IR poškození vyvolané hypoxií jsme zkoumali také na izolovaných kardiomyocytech pomocí inhibitoru KP-1633 specifického pro PKC ϵ . Získané výsledky ukázaly, že podání KP-1633 neovlivnilo kardioprotektivní účinek hypoxie (Hlaváčková nepublikovaná data). Výsledky našich dřívějších studií (Hlaváčková 2007, Kolář 2007), stejně tak jako současných, naznačují, že v mechanismu kardioprotekce vyvolané adaptací na IHH nehraje PKC ϵ klíčovou roli.

Adaptace na IHH zvýšila množství celkové i fosforylované (Thr497) PKC α . PKC α fosforyluje řadu proteinů potenciálně zapojených v signálních drahách vedoucích k protekci. Jedním z nich je např. antiapoptotický protein Bcl-2 (z angl. *B-cell lymphoma 2*), jehož fosforylace na Ser70 vede k aktivaci jeho antiapoptotické funkce (Ruvolo 1998). Pozorovaná aktivace PKC α po adaptaci na IHH by tak mohla přispívat k protekci snížením apoptosy.

Vliv CNH na PKC

Adaptace na CNH snížila množství celkové PKC δ , což naznačuje deaktivaci enzymu. Na druhou stranu však došlo k nárůstu exprese PKC δ mRNA. Zdá se proto, že za podmínek CNH se zvyšuje turnover/degradace PKC δ . Pokles proteinového množství PKC δ v této studii by mohl znamenat rychlejší degradaci enzymu poté, co vykonal svou funkci. Zapojení PKC δ v signálních drahách kardioprotekce vyvolané CNH proto nelze zcela vyloučit. Pozorované změny proteinového množství PKC δ mají zcela opačný trend než v případě IHH, kde je aktivace PKC δ pro kardioprotekci klíčová (Neckář 2005). Přestože zapojení PKC δ v kardioprotekci potvrdily i některé studie na ischemickém (Mayr 2004) či farmakologickém preconditioningu (Fryer 2001), mnoho publikací spojuje aktivaci PKC δ spíše s negativním působením na IR, a to většinou v souvislosti s nadměrnou produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) a aktivací apoptotické buněčné smrti (Murriel 2004, Sivaraman 2009).

Adaptace na CNH zvýšila množství PKC ϵ v partikulární frakci a expresi PKC ϵ mRNA v homogenátu. Aplikace specifického inhibičního peptidu PKC ϵ KP-1633, který brání asociaci PKC ϵ se svým kotvícím proteinem RACK2 (Mackay 2001, Mochly-Rosen 1995, Souroujon 1998), ukázala, že KP-1633 zcela ruší zvýšenou viabilitu kardiomyocytů a pokles uvolnění LDH během re-energizace pozorovaný po adaptaci na CNH. Získané výsledky jsou v souladu s dalšími studiemi, které poukazují na zapojení PKC ϵ do kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií (Rafiee 2002, Wang 2011, Xue 2009).

Přestože adaptace na CNH stejně jako na IHH snižuje velikost infarktu (Neckář 2013), snižuje uvolnění LDH a zvyšuje viabilitu kardiomyocytů vystavených I/R (Borchert 2011, Neckář 2013), účinky obou modelů na expresi PKC jsou protichůdné. V kardiomyocytech však byla opakovaně popsána vzájemná regulace mezi PKC δ a PKC ϵ (Mayr 2009, Rybin 2003, 2007), takže snížená funkce jedné isoformy se může kompenzovat funkcí druhé.

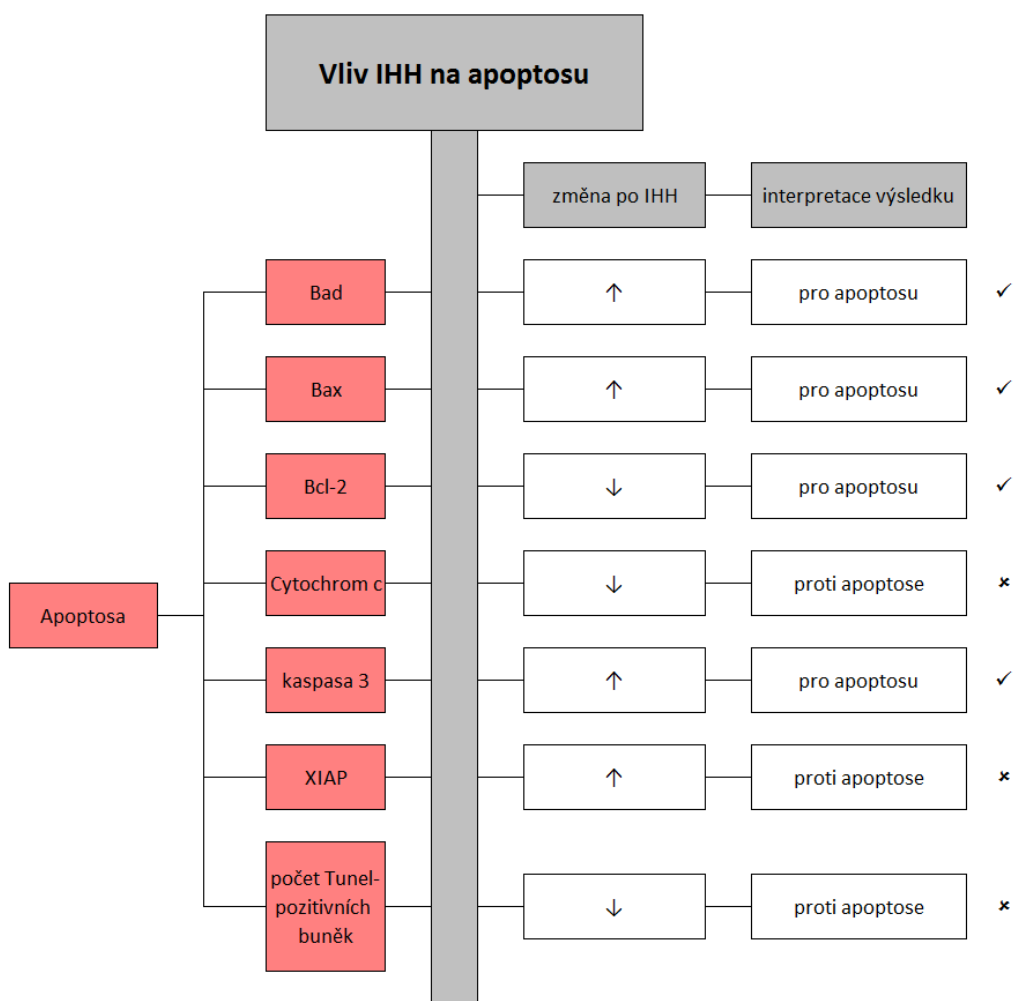
Výsledky získané na modelech IHH a CNH podporují představu, že PKC δ či PKC ϵ (popř. obě) jsou důležitými hráči mechanismu kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií. IHH představuje výrazně větší zátěž a je spojena s mechanismy poslední záchrany a aktivací PKC δ . CNH je mírnější a je spojena naopak s aktivací PKC ϵ . Dalším cílem mé práce proto bylo stanovit cílové proteiny těchto isoform a to v souvislosti s apoptosou, dynamikou mitochondrií, autofagií, metabolismem sfingolipidů, odstraňováním toxických aldehydů a komunikací přes gap junctions.

4.2 Cíl 2: Analýza cílových proteinů PKC δ a PKC ϵ po adaptaci na IHH v souvislosti s apoptosou, dynamikou mitochondrií, autofagií, metabolismem sfingolipidů, odstraňováním toxických aldehydů a komunikací přes gap junctions

Vliv IHH na apoptosu

Adaptace na IHH zvýšila množství proapoptotických proteinů Bad a Bax a zároveň snížila množství antiapoptotického proteinu Bcl-2. Významně klesly i poměry Bcl-2/Bad a Bcl-2/Bax, které se běžně používají ke kvantifikaci apoptosy, protože její aktivace/deaktivace je závislá na rovnováze mezi pro- a antiapoptotickými členy rodiny Bcl-2. Nárůst Bad a pokles Bcl-2 po hypoxii (12% O₂, 2 týdny) pozorovali i Lee a spol. (Lee 2006). Analýza množství apoptotických buněk však ukázala, že po IHH dochází ke snížení počtu Tunel-pozitivních buněk. Snížení apoptosy měřeno počtem Tunel-pozitivních buněk po hypoxii (6 hod/den, 5000 m, 42 dnů) pozorovali i Dong a spol. (Dong 2003). Za účelem

objasnění vlivu IHH na apoptosu jsme se proto rozhodli stanovit další markery apoptosy – uvolnění cytochromu *c* do cytosolu, aktivní kaspasu 3 a její inhibitor XIAP (z angl. *X-linked inhibitor of apoptosis protein*). Ukázalo se, že po IHH dochází ke sníženému uvolnění cytochromu *c* do cytosolu, nárůstu množství aktivní kaspasy 3, ale také jejího inhibitoru XIAP. Získané výsledky naznačují, že adaptace na IHH sice vede k aktivaci proapoptotických a deaktivaci antiapoptotických proteinů rodiny Bcl-2, ale zároveň také k poklesu počtu Tunel-pozitivních buněk, což je znakem deaktivace apoptosy. Snížení apoptosy je v souladu s kardioprotektivním působením IHH. Získané výsledky jsou shrnuty na obr. 2.



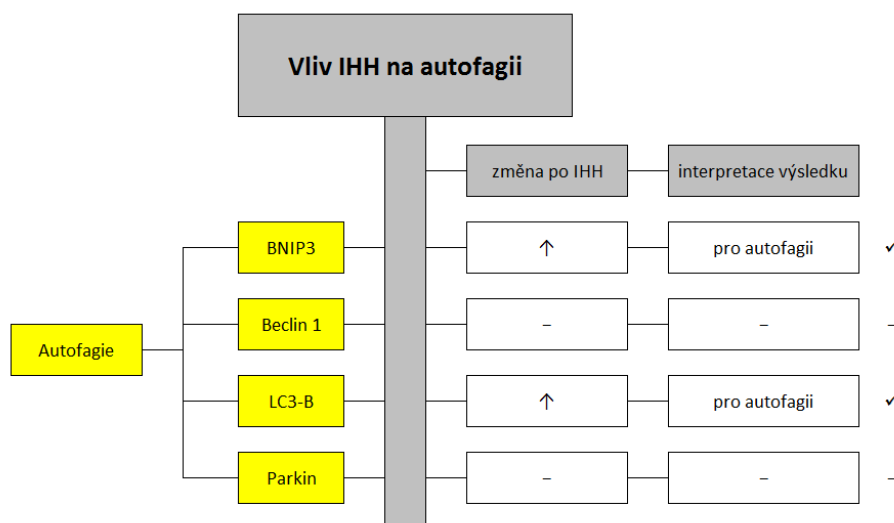
Obr. 2: Vliv IHH na proteiny spojené s apoptosou.

Vliv IHH na dynamiku mitochondrií

Analýza proteinů mitochondriálního štěpení Drp1 (z angl. *dynamamin-related protein 1*) a mitochondriální fúze Mfn1 a Mfn2 (mitofusin 1 a 2) ukázala, že adaptace na IHH neovlivňuje tyto klíčové proteiny regulující dynamiku mitochondrií.

Vliv IHH na autofagii

Autofagie s apoptosou úzce souvisí a řada proteinů uplatňujících se v regulaci apoptosy má svou roli i v autofagii. Dalším cílem mé práce proto bylo stanovit po adaptaci na IHH proteiny zapojené v mechanismu autofagie. Adaptace na IHH neovlivnila množství Beclinu 1 účastnícího se počáteční fáze tvorby autofagosomů, ani Parkinu zapojeného do mitofagie, ale zvýšila množství proteinů BNIP3 (z angl. *BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3*) a LC3-B (z angl. *microtubule-associated protein B-light chain 3*). Bylo zjištěno, že zvýšená exprese BNIP3 vede k autofagii a že působí protektivně, protože snižuje produkci ROS (Zhang 2008). Zároveň také zabraňuje interakci mezi Bcl-2 a Beclinem 1, a aktivuje tak autofagii (Belot 2009). Nárůst BNIP3 po chronické hypoxii (12% O₂, 16 hod/den, 4 a 8 týdnů) pozorovali i Lee a spol. (Lee 2007). Adaptace na IHH vedla k nárůstu markeru autofagosomů LC3-B. Nárůst LC3-B po hypoxii na modelu spánkové apnoe pozorovali i Maeda a spol. (Maeda 2013). Zvýšená autofagie by mohla vést k selektivnímu odstranění poškozených mitochondrií (Kim 2007) a bránit tak uvolnění proapoptotických faktorů jako je cytochrom *c* (Hamacher-Brady 2007), což by mohlo představovat jeden z mechanismů zvýšené tolerance hypoxických srdcí vůči IR poškození. Získané výsledky jsou shrnuty na obr. 3.



Obr. 3: Vliv IHH na proteiny spojené s autofagií.

Vliv IHH na metabolismus sfingolipidů

Adaptace na IHH snížila množství sfingosinkinasy 1 (SPHK1) a neovlivnila množství sfingosinkinasy 2 (SPHK2). SPHK jsou enzymy zodpovědné za tvorbu sfingosin-1-fosfátu. Bylo zjištěno, že poměr sfingosin-1-fosfátu a ceramidu ovlivňuje buněčné přežití a jeho zvýšení působí proti apoptose (Cuvillier 1996). SPHK1 je obecně vnímána jako protektivní (Taha 2006). SPHK2 byla až donedávna považována za proapoptotickou (Maceyka 2005). Tento pohled byl však vyvrácen studii na izolovaných myších srdcích s delecí genu pro SPHK2, kde se ukázalo, že SPHK2 je nezbytná pro vyvolání ischemického pre- i postconditioningu (Vessey 2011, 2013). I přes pozorovaný pokles SPHK1 mohla být její funkce vyvážena SPHK2 a nedošlo tak k negativním projevům tohoto snížení.

Vliv IHH na ALDH2

Adaptace na IHH vedla ke snížení množství aldehyddehydrogenasy 2 (ALDH2). Tento výsledek je v rozporu s představou o kardioprotektivním působením ALDH2 (Chen 2008). Naproti tomu se ukázalo, že koncentrace 4-hydroxynonenalu (4-HNE) ovlivňuje aktivitu PKC, která je pro v kardioprotekci klíčová. Zatímco nízká koncentrace (0,1 μM) 4-HNE deaktivovala PKC δ , vyšší koncentrace (1-10 μM) vedla k její aktivaci (Poli 2008). Zdá se proto, že určitá hladina aldehydů může fungovat jako druhý posel a může vyvolávat antioxidační obranu odpověď aktivovanou stresem, podobně jako je tomu v případě ROS (Poli 2008). Zároveň bylo zjištěno, že ALDH2 je fosforylována pomocí PKC ϵ a že tato fosforylace vede k nárůstu katalytické aktivity ALDH2 (Chen 2008, Churchill 2009). Pokles PKC ϵ a ALDH2 pozorovaný po IHH by mohl prostřednictvím 4-HNE hrát roli v aktivaci PKC δ , která je pro kardioprotekci u tohoto typu hypoxie nezbytná.

Vliv IHH na Cx43

Po adaptaci na IHH došlo k nárůstu celkové i fosforylované formy (Ser368) konexinu 43 (Cx43). Waza a spol. na modelu akutní hypoxie (1% O₂, 12 hod) ukázali zvýšenou fosforylaci Cx43 na Ser262, která má na Cx43 obdobný vliv jako fosforylace na Ser368 (Waza 2014). Fosforylace na Ser368 (popř. Ser262) zprostředkovaná PKC ϵ vede ke snížené komunikaci přes gap junctions (Ek-Vitorin 2006, Lampe 2000). Přestože např. u infarktu myokardu zhoršuje snížená komunikace přes gap junctions vedení elektrických impulzů a zvyšuje tak riziko výskytu arytmií (Dhein 2006), za určitých podmínek působí protektivně. Uzavření gap junctions může bránit šíření škodlivých metabolitů (H₂O₂, superoxidový anion) a také přetížení Ca²⁺, ke kterým běžně dochází během IR. Sníží se tak poškození okolních

buněk, buňky jsou chráněny před tzv. polibkem smrti (Andrade-Rozental 2000). Cx43 zároveň funguje nezávisle na své roli v buněčné komunikaci jako podstatná složka signálních drah kardioprotekce. Bylo zjištěno, že kardioprotektivní účinek ischemického preconditioningu je potlačen na izolovaných kardiomyocytech myši s delecí genu pro Cx43 (Li 2004, Rodriguez-Sinovas 2009). Waza a spol. ukázali, že Cx43 fosforylovaný pomocí PKC ϵ interaguje s podjednotkou Kir6.1 K_{ATP} kanálů a že tato interakce snižuje buněčnou smrt (Waza 2014). Signální dráha PKC ϵ -Cx43- Kir6.1 K_{ATP} kanály by tak mohla představovat mechanismus, kterým chronická hypoxie vede ke zvýšené odolnosti srdce vůči IR poškození.

5 ZÁVĚR

Cíl 1: Analýza isoform PKC po adaptaci na intermitentní hypobarickou (IHH) a kontinuální normobarickou hypoxii (CNH)

Analýza isoform PKC po adaptaci na dva různé modely chronické hypoxie potvrdila, že konkrétní model hypoxie má na změny v množství PKC podstatný vliv. Ukázalo se, že adaptace na IHH vede k nárůstu celkové i fosforylované PKC δ a PKC α a k poklesu PKC ϵ . IHH představuje výrazně větší zátěž než CNH a je spojena s mechanismy poslední záchrany a aktivací PKC δ . Získané výsledky potvrdily naše dřívější studie poukazující na význam PKC δ v kardioprotekci vyvolané IHH.

Adaptace na mírnější model CNH vedla naopak k nárůstu PKC ϵ v partikulární frakci a nárůstu PKC ϵ mRNA. Podání inhibičního peptidu PKC ϵ KP-1633 zrušilo kardioprotekci a potvrdilo tak hypotézu, že PKC ϵ hraje u tohoto modelu hypoxie klíčovou roli.

Cíl 2: Analýza cílových proteinů PKC δ a PKC ϵ po adaptaci na IHH

Analýza cílových proteinů PKC δ a PKC ϵ po adaptaci na IHH ukázala, že se zvyšují proapoptotické a snižují antiapoptotické proteiny rodiny Bcl-2, ale zároveň se snižuje počet apoptotických buněk v myokardu levé komory. Snižovaná apoptosa je v souladu s kardioprotektivním působením IHH. Zároveň jsme zjistili, že dochází k aktivaci autofagie přes BNIP3 a LC3-B. Zvýšená autofagie by mohla přispívat ke kardioprotekci díky rychlejšímu odstraňování poškozených organel. Přestože byla v mechanismu ischemického preconditioningu popsána úloha řady cílových proteinů PKC spojených s metabolismem sfingolipidů, dynamikou mitochondrií či odstraňováním toxických aldehydů, zdá se, že v mechanismu kardioprotekce vyvolané adaptací na IHH se tyto proteiny neuplatňují.

ENGLISH PART

1 INTRODUCTION

Cardiovascular diseases represent the most common cause of death in developed countries. Despite advances in research leading to reduced mortality and morbidity of these diseases, according to the World Health Organization their occurrence will grow in the future (WHO 2014). It has been described a number of ways to increase the resistance against myocardial ischemia-reperfusion (IR) injury, one of which is the adaptation to chronic hypoxia.

Adaptation to chronic hypoxia has cardioprotective effects (Asemu 2000, Neckář 2005). Its detailed mechanism has not been elucidated, however, a number of signaling molecules and components has been identified to be applied. One of these is the protein kinase C (PKC).

2 HYPOTHESIS AND AIM OF THE STUDY

It has been shown that general PKC inhibitor chelerythrine completely abolished the cardioprotection induced by adaptation to intermittent hypobaric hypoxia (IHH) and selective PKC δ inhibitor rottlerin led to its reduction (Neckář 2005). It is therefore not possible to exclude the involvement of other PKC isoforms (PKC α and PKC ϵ) commonly associated with cardioprotection induced by ischemic preconditioning. The cardioprotective effect was also observed on the model of continuous normobaric hypoxia (CNH) (Kašparová 2015, Neckář 2013). PKC has not yet been analyzed after the adaptation to CNH, but according to results of other studies, particular hypoxic model may significantly influence the expression of individual PKC isoforms. It is known that the activity of PKC is affected not only by changes in the protein quantity, but also by phosphorylation and translocation of PKC into specific cellular compartments. PKC phosphorylates and thereby regulates a number of target proteins involved in apoptosis and autophagy, dynamics of mitochondria, metabolism of sphingolipids, removal of toxic aldehydes or communication via gap junctions. It has been found that a lot of these target proteins are applied in the mechanism of cardioprotection induced by ischemic preconditioning. Their involvement in the mechanism of cardioprotection induced by chronic hypoxia has not been clarified. However, it appears that both of these protective approaches share similar signaling pathways, since combination of

chronic hypoxia and ischemic preconditioning did not lead to additive cardioprotection (Neckář 2002).

Based on the above data, we assume that:

- expression of individual PKC isoforms in the myocardium is affected by particular model of chronic hypoxia and thus may vary after the adaptation to IHH and CNH
- PKC activity depends not only on changes in protein quantity, but also on phosphorylation or translocation of the enzyme into individual compartments
- PKC ϵ plays a key role in cardioprotection induced by adaptation to CNH
- PKC target proteins in chronically hypoxic myocardium could be proteins regulating apoptosis and autophagy, mitochondrial dynamics, sphingolipid metabolism, removal of toxic aldehydes or communication via gap junctions, which are associated with the mechanism of cardioprotection induced by ischemic preconditioning

I have therefore set the following objectives in my work:

Objective 1: Analysis of PKC isoforms after the adaptation to intermittent hypobaric (IHH) and continuous normobaric hypoxia (CNH)

- **after the adaptation to IHH analyze**
 - PKC α , PKC δ , PKC ϵ and their phosphorylated forms at the protein level
 - PKC α , PKC δ , PKC ϵ at the mRNA level
- **after the adaptation to CNH analyze**
 - PKC δ , PKC ϵ and their phosphorylated forms at the protein level
 - PKC δ and PKC ϵ at the mRNA level
 - effect of PKC ϵ inhibitory peptide KP-1633 on cell viability and LDH release on cardiomyocytes isolated from the left ventricle myocardium

Objective 2: Analysis of PKC δ and PKC ϵ target proteins after the adaptation to IHH

- **after the adaptation to IHH analyze**

- PKC δ and PKC ϵ target proteins (summarized in Fig. 4) in connection with:
 - apoptosis - Bad, Bax, Bcl-2, caspase 3, cytochrome *c*
 - dynamics of mitochondria - Drp1, Mfn1, Mfn2
 - autophagy - Beclin 1, LC3-B, BNIP3, Parkin
 - sphingolipid metabolism - SPHK1, SPHK2
 - removing of toxic aldehydes - ALDH2
 - communication via gap junctions - Cx43
 - apoptosis by TUNEL method

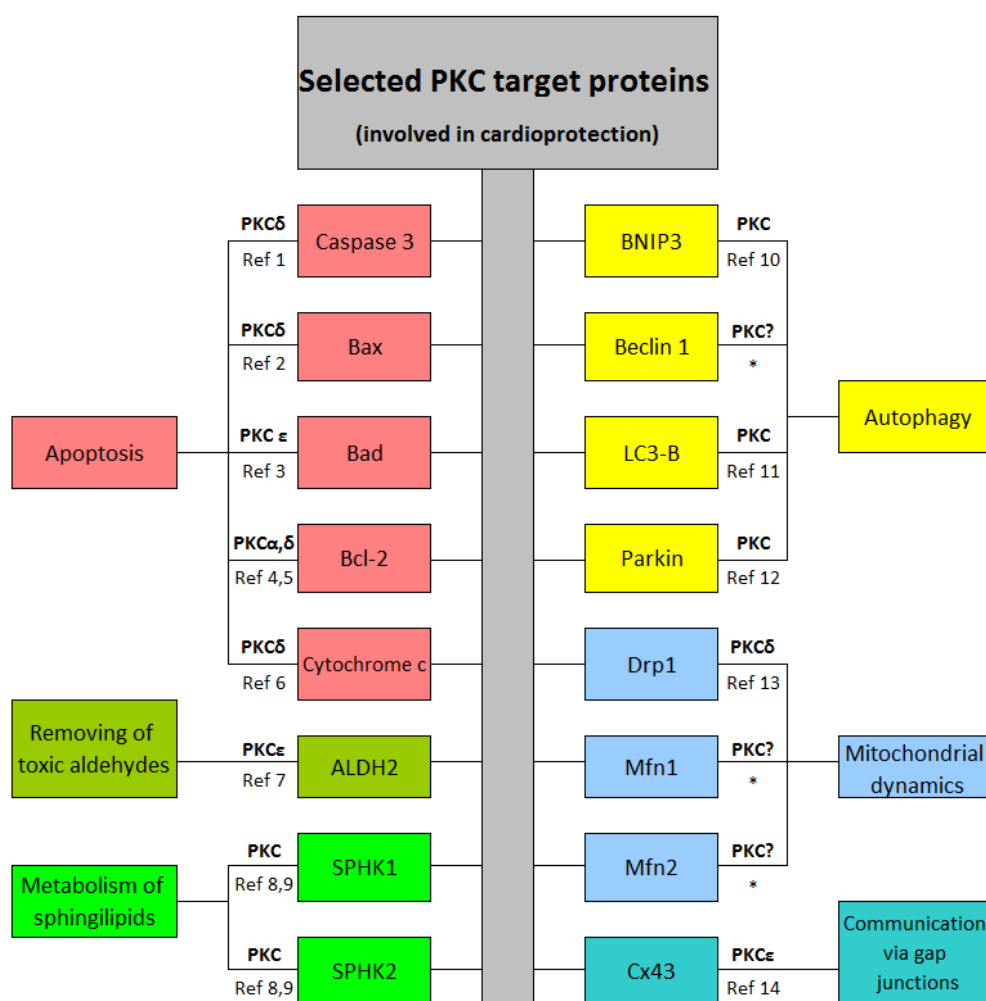


Fig. 4: Selected PKC target proteins involved in cardioprotection.

Specific PKC isoforms phosphorylating individual target proteins are shown. * – these proteins have not been identified as PKC target proteins. ALDH2 – aldehyde dehydrogenase 2, Bcl-2 – B-cell lymphoma 2, BNIP3 – BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3, Cx43 – connexin 43, Drp1 – dynamin-related protein 1, LC3-B – microtubule-associated protein B-light chain 3, Mfn1 – mitofusin 1, Mfn2 – mitofusin 2, SPHK1 – sphingosine kinase 1, SPHK2 – sphingosine kinase 2, XIAP – X-linked inhibitor of apoptosis protein. References: ref 1 – Voss, 2005, ref 2 – Bertolotto 2000, ref 3 – Sitailo 2004, ref 4 – Chen 2009, ref 5 – Ruvolo 1998, ref 6 – Majumder 2000, ref 7 – Chen 2008, ref 8 – Hait 2007, ref 9 – Johnson 2002, ref 10 – Graham 2007, ref 11 – Jiang 2010, ref 12 – Sato 2006, ref 13 – Qi 2011, ref 14 – Lampe 2000.

3 METHODS

Adult male Wistar rats were used for the experiments. The study was conducted in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and was approved by the Animal Care and Use Committee of the Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic.

Experimental models of chronic hypoxia

Two models of chronic hypoxia were used:

intermittent hypobaric hypoxia (IHH) – adaptation 8 hours/day, 5 days/week, 5 weeks, 7000 m; $PO_2=8.6$ kPa.

normobaric continuous hypoxia (CNH) – adaptation 3 weeks continuously, $FIO_2=0.1$.

Control group was kept under normoxic conditions corresponding to altitude of 200 m.

Tissue fractionation and Western blot analysis

Left ventricles were homogenized under liquid nitrogen and fractionated into cytosolic and particulate fractions. Determined relative abundance of proteins was analyzed by Western blotting at 10% bis-acrylamide gels in the environment of sodium dodecyl sulfate (SDS).

RNA isolation and Real time RT-PCR

Total cellular RNA from the left ventricles was isolated by Trizol. mRNA expression was analyzed by Real-time PCR (Light Cycler 480, dual probe hydrolysis). The value of the analyzed transcripts was normalized to the level of the reference gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Hprt1).

TUNEL

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) was performed according to manufacturer's instructions using commercial kits In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein on myocardial 7 μ m thin slices. The samples were analyzed using a

fluorescence microscope. Resulting number of Tunel-positive cells was related to the total area of the left ventricle (or the right ventricle or septum).

Determination of cell viability and lactate dehydrogenase release after simulated ischemia/reperfusion and the effect of PKC ϵ inhibitory peptide KP-1633

Cardiomyocytes isolated from the left ventricles were incubated with PKC ϵ inhibitory peptide KP-1633 and exposed to metabolic inhibition (MI) and re-energization (MI/R). Cell viability and release of lactate dehydrogenase (LDH) were measured at baseline, after the MI and after the re-energization. This analysis was made by Dr. Hlaváčková.

4 RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Analysis of the PKC isoforms after the adaptation to intermittent hypobaric (IHH) and continuous normobaric hypoxia (CNH)

Effect of IHH on PKC

The adaptation to IHH increased the amount of total PKC δ in the left ventricle myocardium, which is consistent with our previous studies (Kolář 2007, Neckář 2005) and with the work of Ding et al. at a similar model of intermittent hypoxia (5000 m, 6 h/day, 42 days) (Ding 2004). Recently, we showed increased PKC δ phosphorylation on Ser643 and with the use of fluorescent analysis found that IHH led to translocation of PKC δ to mitochondrial and sarcolemmal membranes (Hlaváčková 2010), which is considered as a sign of enzyme's activation. It was found that the amount of PKC δ in particulate fraction negatively correlates with the size of myocardial infarction (Hlaváčková 2007) and that the inhibitor of PKC δ rottlerin partially suppress reduced myocardial infarct size observed after the adaptation to IHH (Neckář 2005). The present study showed that rottlerin suppressed the translocation of PKC δ to sarcolemmal and mitochondrial membranes (Hlaváčková 2010). It was also found that the adaptation to IHH led to increased formation of nitrotyrosine (Hlaváčková 2010), which is consistent with our previous studies showing increased formation of ROS after the adaptation to IHH (Kolář 2007). The results of analyzes revealed that PKC δ plays a key role in cardioprotection induced by IHH. However, the precise involvement of PKC δ in cardioprotection remains controversial, some studies show positive,

some negative influence on IR injury. The timing of enzyme's activation seems to play a significant role in its resulting effect (Inagaki 2003, 2005, Murriel 2004).

The adaptation to IHH reduced the amount of PKC ϵ in homogenates and did not affect phosphorylated PKC ϵ (Ser729). However, the ratio of phosphorylated versus total PKC ϵ increased in homogenate and in cytosol. It seems, therefore, that there is an elevated amount of phosphorylated (e.g. activated) PKC ϵ . The increase of PKC ϵ phosphorylation was also found by Raffie et al. at neonatal rabbits after the adaptation to CNH (10% O₂, 10 days) (Raffie 2002). In accordance with our findings is the study of Wang et al. showing an increased proportion of phosphorylated vs. total PKC ϵ after the adaptation to IHH (PO₂=11.2 kPa, 4 h/day, 4 weeks) (Wang 2011). We also examined the role of PKC ϵ in the hypoxia-induced increased resistance to IR injury with the use of PKC ϵ specific inhibitor KP-1633 in isolated cardiomyocytes. The obtained results showed that administration of KP-1633 did not affect the cardioprotective effects of chronic hypoxia (Hlaváčková unpublished data). The results of our previous studies (Hlaváčková 2007, Kolář 2007), as well as current, suggest that PKC ϵ does not play a key role in the mechanism of cardioprotection induced by adaptation to IHH.

IHH increased the amount of total and phosphorylated (Thr497) PKC α . PKC α phosphorylates a variety of proteins potentially involved in signaling pathways leading to cardioprotection. One of these is antiapoptotic protein Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (Ruvolo 1998), which phosphorylation leads to activation of its antiapoptotic function. The observed activation of PKC α after the adaptation to IHH could thus contribute to cardioprotection through apoptosis regulation.

Effect of CNH on PKC

The adaptation to CNH reduced the amount of total PKC δ indicating enzyme's deactivation. On the other hand, the expression of PKC δ mRNA increased. It seems, therefore, that under the conditions of CNH, the turnover/degradation of PKC δ is increased. Decreased amount of PKC δ found in this study could mean faster degradation of the enzyme after having served its function. PKC δ involvement in signaling pathways of CNH-induced cardioprotection could thus be not completely ruled out. Observed changes in protein amounts of PKC δ have completely opposite trend than in the case of IHH, where the activation of PKC δ is crucial for cardioprotection (Neckář 2005). Although the involvement of PKC δ has also been confirmed by studies at ischemic (Mayr 2004) or pharmacological preconditioning (Fryer 2001), many publications link the activation of PKC δ rather with negative action on

IR, usually in connection with the excessive production of ROS and activation of apoptotic cell death (Murriel 2004, Sivaraman 2009).

The adaptation to CNH increased the amount of PKC ϵ in the particulate fraction and increased PKC ϵ mRNA expression in homogenate. The application of PKC ϵ specific inhibitory peptide KP-1633, which prevents the association of PKC ϵ with its anchoring protein RACK2 (Mackay 2001, Mochly-Rosen, 1995, Souroujon 1998), revealed that KP-1633 completely abolished the increased viability of cardiomyocytes and decreased LDH release during re-energization observed after the adaptation to CNH. These results are consistent with other studies that point to the involvement of PKC ϵ in cardioprotection induced by chronic hypoxia (Rafiee 2002, Wang 2011, Xue 2009). Although the adaptation to CNH as well as to IHH reduced infarct size (Neckář 2013), reduced LDH release and increased the viability of cardiomyocytes exposed to IR (Borchert 2011 Neckář 2013), the effects of this two models on expression of PKC are contradictory. The mutual regulation between PKC δ and PKC ϵ has been repeatedly described in cardiomyocytes (Mayr 2009, Rybin 2003, 2007), thus the decrease in the function of one isoform may be replaced by the function of the other.

The results obtained at models of IHH and CNH support the idea that PKC δ or PKC ϵ (or both) are important players in the mechanism of cardioprotection induced by chronic hypoxia. IHH represents significantly larger load and is associated with the last chance mechanisms and activation of PKC δ . CNH is milder and is associated with activation of PKC ϵ . Another goal of my work was to determine the target proteins of these isoforms in connection with apoptosis, mitochondrial dynamics, autophagy, metabolism of sphingolipids, elimination of toxic aldehydes and communication via gap junctions.

4.2 Analysis of PKC δ and PKC ϵ target proteins after the adaptation to IHH in connection with apoptosis, mitochondrial dynamics, autophagy, metabolism of sphingolipids, elimination of toxic aldehydes and communication through gap junctions

Effect of IHH on apoptosis

The adaptation to IHH increased the amount of proapoptotic proteins Bad and Bax and reduced the amount of antiapoptotic protein Bcl-2. It also decreased Bcl-2/Bad and Bcl-2/Bax ratios, which are commonly used to quantify apoptosis, because the activation/deactivation of apoptosis is dependent on the balance between pro- and antiapoptotic members of Bcl-2

protein family. Increased Bad and decreased Bcl-2 after hypoxia (12% O₂, 2 weeks) was also observed by Lee et al. (Lee 2006). The analysis of apoptotic cells amount showed that IHH reduced the number of Tunel-positive cells. Reduced apoptosis measured by the number of Tunel-positive cells after hypoxia (6 h/day, 5000 m, 42 days) was also observed by Dong et al. (Dong 2003). In order to clarify the influence of IHH on apoptosis, we decided to analyse other markers of apoptosis - release of cytochrome *c* into the cytosol, active caspase 3 and its inhibitor XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein). We showed that the adaptation to IHH reduced cytochrome *c* release into the cytosol, increased the amount of active caspase 3, but also its inhibitor XIAP. These results suggest that adaptation to IHH leads to the activation of proapoptotic and deactivation of antiapoptotic proteins of Bcl-2 family, but also to reduction of Tunel-positive cells, which is a sign of apoptosis deactivation. Reduced apoptosis is consistent with the cardioprotective action of IHH. Obtained results are summarized in Fig. 5.

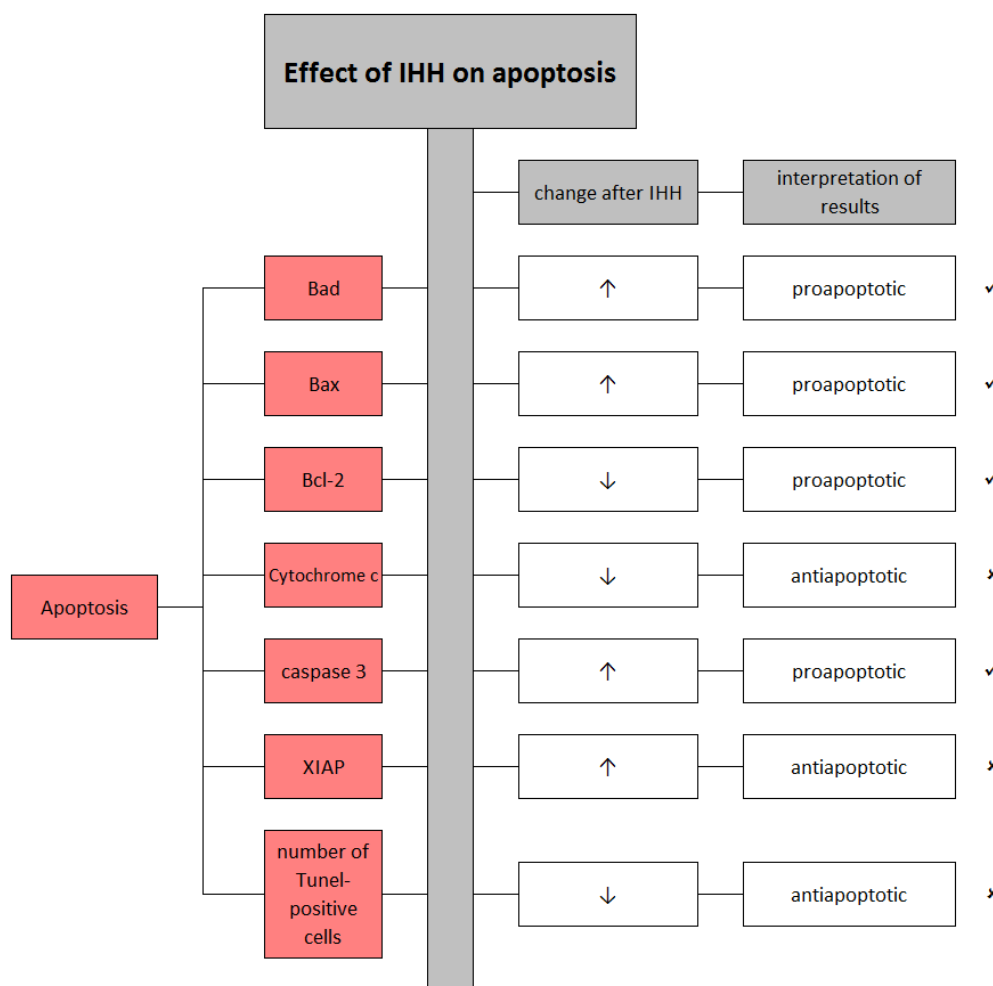


Fig. 5: Effect of IHH on proteins associated with apoptosis.

Effect of IHH on mitochondrial dynamics

The analysis of mitochondrial fission protein Drp1 (dynamin-related protein 1) and mitochondrial fusion proteins Mfn1 and Mfn2 (mitofusin 1 and 2) revealed that adaptation to IHH did not influence these crucial proteins involved in mitochondrial dynamics.

Effect of IHH on autophagy

Autophagy is closely related with apoptosis and a lot of proteins involved in the regulation of apoptosis play a role also in autophagy. Another goal of my work was to determine proteins involved in the mechanism of autophagy after the adaptation to IHH. Neither the amount of Beclin 1, involved in the initial stages of autophagosome formation, nor Parkin, involved in mitophagy, were affected by IHH. However, the adaptation to IHH increased the amount of BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3) and LC3-B (microtubule-associated protein B-light chain 3). It was found that increased expression of BNIP3 leads to autophagy and acts protectively because it reduces the production of ROS (Zhang 2008). It also prevents the interaction between Bcl-2 and Beclin 1 and thus activates autophagy (Belot 2009). The increase of BNIP3 after chronic hypoxia (12% O₂, 16 h/day, 4 and 8 weeks) was also observed by Lee et al. (Lee 2007). The adaptation to IHH led to increase of LC3-B which is a marker of autophagosomes. Similarly, Maeda et al. found increased LC3-B after hypoxia at model of sleep apnea (Maeda 2013). Increased autophagy could lead to the selective removal of damaged mitochondria (Kim 2007) and inhibit the release of proapoptotic factors such as cytochrome *c* (Hamacher-Brady 2007), which could represent a mechanism of increased tolerance of hypoxic hearts against IR injury. Obtained results are summarized in Fig. 6.

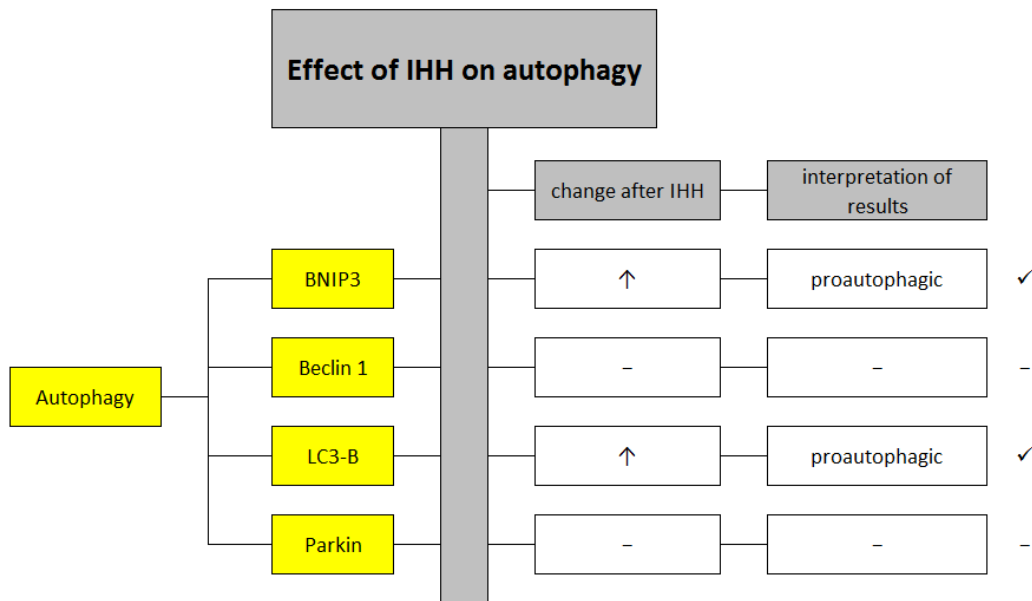


Fig. 6: Effect of IHH on proteins associated with autophagy.

Effect of IHH on metabolism of sphingolipids

The adaptation to IHH decreased the amount of sphingosinase 1 (SPHK1) and did not affect the amount of sphingosinase 2 (SPHK2). SPHK are enzymes responsible for formation of sphingosine-1-phosphate. It was found that the ratio of sphingosine-1-phosphate and ceramide affects cell survival and its increase counteracts apoptosis (Cuvillier 1996). SPHK1 is generally perceived as protective (Taha 2006). SPHK2 has been considered as a proapoptotic until recently (Maceyka 2005). This view was refuted by studies on isolated mouse hearts with a deletion in gene for SPHK2, which revealed, that SPHK2 was necessary to induce ischemic pre- and postconditioning (Vessey 2011, 2013). Despite the observed decline of SPHK1, its function could be compensated by function of SPHK2, thus preventing negative phenomena of SPHK1 reduction.

Effect of IHH on ALDH2

The adaptation to IHH reduced the amount of aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2). This result is inconsistent with the notion of cardioprotective effect of ALDH2 (Chen 2008). On the other hand it was shown, that plasma concentrations of 4-hydroxynonenal (4-HNE) affects PKC activity, which is crucial in cardioprotection. While low concentration of 4-HNE (0.1 μ M) deactivated PKC δ , higher concentrations (1-10 μ m) led to its activation (Poli 2008). Therefore it appears, that a certain level of aldehydes can act as second messenger and may

induce antioxidant defense response activated by stress, similarly as in the case of ROS (Poli 2008). It was also found that ALDH2 is phosphorylated by PKC ϵ and that this phosphorylation led to increase of ALDH2 catalytic activity (Chen 2008, Churchill 2009). Decrease of PKC ϵ and ALDH2 observed after IHH could thus play a role in activation of PKC δ (via 4-HNE), which is necessary for cardioprotection induced by this type of hypoxia.

Effect of IHH on Cx43

The adaptation to IHH increased both, total and phosphorylated forms (Ser368) of connexin 43 (Cx43). Waza et al. showed that acute hypoxia (1% O₂, 12 h) increased the phosphorylation of Cx43 on Ser262, which has a similar effect as phosphorylation at Ser368 (Waza 2014). It was shown that phosphorylation at Ser368 (or Ser262) mediated by PKC ϵ led to reduced communication via gap junctions (Ek-Vitorin 2006, Lampe 2000). Although it could worsen the conduction of electrical impulses and thus increase the risk of arrhythmias for example during myocardial infarction (Dhein 2006), under certain conditions, the reduced communication via gap junctions is protective. The closure of gap junctions may prevent the spread of harmful metabolites (H₂O₂, superoxide anion) and also Ca²⁺ overload, which normally occurs during IR, and thus reduce the damage of surrounding cells (Andrade-Rozental 2000). Cx43 also operates independently from its role in cellular communication as an essential component of cardioprotective signaling pathways. It has been found that the cardioprotective effect of ischemic preconditioning is suppressed in isolated cardiomyocytes mice with deletion of gene for Cx43 (Li 2004, Rodriguez-Sinovas 2009). Waza et al. showed that Cx43 phosphorylated by PKC ϵ interacted with Kir6.1 subunit of K_{ATP} channels and that this interaction reduced cell death (Waza 2014). PKC ϵ -Cx43-Kir6.1 K_{ATP} channels pathway could thus represent a mechanism by which chronic hypoxia leads to increased resistance against IR injury.

5 CONCLUSION

Objective 1: Analysis of PKC isoforms after the adaptation to intermittent hypobaric (IHH) and continuous normobaric hypoxia (CNH)

The analysis of PKC isoforms after the adaptation to two different models of chronic hypoxia confirmed that specific model of hypoxia significantly influences changes in PKC amount. We have shown that the adaptation to IHH increased total and phosphorylated PKC δ and PKC α and decreased PKC ϵ . IHH represents larger load and is associated with the last chance mechanisms and activation of PKC δ . These results confirmed our earlier studies highlighting the importance of PKC δ in cardioprotection induced by IHH.

The adaptation to milder model of CNH, conversely, led to an increase of PKC ϵ in particulate fraction and increase of PKC ϵ mRNA. The application of PKC ϵ inhibitory peptide KP-1633 abolished the cardioprotection and thus confirmed the hypothesis that PKC ϵ plays a key role in this model of chronic hypoxia.

Objective 2: Analysis of PKC δ and PKC ϵ target proteins after the adaptation to IHH

The analysis of PKC δ and PKC ϵ target proteins after the adaptation to IHH showed the increase of proapoptotic, but decrease of antiapoptotic proteins of Bcl-2 family, but also reduced number of apoptotic cells in the left ventricle myocardium. Reduced apoptosis is consistent with the cardioprotective action of IHH. We have also found the activation of autophagy through BNIP3 and LC3-B proteins. Increased autophagy might contribute to cardioprotection by accelerating the removal of damaged organelles. Although the mechanism of ischemic preconditioning describes the role of many PKC target proteins associated with the metabolism of sphingolipids, the mitochondrial dynamics or removal of toxic aldehydes, it appears, that in the mechanism of cardioprotection induced by adaptation to IHH these proteins are not applied.

POUŽITÁ LITERATURA/REFERENCES

- Andrade-Rozental AF, Rozental R, Hopperstad MG, Wu JK, Vrionis FD & Spray DC. (2000). Gap junctions: the "kiss of death" and the "kiss of life". *Brain Res Brain Res Rev* **32**, 308-315.
- Asemu G, Neckář J, Szárszoi O, Papoušek F, Ošťádal B & Kolář F. (2000). Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats. *Physiol Res* **49**, 597-606.
- Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouysségur J & Mazure NM. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* **29**, 2570-2581.
- Borchert GH, Yang C & Kolář F. (2011). Mitochondrial BKCa channels contribute to protection of cardiomyocytes isolated from chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, H507-513.
- Bertolotto C, Maulon L, Filippa N, Baier G & Auberger P. (2000). Protein kinase C theta and epsilon promote T-cell survival by a rsk-dependent phosphorylation and inactivation of BAD. *J Biol Chem* **275**, 37246-37250.
- Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD & Mochly-Rosen D. (2008). Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* **321**, 1493-1495.
- Chen JL, Lin HH, Kim KJ, Lin A, Ou JH & Ann DK. (2009). PKC delta signaling: a dual role in regulating hypoxic stress-induced autophagy and apoptosis. *Autophagy* **5**, 244-246.
- Churchill EN, Disatnik MH & Mochly-Rosen D. (2009). Time-dependent and ethanol-induced cardiac protection from ischemia mediated by mitochondrial translocation of varepsilonPKC and activation of aldehyde dehydrogenase 2. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 278-284.
- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S & Spiegel S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* **381**, 800-803.
- Dhein S. (2006). Cardiac ischemia and uncoupling: gap junctions in ischemia and infarction. *Adv Cardiol* **42**, 198-212.
- Ding HL, Zhu HF, Dong JW, Zhu WZ & Zhou ZN. (2004). Intermittent hypoxia protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by activating protein kinase C. *Life Sci* **75**, 2587-2603.
- Dong JW, Zhu HF, Zhu WZ, Ding HL, Ma TM & Zhou ZN. (2003). Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression. *Cell Res* **13**, 385-391.

- Ek-Vitorin JF, King TJ, Heyman NS, Lampe PD & Burt JM. (2006). Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C-dependent phosphorylation. *Circ Res* **98**, 1498-1505.
- Fryer RM, Wang Y, Hsu AK & Gross GJ. (2001). Essential activation of PKC-delta in opioid-initiated cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H1346-1353.
- Graham RM, Thompson JW, Wei J, Bishopric NH & Webster KA. (2007). Regulation of Bnip3 death pathways by calcium, phosphorylation, and hypoxia-reoxygenation. *Antioxid Redox Signal* **9**, 1309-1315.
- Hait NC, Bellamy A, Milstien S, Kordula T & Spiegel S. (2007). Sphingosine kinase type 2 activation by ERK-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* **282**, 12058-12065.
- Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, Sayen MR, Jinno M, Kirshenbaum LA, Gottlieb RA & Gustafsson AB. (2007). Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ* **14**, 146-157.
- Hlaváčková M, Kožichová K, Neckář J, Kolář F, Musters RJ, Novák F & Nováková O. (2010). Up-regulation and redistribution of protein kinase C- δ in chronically hypoxic heart. *Mol Cell Biochem* **345**, 271-282.
- Hlaváčková M, Neckář J, Ježková J, Balková P, Staňková B, Nováková O, Kolář F & Novák F. (2007). Dietary polyunsaturated fatty acids alter myocardial protein kinase C expression and affect cardioprotection induced by chronic hypoxia. *Exp Biol Med (Maywood)* **232**, 823-832.
- Inagaki K, Chen L, Ikeno F, Lee FH, Imahashi K, Bouley DM, Rezaee M, Yock PG, Murphy E & Mochly-Rosen D. (2003). Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation* **108**, 2304-2307.
- Inagaki K & Mochly-Rosen D. (2005). DeltaPKC-mediated activation of epsilonPKC in ethanol-induced cardiac protection from ischemia. *J Mol Cell Cardiol* **39**, 203-211.
- Jiang H, Cheng D, Liu W, Peng J & Feng J. (2010). Protein kinase C inhibits autophagy and phosphorylates LC3. *Biochem Biophys Res Commun* **395**, 471-476.
- Johnson KR, Becker KP, Facchinetti MM, Hannun YA & Obeid LM. (2002). PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). *J Biol Chem* **277**, 35257-35262.
- Kašparová D, Neckář J, Dabrowská L, Novotný J, Mráz J, Kolář F & Žurmanová J. (2015). Cardioprotective and nonprotective regimens of chronic hypoxia diversely affect the myocardial antioxidant systems. *Physiol Genomics* **47**, 612-620.
- Kim I, Rodriguez-Enriquez S & Lemasters JJ. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* **462**, 245-253.

- Kolář F, Ježková J, Balková P, Břeh J, Neckář J, Novák F, Nováková O, Tomášová H, Srbová M, Ošťádal B, Wilhelm J & Herget J. (2007). Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H224-230.
- Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG & Lau AF. (2000). Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J Cell Biol* **149**, 1503-1512.
- Lee SD, Kuo WW, Lin JA, Chu YF, Wang CK, Yeh YL, Wang SG, Liu JY, Chang MH & Huang CY. (2007). Effects of long-term intermittent hypoxia on mitochondrial and Fas death receptor dependent apoptotic pathways in rat hearts. *Int J Cardiol* **116**, 348-356.
- Lee SD, Kuo WW, Wu CH, Lin YM, Lin JA, Lu MC, Yang AL, Liu JY, Wang SG, Liu CJ, Chen LM & Huang CY. (2006). Effects of short- and long-term hypobaric hypoxia on Bcl2 family in rat heart. *Int J Cardiol* **108**, 376-384.
- Li X, Heinzl FR, Boengler K, Schulz R & Heusch G. (2004). Role of connexin 43 in ischemic preconditioning does not involve intercellular communication through gap junctions. *J Mol Cell Cardiol* **36**, 161-163.
- Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, Collier C, Zhang M, Satin LS, Merrill AH, Milstien S & Spiegel S. (2005). SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem* **280**, 37118-37129.
- Mackay K & Mochly-Rosen D. (2001). Localization, anchoring, and functions of protein kinase C isozymes in the heart. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 1301-1307.
- Maeda H, Nagai H, Takemura G, Shintani-Ishida K, Komatsu M, Ogura S, Aki T, Shirai M, Kuwahira I & Yoshida K. (2013). Intermittent-hypoxia induced autophagy attenuates contractile dysfunction and myocardial injury in rat heart. *Biochim Biophys Acta* **1832**, 1159-1166.
- Majumder PK, Pandey P, Sun X, Cheng K, Datta R, Saxena S, Kharbanda S & Kufe D. (2000). Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* **275**, 21793-21796.
- Mayr M, Liem D, Zhang J, Li X, Avliyakov NK, Yang JI, Young G, Vondriska TM, Ladroue C, Madhu B, Griffiths JR, Gomes A, Xu Q & Ping P. (2009). Proteomic and metabolomic analysis of cardioprotection: Interplay between protein kinase C epsilon and delta in regulating glucose metabolism of murine hearts. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 268-277.
- Mayr M, Metzler B, Chung YL, McGregor E, Mayr U, Troy H, Hu Y, Leitges M, Pachinger O, Griffiths JR, Dunn MJ & Xu Q. (2004). Ischemic preconditioning exaggerates cardiac damage in PKC-delta null mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H946-956.

- Mochly-Rosen D. (1995). Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* **268**, 247-251.
- Murriel CL, Churchill E, Inagaki K, Szweda LI & Mochly-Rosen D. (2004). Protein kinase Cdelta activation induces apoptosis in response to cardiac ischemia and reperfusion damage: a mechanism involving BAD and the mitochondria. *J Biol Chem* **279**, 47985-47991.
- Neckář J, Borchert GH, Hloušková P, Míčová P, Nováková O, Novák F, Hroch M, Papoušek F, Ošťádal B & Kolář F. (2013). Brief daily episode of normoxia inhibits cardioprotection conferred by chronic continuous hypoxia. Role of oxidative stress and BKCa channels. *Curr Pharm Des* **19**, 6880-6889.
- Neckář J, Marková I, Novák F, Nováková O, Szárszoi O, Ošťádal B & Kolář F. (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**, H1566-1572.
- Neckář J, Papoušek F, Nováková O, Ošťádal B & Kolář F. (2002). Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res Cardiol* **97**, 161-167.
- Poli G, Schaur RJ, Siems WG & Leonarduzzi G. (2008). 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev* **28**, 569-631.
- Rafiee P, Shi Y, Kong X, Pritchard KA, Tweddell JS, Litwin SB, Mussatto K, Jaquiss RD, Su J & Baker JE. (2002). Activation of protein kinases in chronically hypoxic infant human and rabbit hearts: role in cardioprotection. *Circulation* **106**, 239-245.
- Qi X, Disatnik MH, Shen N, Sobel RA & Mochly-Rosen D. (2011). Aberrant mitochondrial fission in neurons induced by protein kinase C{delta} under oxidative stress conditions in vivo. *Mol Biol Cell* **22**, 256-265.
- Rodríguez-Sinovas A. (2009). Cx43 phosphorylation and cardioprotection. *Cardiovasc Res* **83**, 613-614.
- Ruvolo PP, Deng X, Carr BK & May WS. (1998). A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem* **273**, 25436-25442.
- Rybin VO, Guo J, Gertsberg Z, Elouardighi H & Steinberg SF. (2007). Protein kinase Cepsilon (PKCepsilon) and Src control PKCdelta activation loop phosphorylation in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **282**, 23631-23638.
- Rybin VO, Sabri A, Short J, Braz JC, Molkentin JD & Steinberg SF. (2003). Cross-regulation of novel protein kinase C (PKC) isoform function in cardiomyocytes. Role of PKC epsilon in activation loop phosphorylations and PKC delta in hydrophobic motif phosphorylations. *J Biol Chem* **278**, 14555-14564.

- Sato A, Arimura Y, Manago Y, Nishikawa K, Aoki K, Wada E, Suzuki Y, Osaka H, Setsuie R, Sakurai M, Amano T, Aoki S, Wada K & Noda M. (2006). Parkin potentiates ATP-induced currents due to activation of P2X receptors in PC12 cells. *J Cell Physiol* **209**, 172-182.
- Sitailo LA, Tibudan SS & Denning MF. (2004). Bax activation and induction of apoptosis in human keratinocytes by the protein kinase C delta catalytic domain. *J Invest Dermatol* **123**, 434-443.
- Sivaraman V, Hausenloy DJ, Kolvekar S, Hayward M, Yap J, Lawrence D, Di Salvo C & Yellon DM. (2009). The divergent roles of protein kinase C epsilon and delta in simulated ischaemia-reperfusion injury in human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 758-764.
- Souroujon MC & Mochly-Rosen D. (1998). Peptide modulators of protein-protein interactions in intracellular signaling. *Nat Biotechnol* **16**, 919-924.
- Taha TA, Kitatani K, El-Alwani M, Bielawski J, Hannun YA & Obeid LM. (2006). Loss of sphingosine kinase-1 activates the intrinsic pathway of programmed cell death: modulation of sphingolipid levels and the induction of apoptosis. *FASEB J* **20**, 482-484.
- Vessey DA, Li L, Imhof I, Honbo N & Karliner JS. (2013). FTY720 postconditions isolated perfused heart by a mechanism independent of sphingosine kinase 2 and different from SIP or ischemic postconditioning. *Med Sci Monit Basic Res* **19**, 126-132.
- Vessey DA, Li L, Jin ZQ, Kelley M, Honbo N, Zhang J & Karliner JS. (2011). A sphingosine kinase form 2 knockout sensitizes mouse myocardium to ischemia/reoxygenation injury and diminishes responsiveness to ischemic preconditioning. *Oxid Med Cell Longev* **2011**, 961059.
- Voss OH, Kim S, Wewers MD & Doseff AI. (2005). Regulation of monocyte apoptosis by the protein kinase Cdelta-dependent phosphorylation of caspase-3. *J Biol Chem* **280**, 17371-17379.
- Wang ZH, Chen YX, Zhang CM, Wu L, Yu Z, Cai XL, Guan Y, Zhou ZN & Yang HT. (2011). Intermittent hypobaric hypoxia improves postischemic recovery of myocardial contractile function via redox signaling during early reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H1695-1705.
- Waza AA, Andrabi K & Hussain MU. (2014). Protein kinase C (PKC) mediated interaction between connexin43 (Cx43) and K(+)(ATP) channel subunit (Kir6.1) in cardiomyocyte mitochondria: Implications in cytoprotection against hypoxia induced cell apoptosis. *Cell Signal* **26**, 1909-1917.
- World Health Organization. (2014). The 10 leading causes of death in the World in 2012. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/, staženo dne 1.5.2016.

- Xue Q & Zhang L. (2009). Prenatal hypoxia causes a sex-dependent increase in heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in adult male offspring: role of protein kinase C epsilon. *J Pharmacol Exp Ther* **330**, 624-632.
- Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ & Semenza GL. (2008). Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* **283**, 10892-10903.

CURRICULUM VITAE

Osobní údaje:

Jméno a příjmení, titul: Kristýna Holzerová (roz. Kožichová), RNDr.
Adresa: Schulhoffova 790/9, Praha 4, 149 00
Datum a místo narození: 13. října 1984, Praha
Národnost: česká
Telefon: 606 521 387
E-mail: kristyna.holzerova@gmail.com

Vzdělání:

2009 – dosud Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie, obor: Fyziologie živočichů, doktorské studium

2012 Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, rigorózní řízení, titul: RNDr.

2007 – 2009 Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, obor: Klinická a toxikologická analýza, titul: Mgr.
Téma diplomové práce: PKC δ a PKC ε v myokardu potkana adaptovaného na různé formy chronické hypoxie

2004 – 2007 Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, obor: Klinická a toxikologická analýza, titul: Bc.
Téma bakalářské práce: Úloha kyseliny lysosofatidové v buněčné signalizaci

2000 – 2004 Gymnázium Botičská, Praha, zakončeno maturitní zkouškou

1991 – 2000 Základní škola Omská, Praha

Zaměstnání:

srpen 2015 – dosud Akademie věd ČR, Fyziologický ústav, Oddělení vývojové kardiologie, pozice: odborný VŠ pracovník výzkumu a vývoje

srpen 2015 – dosud Institut klinické a experimentální medicíny, Centrum experimentální medicíny, Laboratoř patofyziologie kardiovaskulárních systémů, pozice: jiný vědecký pracovník

2009 – dosud Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie, pozice: vědecký pracovník

Výzkumná a vědecká činnost:

Úloha proteinkinasy C v mechanismu kardioprotektivního účinku chronické hypoxie

Účast na vědeckých konferencích:

Komise experimentální kardiologie (KEK) pracovní skupiny při České fyziologické společnosti a Slovenské fyziologické společnosti, Buchlovice, ČR, 2015

Komise experimentální kardiologie (KEK) pracovní skupiny při České fyziologické společnosti a Slovenské fyziologické společnosti, Deštné v Orlických horách, ČR, 2014

New Frontiers in Basic Cardiovascular Research - Hradec Králové, ČR, 2012

Frontiers in Cardiovascular Biology - Londýn, Velká Británie, 2012

ISHR European section 2011 annual meeting - Haifa, Izrael, 2011

Frontiers in Cardiovascular Biology - Berlín, Německo, 2010

Publikační aktivity:

Holzerová K, Hlaváčková M, Žurmanová J, Borchert G H, Neckář J, Kolář F, Novák F, Nováková O: Involvement of PKC ϵ in cardioprotection induced by adaptation to chronic continuous hypoxia. *Phys Res Res* 64(2):191-201 (2015)

Hlaváčková M, Kožichová (Holzerová) K, Neckář J, Kolář F, Musters RJ, Novák F, Nováková O.: Up-regulation and redistribution of protein kinase C- δ in chronically hypoxic heart. *Mol Cell Biochem* 345(1-2); 271 – 82 (2010)

Kožichová (Holzerová) K, Hlaváčková M, Neckář J, Kolář F, Nováková O, Novák F: Myocardial ischemic tolerance and distribution of protein kinase C in various forms of chronic hypoxia. *Cardiovasc Res* 87 (Suppl 1); S83 (2010). (publikovaný abstrakt a poster z konference Frontiers in Cardiovascular Biology - Berlín, Německo, červenec 2010)

Pedagogická činnost:

2015	Buněčné organely – praktikum (asistent) (MB150C29)
2012 – 2015	Lipidy a biomembrány – lipidové peroxidace (přednáška) (MB150P33)
2011 – 2012	Buněčné organely – praktikum (asistent) (MB150C29)
2009 – 2010	Praktikum z biochemie (asistent) (MB150C04)

Další vzdělávací kurzy:

21. –25.9.2015 Přírodovědecká fakulta UK v Praze, kurz k získání osvědčení o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů podle § 15d odst. 3 zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů
- 3.6. – 4.6.2010 Lékařská fakulta UK v Hradci Králové, kurz: hodnocení kardiotoxicity léčiv a možnosti farmakologické kardioprotekce
- 2009 – 2010 Přírodovědecká fakulta UK v Praze, kurz: anglický jazyk, přípravný kurz na zkoušku CAE
- 24.11.2009 Československá mikroskopická společnost; KRD, s.r.o. a ÚMG AV ČR, kurz: mikroskopická imunodetekce v biomedicině
- 2002 – 2004 Jazyková škola Akcent, Praha, kurz: anglický jazyk

Jazykové dovednosti:

anglický jazyk – slovem i písmem
německý jazyk – základy

V Praze dne 22. července 2016

RNDr. Kristýna Holzerová

SEZNAM PUBLIKACÍ/LIST OF PUBLICATIONS

Holzerová K, Hlaváčková M, Žurmanová J, Borchert G, Neckář J, Kolář F, Novák F & Nováková O. (2015). Involvement of PKCepsilon in cardioprotection induced by adaptation to chronic continuous hypoxia. *Physiol Res* **64**, 191-201. IF = 1,618.

Hlaváčková M, Kožichová K, Neckář J, Kolář F, Musters RJ, Novák F & Nováková O. (2010). Up-regulation and redistribution of protein kinase C- δ in chronically hypoxic heart. *Mol Cell Biochem* **345**, 271-282. IF = 2,57.

Míčová P, Hahnová K, Hlaváčková M, Elsnicová B, Chytilová A, Holzerová K, Žurmanová J, Neckář J, Kolář F, Nováková O & Novotný J. Chronic intermittent hypoxia affects the cytosolic phospholipase A2 α /cyclooxygenase 2 pathway via β 2-adrenoceptor-mediated ERK/p38 stimulation.

Dne 3.6.2016 zasláno do časopisu *Mol Cell Biochem*.

Další publikace

Alánová P, Chytilová A, Neckář J, Hrdlička J, Míčová P, Holzerová K, Hlaváčková M, Macháčková K, Papoušek F, Vašinová J, D Benák, Nováková O & Kolář F. Myocardial ischaemic tolerance in rats subjected to endurance exercise training during adaptation to chronic hypoxia.

Dne 27.7.2016 zasláno do časopisu *J Appl Physiol*.