

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Ivana Karlovská

**Kompartmentalizace beta-adrenergního signálního systému v
srdečních buňkách: vliv hypoxie**

**Compartmentalization of the beta-adrenergic signaling system in cardiac
cells: the effect of hypoxia**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha 2016

PROHLÁŠENÍ

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

V Praze 15.8.2016

Podpis

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za jeho odborné vedení, pomoc a veškerý čas, který mi během zpracování této práce věnoval. Dále bych ráda poděkovala svým rodičům za podporu během celého studia. V neposlední řadě děkuji také celému kolektivu z laboratoře za jejich ochotné rady a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo studium změn ve vybraných systémech, ke kterým dochází u buněčné linie kardiomyoblastů H9c2 po vystavení snížené hladině kyslíku na 2 % po dobu 24 hodin. Sledovány byly změny v kompartmentalizaci vybraných členů β -Adrenergního signálního systému. Byl zjištěn nárůst v expresi β_1 AR i β_2 AR. Vliv hypoxie na kompartmentalizaci receptorů byl však prokázán pouze u β_2 AR, které byly po hypoxii nalezeny nejen v raftových frakcích membrán, ale i v neraftových. Zvýšení exprese po působení hypoxie bylo detekováno také u AC, lokalizované v membránových raftech. Dalším cílem bylo sledování apoptotických markerů, aby se zjistilo, zda námi zvolené hypoxické podmínky vyvolávají apoptózu nebo aktivují naopak anti-apoptotické signální dráhy. Nárůst oproti normoxickým buňkám byl zjištěn jak u pro-apoptotického proteinu Bax, tak i u proteinu Bcl-2 zabraňujícímu apoptóze. Porovnáním jejich poměrů však vyšlo najevo, že větší převahu má pro-apoptotický protein Bax. Stejně tak exprese dalšího apoptotického markeru kaspázy 3 byla silně zvýšena u hypoxických buněk. Dále bylo zkoumáno, zda se hypoxií aktivují možné protektivní kinázové dráhy. Expese kináz Akt i ERK se po hypoxii zvyšovala, avšak jejich aktivace fosforylací prokázána nebyla. Hladiny fosforylované Akt kinázy byly dokonce nižší než u normoxických buněk. Vliv hypoxie na celkovou viabilitu buněk byl také pozorovatelný. Docházelo k mírnému snížení viability buněk a také k signifikantnímu zvýšení apoptózy. Také byla potvrzena zvýšená tvorba ROS pomocí fluorescenční sondy H₂DCFDA.

Klíčová slova: Srdeční buňky; β -adrenergní receptory; adenylylcykláza; cytoprotekce; reaktivní formy kyslíku; hypoxie

ABSTRACT

The aim of this thesis was to study the changes that occur in cell line H9c2 after exposure to an oxygen level reduced to 2 % for 24 hours. We monitored changes in compartmentation of chosen members of β -adrenergic signaling system. We found an increase in expression of β_1 AR and β_2 AR. Only β_2 AR showed change in compartmentation after hypoxia, as they relocate from membrane rafts to non-rafts fractions of membrane. AC also showed an increase of expression and was located in membrane rafts. The next aim of this work was to monitor apoptotic markers to determine whether there are activated pro-apoptotic or anti-apoptotic signals under chosen conditions of hypoxia. There was an increase in expression of both pro-apoptotic protein Bax and anti-apoptotic protein Bcl-2. We compare ratios of Bcl-2 to Bax and we found that there is a bigger increase in protein Bax expression. Another apoptotic marker, caspase 3, was tested and we also found that there was an increase in expression of caspase 3 in cells after hypoxia. Furthermore, we studied possible activation of kinase signaling pathways that may contribute to protective effects of hypoxia. Expression of Akt and ERK kinases was increased after hypoxia, but we did not confirm activation by phosphorylation of these kinases. Levels of phosphorylated Akt kinase were even lower in hypoxic cells than in normoxic cells. We could also find perceptible impact of hypoxia on viability of the cells. There was a slight reduction of viability of cells and also significant increase in apoptosis. We also found an increase in ROS production using fluorescent dye H₂DCFDA.

Key words: Heart cells, β -adrenergic receptors, adenylyl cyclase, cytoprotection, reactive oxygen species, hypoxia

OBSAH

Abstrakt	1
Abstract	2
Seznam zkratk	5
1 Úvod	7
2 Literární přehled	8
2.1 Definice a výskyt hypoxie:	8
2.2 Účinky hypoxie.....	8
2.3 Oxidativní stres.....	9
2.3.1 Volné radikály	9
2.3.2 Kyslíkaté radikály	9
2.3.3 ROS při hypoxii	11
2.3.4 ROS a apoptóza.....	12
2.3.5 ROS a signální funkce.....	13
2.4 Adrenergní systém v srdci	14
2.4.1 β -Adrenergní receptory	15
2.4.2 G proteiny.....	17
2.4.3 Adenylylcykláza.....	18
2.5 Vliv hypoxie na β AR.....	18
2.6 Vliv hypoxie na G proteiny	19
2.7 Vliv hypoxie na AC	19
2.8 Navození cytoprotekce hypoxií	20
2.8.1 PI3K/Akt dráha	20
2.8.2 Signální dráha MAPK/ERK	22
3 Cíle diplomové práce	23
4 Materiál a metody.....	24
4.1 Buňky.....	24
4.2 Sklizení a homogenizace buněk	24
4.2.1 Roztoky	24
4.2.2 Pracovní postup:	24
4.3 Izolace membránových raftů	25
4.3.1 Roztoky	25
4.3.2 Pracovní postup:	25

4.4	Stanovení proteinů – metoda BCA	26
4.4.1	Roztoky	26
4.4.2	Pracovní postup	26
4.5	SDS-PAGE elektroforéza	27
4.5.1	Roztoky	27
4.5.2	Příprava vzorků	27
4.5.3	Pracovní postup	27
4.6	Western blotting a imunodetekce	28
4.6.1	Roztoky	28
4.6.2	Pracovní postup	29
4.7	Průtoková cytometrie (FACS)	30
4.7.1	Roztoky	30
4.7.2	Pracovní postup	30
4.8	Detekce ROS pomocí fluorescenčních barviv	31
4.8.1	Roztoky	31
4.8.2	Pracovní postup	31
4.9	Analýza dat	31
5	Výsledky.....	32
5.1	Ověření úspěšné izolace membránových raftů	32
5.2	Fotografie buněk.....	33
5.3	Výzkum vlivu hypoxie na viabilitu buněk pomocí průtokové cytometrie	34
5.4	Detekce vybraných proteinů pomocí elektroforézy a Western blotingu	36
5.4.1	Apoptotické markery.....	36
5.4.2	β AR a AC	38
5.4.3	Kinázy	40
5.5	Detekce ROS – pomocí fluorescenční mikroskopie.....	43
5.5.1	Barvení fluorescenční sondou H ₂ DCFDA	43
5.5.2	Barvení fluorescenční sondou DHE	44
6	Diskuze.....	45
7	Závěr.....	48
8	Literatura	49

SEZNAM ZKRATEK

AAS	Roztok antibiotik a antimykotik
ABB	Annexin vázající pufr
AC	Adenylylcykláza
ADP	Adeonsindifosfát
AR	Adrenergní receptor
ATP	Adenosintrifosfát
BCA	Kyselina bicinchoninová
BSA	Hovězí sérový albumin
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
dATP	Deoxyadenosintrifosfát
DHE	Dihydroethidium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	Epidermální růstový faktor
ER	Endoplazmatické retikulum
ERK	Extracelulárním signálem řízená kináza
ETC	Elektron transportní řetězec
FBS	Fetální bovinní sérum
GDP	Guanosindifosfát
GPCR	Receptory spřažené s G proteiny
GRK	Kináza receptorů spřažených s G proteiny
GTP	Guanosintrifosfát

H ₂ DCFDA	2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
HIF	Hypoxia inducible factor
JNK	c-Jun N-terminální kináza
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkináza
MEK	Kináza mitogenem aktivované kinázy
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NGF	Nervový růstový faktor
PBS	Fosfátový pufr
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PH	Pleckstrin homology doména
PI3K	Fosfatidylinositol-3 kináza
PIP2	Fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát
PIP3	Fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfát
PKA	Proteinkináza A
PKC	Proteinkináza C
PLC	Fosfolipáza C
PNS	Postnukleární supernatant
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SAPK	Stresem aktivované proteinkinázy
SDS	Dodecylsírán sodný
TM	Transmembránový úsek
TNF	Tumor necrosis factor
TOR	Target of rapamycin (kináza)

1 ÚVOD

V současné době se srdeční choroby řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí v rozvinuté západní civilizaci a je proto důležité věnovat pozornost hledání účinných protektivních mechanismů. Hypoxie může za určitých podmínek posilovat odolnost srdce vůči ischemickému poškození i dalším stresorům. Ačkoliv existuje již řada in vitro a in vivo studií, stále nejsou dobře rozluštěny události, ke kterým po působení hypoxie v buňce dochází a stejně tak není dobře odlišena hranice, kdy ještě hypoxie působí protektivně a kdy již dochází k poškození buněk. Bylo zjištěno, že hypoxie ovlivňuje také β -adrenergní signální systém, který je jeden z hlavních regulátorů srdeční kontraktility a poruchy v jeho funkci vedou k vážnému srdečnímu poškození.

Cílem této práce bylo zjistit, jak námi zvolené podmínky hypoxie působí na srdeční buňky v in vitro podmínkách. Kromě vlivu na životnost buněk a míru apoptózy jsme sledovali také β -adrenergní signální systém a aktivaci kináz, které by mohly přispívat k hypoxií navozené zvýšené odolnosti. Zajímalo nás také, jak bude hypoxie indukovat tvorbu kyslíkatých radikálů, které mohou v buňce zastávat řadu různých signálních funkcí.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 DEFINICE A VÝSKYT HYPOXIE:

Hypoxie je definována jako snížený přístup kyslíku ke tkáním. Jednou z jejích příčin může být nízký parciální tlak kyslíku ve vzduchu, jako tomu je ve vysokých nadmořských výškách, což se projevuje jako akutní horská nemoc. Mezi další příčiny hypoxie patří nedostatek kyslíku v krvi (hypoxemie). Ten ovlivňuje celé tělo a může být způsoben například chudokrevností, poškozením hemoglobinu aj. Naproti tomu při místní nedokrevnosti (ischemii) nedochází k prokrvení daného orgánu nebo části orgánu a tkáň tak trpí kromě nedostatku kyslíku také nedostatkem živin. Při ischemii dochází k mnohem závažnějším důsledkům než při samotné hypoxii. Jsou více poškozovány mitochondrie a trvá déle, než se obnoví syntéza ATP.

Důležitou roli v účinku na organismus hraje také délka působení hypoxie. Jiná odpověď se rozvíjí při chronickém působení a jiná při krátkém stimulu. Pro výzkum se také využívá intermitentní působení, tedy kratší stimulus, který se periodicky opakuje.

S hypoxií se lidské tělo setkává poměrně často. Vyskytuje se v těle i za fyziologických podmínek a je dokonce nezbytná například pro správný vývoj savčího embrya (Dunwoodie, 2009). Chronický nedostatek kyslíku je však spojován především s patologickými stavy. Je součástí mnoha onemocnění (ateroskleróza, artritida, nádorová onemocnění, srdeční choroby a další), zhoršuje jejich symptomy a podílí se na jejich rozvoji.

2.2 ÚČINKY HYPOXIE

Účinek hypoxie na jednotlivé buňky je i u různých typů buněk podobný: ubývá ATP, buňky přechází na anaerobní metabolismus, s čímž souvisí zvýšená spotřeba glukózy a vyšší produkce laktátu (Neely and Morgan, 1974). Kvůli nedostatku kyslíku se v buňce také zhoršuje produkce energie, protože je snížena efektivita dýchacího řetězce, a tak vzniká v buňce větší množství kyslíkových radikálů (ROS), které vede k dalšímu poškození buňky a případně až k apoptóze či nekróze.

Působení mírné hypoxie však může také zvyšovat resistenci buněk proti různým typům stresu včetně následného působení oxidativního stresu. Nejvíce je tento fenomén prozkoumán u srdce, protože oxidativní stres je velmi podstatnou složkou ischemických srdečních onemocnění. To, že mírná hypoxie působí na srdce protektivně, je patrné i

z klinických studií, zkoumajících populace žijící ve vyšších nadmořských výškách, u kterých je úmrtnost v souvislosti s kardiovaskulárními chorobami minimální (Mortimer et al., 1977). Nicméně mírná hypoxie zvyšuje odolnost vůči následnému stresu i u ostatních typů buněk (Kast et al., 2015; Lee et al., 2006).

2.3 OXIDATIVNÍ STRES

Oxidativní stres je v organismu projev nerovnováhy mezi produkcí kyslíkatých radikálů a schopností jejich účinné detoxifikace nebo oprav následných poškození.

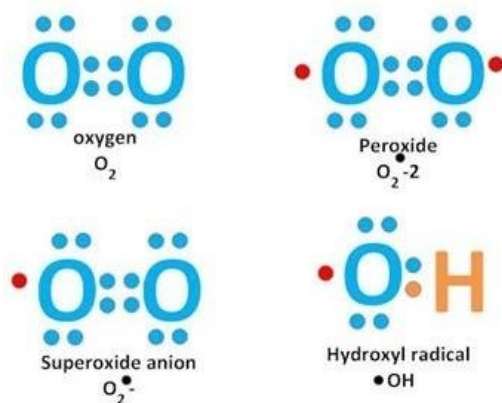
2.3.1 Volné radikály

Volnými radikály jsou nazývány takové molekuly, které ve svém valenčním orbitalu obsahují pouze jeden samostatný, nepárový, elektron. Nepárový elektron je na rozdíl od párových elektronů mnohem reaktivnější, ale jednotlivé radikálové molekuly se ve své reaktivitě velmi liší. Škodlivost volných radikálů je dána právě jejich vysokou reaktivitou. Volné radikály napadají sousední molekuly, odeberou jim nebo přidávají elektron a z původní molekuly se tak stane radikál, který napadá další sousední molekulu. Tímto způsobem dochází k řetězové reakci a následnému závažnému poškození buněčných struktur.

2.3.2 Kyslíkaté radikály

Jako vedlejší produkty aerobního metabolismu vznikají v organismech reaktivní formy kyslíku (ROS). Jsou to meziprodukty redukce molekulárního kyslíku na vodu a v živočišných buňkách jsou generovány především v mitochondriích v elektron transportním řetězci (ETC) a oxidativní fosforylaci. Tyto molekuly mohou být příčinou mnoha škodlivých procesů, podílet se na rozvoji řady onemocnění a také jsou významnou součástí procesu stárnutí (Beckman and Ames, 1998). Zároveň však mají ROS také důležitou roli v buněčné signalizaci, v regulaci apoptózy a také jsou v imunitních buňkách produkovány enzymem NADH oxidázou a využívány v boji proti bakteriím (Lambeth, 2004).

Kyslík je díky struktuře svého elektronového obalu náchylný ke tvorbě radikálových forem. Postupnou redukcí kyslíku na vodu přidáním čtyř elektronů vznikají následující ROS: superoxidový radikál $O_2^{\cdot-}$, peroxid vodíku H_2O_2 , hydroxylový radikál HO^{\cdot} (Obr. 1).



Obrázek 1: Reaktivní formy kyslíku; červeně – nepárový elektron

Upraveno podle:

https://qph.ec.quoracdn.net/main-qimg-0c664276e7adb221b1a96e739a82131c-c?convert_to_webp=true

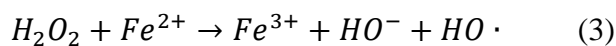
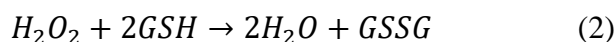
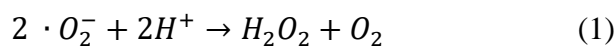
Nejreaktivnějším kyslíkatým radikálem v buňkách je hydroxylový radikál HO^{\cdot} . Ten může vzniknout v mitochondrii díky přítomnosti redukovaných přechodných kovů (Fe^{2+}), které jsou obsaženy v proteinech ECT jako kofaktory. HO^{\cdot} vzniká buď Fe^{2+} -závislou Fentonovou reakcí (reakce 3) nebo Haber-Weissovim mechanismem, který je Fe^{2+} katalyzován (reakce 4).

Za fyziologických podmínek, kdy jsou mitochondrie plně funkční, občas unikají elektrony procházející ETC a redukují kyslík na $O_2^{\cdot-}$. Odhaduje se, že přibližně 1 – 2% procházejících elektronů unikne z ETC a dá vznik $O_2^{\cdot-}$ (Boveris, 1977). K tomuto úniku dochází hlavně na komplexu I a v Q-cyklus na komplexu III (Barja, 1999; St-Pierre et al., 2002). Za patofyziologických podmínek se však může zhoršit efektivita ETC a elektrony pak mohou unikat také z dalších komplexů.

Kromě mitochondrií jsou dalšími zdroji ROS také ER (enzym Cytochrom P-450), peroxisomy a v menší míře mohou ROS vznikat také v jádře (Thannickal and Fanburg, 2000).

Protože kyslíkaté radikály v buňce neustále vznikají, je potřeba se jich také účinně zbavovat, aby nedocházelo k jejich nahromadění a následnému poškození buněčných struktur. Dva $O_2^{\cdot-}$ jsou konvertovány na peroxid vodíku H_2O_2 (reakce 1) mitochondriální manganovou superoxidodismutázou (MnSOD). H_2O_2 může být enzymaticky dále přeměněn

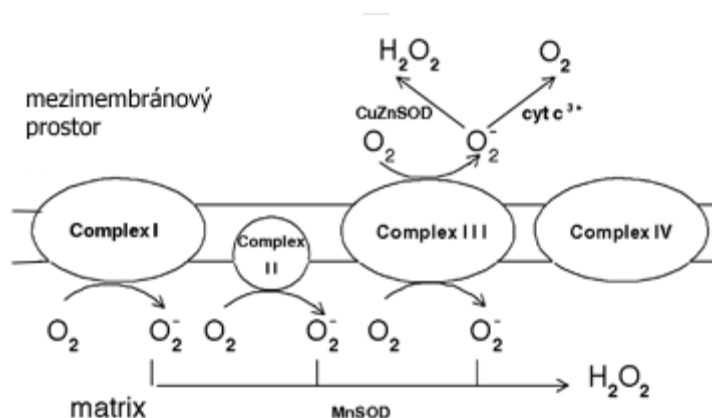
katalázou na vodu a kyslík, nebo může být H_2O_2 degradován pomocí glutathion peroxidázy (reakce 2).



Kromě enzymů se buňka může bránit proti ROS také pomocí dalších molekul s antioxidačními vlastnostmi. Jsou jimi například různé vitaminy jako kyselina askorbová nebo α -tokoferol.

2.3.3 ROS při hypoxii

Při hypoxii je přísun kyslíku do srdce nedostatečný pro oxidativní fosforylaci, proteiny ETC tak zůstávají ve vysoce redukovaném stavu a v mitochondriích dochází ke zvýšené tvorbě ROS (Chandel et al., 1998; Duranteau et al., 1998). Ke zvýšení produkce $\cdot O_2^-$ dochází během hypoxie na komplexu III (Guzy et al., 2005) a také na komplexu II (Paddenberg et al., 2003). Komplex II se za normoxie na tvorbě ROS nepodílí, ale při hypoxii dochází ke změně směru proudění elektronů na komplexu II, který tak funguje jako fumarát reduktáza a produkuje ROS (Hägerhäll, 1997).

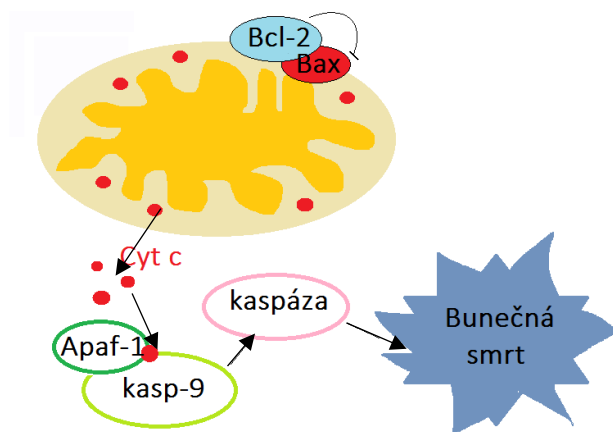


Obrázek 2: Tvorba ROS v elektron transportním řetězci
Upraveno podle Turrens (2003)

2.3.4 ROS a apoptóza

Některé receptory z rodiny TNF/NGF (tumor necrosis factor/nerve growth factor), kam se řadí například Fas receptor, dokáží po aktivaci navodit buněčnou smrt přes mechanismus závislý na kaspázách (Wallach et al., 2003). V tomto procesu jsou pravděpodobně zapojeny také ROS z mitochondrie (Schulze-Osthoff et al., 1992).

Úloha mitochondrie během apoptózy je velmi důležitá (Obr. 3). Pomocí proteinu Bax dochází k vytvoření póru v mitochondriální membráně, kudy do cytosolu uniká cytochrom c. Aktivace proteinu Bcl-2 nebo Bcl-XL zabraňuje tvorbě póru a tak působí antiapoptoticky. Když se však pór vytvoří, uniklý cytochrom c v cytosolu interaguje s proteinem Apaf1 (za přítomnosti dATP) a společně tvoří tzv. apoptozom, který aktivuje prokaspázy (Hu et al., 1998; Zou et al., 1999), což má za následek aktivaci iniciátorových a efektorových kaspáz a následný sled událostí vedoucích k apoptóze. ROS zde pravděpodobně přispívají k tvorbě póru v mitochondriální membráně oxidací membránových struktur a narušením membránového potenciálu (Zamzami et al., 1995).



Obrázek 3: Úloha mitochondrie v navození apoptózy.

Upraveno podle:

https://www.researchgate.net/figure/24188667_fig1_Figure-1-Main-regulators-of-the-mitochondrial-apoptotic-pathway-in-C-elegans [accessed Aug 12, 2016]

Kromě samotného navození apoptózy se ROS účastní také v indukci genů pro Fas ligand a Fas receptor (Bauer et al., 1998).

Na druhou stranu, ROS indukované přes TNF se mohou v některých typech buněk účastnit aktivace také antiapoptické signální dráhy (Morgan and Liu, 2011).

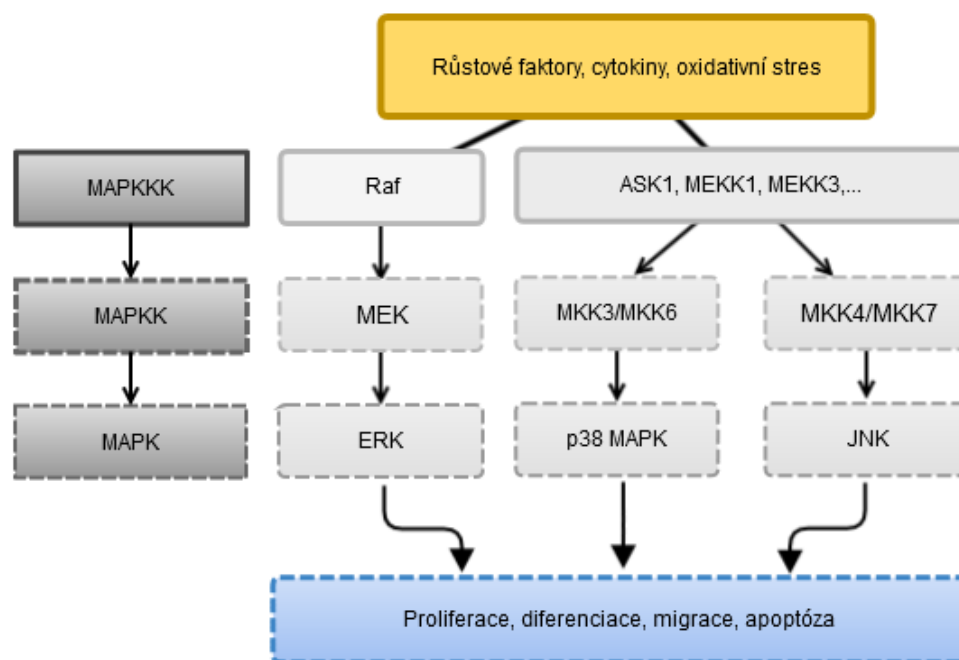
2.3.5 ROS a signální funkce

U srdečních buněk dochází působením hypoxie ke snižování kontraktility, které nesouvisí s nedostatkem ATP nebo zásobami fosfokreatinu (Silverman et al., 1997). Tato schopnost odpovídat na hladinu kyslíku v určitém fyziologickém rozmezí vyžaduje existenci buněčného senzoru O₂ napojeného na signální dráhu. Popsáno je několik možných mechanismů, které na základě lokálních hladin O₂ pravděpodobně aktivují funkční a adaptivní odpovědi.

Velká část reakcí odpovídajících na vystavení hypoxii je zajišťována transkripčním faktorem HIF (hypoxia inducible factor), který je regulován stabilitou svojí α podjednotky. Ta je v přítomnosti kyslíku hydroxylována a následně degradována v proteasomu (Yu et al., 2001). HIF-specifické hydroxylázy jsou přímo závislé na přítomnosti kyslíku (McNeill et al., 2002), a tak by mohly být považovány za buněčné senzory O₂.

Další buněčné senzory O₂ se nacházejí v mitochondrii. Popsána byla například úloha komplexů II (Paddenberg et al., 2003), III (Guzy et al., 2005) a IV (Duranteau et al., 1998). Mitochondrie reguluje odpovědi na hypoxii pomocí ROS. ROS se účastní stabilizace transkripčního faktoru HIF (Chandel et al., 2000), ale také aktivace dalších důležitých signálních drah. Aktivují například mitogenem aktivované proteinkinázy ERK-2 (Guyton et al., 1996), JNKs/SAPKs (Laderoute and Webster, 1997) nebo proteinkinázu p38 (Kulisz et al., 2002) (Obr. 4).

Mitogenem aktivované kinázy (MAPK) jsou rodina kináz, které hrají důležitou roli v přenosu extracelulárních stimulů do buňky pomocí několika po sobě jdoucích fosforylací. MAP kinázová dráha je aktivována řadou extracelulárních ale i intracelulárních stimulů a jedním z nich jsou i ROS (Kwon et al., 2006).



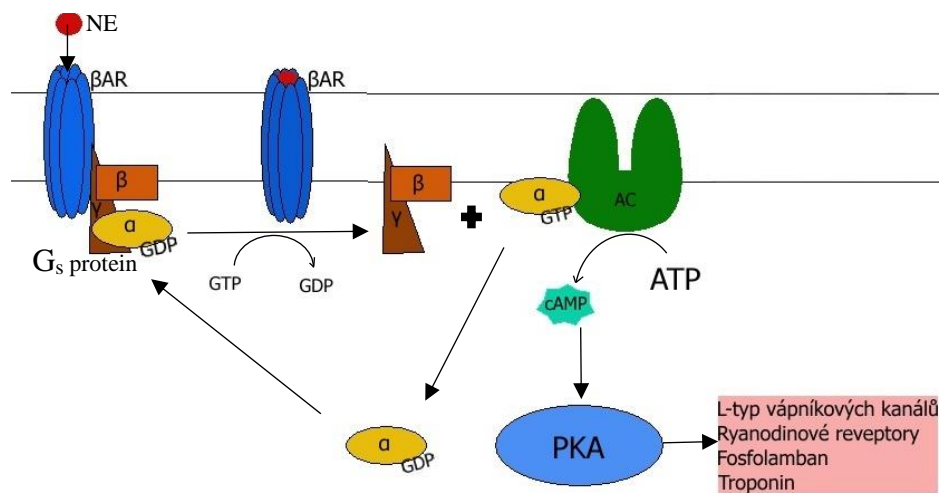
Obrázek 4: Aktivace MAPK drah – kinázová kaskáda, upraveno podle Son et al. (2011)

MAPK/ERK signální dráhu aktivuje tyrozinkinázový receptor po navázání ligandu (růstového faktoru). Receptor aktivuje Ras-GTPázu, která aktivuje Raf kinázu. Raf fosforyluje MAP/ERK kinázu (MEK) a ta fosforyluje ERK. Receptor se ale může aktivovat nejen po navázání ligandu, ale také jako reakce na ROS (Nakashima et al., 2005). Bylo zjištěno, že oxidativní stres indukuje aktivaci EGF receptoru pomocí fosforylace receptoru, která je závislá na přítomnosti H_2O_2 (Meves et al., 2001).

2.4 ADRENERGNÍ SYSTÉM V SRDCI

Srdeční kontraktilita je řízena několika systémy. Mezi ně patří skupina receptorů, které jsou spřažené se stimulačním Gs proteinem a aktivují AC (β AR, serotoninové a histaminové receptory), další skupinou jsou receptory, které inhibují AC pomocí Gi proteinu (muskarinové a adenosinové receptory) a poslední skupinou jsou receptory spřažené s proteinem Gq/11, jehož α podjednotka aktivuje PLC a PKC (α AR, endotelinové a angiotensinové receptory) (Brodde et al., 2006).

β -Adrenergní systém v srdci patří k hlavním regulátorům srdeční kontraktility (Obr. 5). Noradrenalin se váže na adrenergní receptory, které změnou konformace aktivují spřažený G protein. Od toho se oddělí $G\alpha$ podjednotka, která může aktivovat (nebo inhibovat – podle druhu G proteinu) adenylycyklázu. Aktivovaná AC tak začne produkovat druhého posla, cAMP, který se váže na PKA a tím umožní odštěpení regulační podjednotky PKA od katalytické podjednotky. Katalytická podjednotka se tak aktivuje a může fosforylovat cílové proteiny účastnící se kontrakce myokardu. Pomocí β AR jsou však aktivovány také některé další důležité signalizační dráhy.



Obrázek 5: β -Adrenergní signální systém; NE = noradrenalin, AC = adenylycykláza, PKA = proteinkináza A
 Upraveno podle Salazar et al. (2007) a https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/73/Activatoin-Adenylate_cyclase-outlined.svg

2.4.1 β -Adrenergní receptory

2.4.1.1 Struktura a klasifikace β AR

Adrenergní receptory patří do obrovské skupiny membránových receptorů, které jsou spřažené s G proteiny (GPCR). Dnes je známo téměř 800 lidských proteinů spadajících do rodiny GPCR (Jassal et al., 2010). Struktura je u všech GPCR velmi podobná. Receptory jsou tvořeny N-koncem na extracelulární straně, C-koncem na intracelulární straně a 7 hydrofobními transmembránovými úseky, které jsou spojeny třemi extracelulárními a třemi cytosolickými smyčkami (Hargrave et al., 1983). Nejvíce se GPCR shodují v transmembránových úsecích, naopak největší odlišnosti jsou u C- a N-konců a cytosolické smyčky mezi TM5 a TM6. Nejvariabilnější je však N-konec, který je hlavní strukturou pro rozpoznání ligandu receptorem (Kobilka, 2007).

AR jsou rozděleny do dvou podskupin α a β . Ačkoliv jsou v srdci zastoupeny oba typy AR, podíl β AR na řízení kontraktility srdečního svalu je vyšší než α AR. U α AR jsou rozlišovány podskupiny α_1 AR a α_2 AR, z nichž obě zahrnují ještě 3 podtypy (Piascik and Perez, 2001). U β AR rozlišujeme 3 podskupiny β_1 AR, β_2 AR a β_3 AR. V srdci se nacházejí všechny tři typy β AR, ale hlavní podíl na regulaci kontraktility mají β_1 AR a β_2 A. Ve zdravém lidském srdci převažují β_1 AR, které tvoří přibližně 80% z celkového množství β AR v srdci (Bristow et al., 1986).

β_1 AR i β_2 AR jsou spřaženy s Gs proteinem, ale β_2 AR může být navíc spřažen také s proteinem Gi, který inhibuje adenylycyklázu a může napomáhat antiapoptotickému působení na buňku (Communal et al., 1999; Xiao et al., 1995). Dále bývá β_2 AR efektivněji spřažen s G proteinem než β_1 AR (Levy et al., 1993). Stimulace β_2 AR může vést k aktivaci MAPK/ERK a PI3K/Akt signálních drah (Chesley et al., 2000).

2.4.1.2 Lokalizace receptorů na membráně, kaveoly

Zdá se, že pro specifickou signalizaci různých typů GPCR hraje významnou roli organizace receptorů, G proteinů i efektorů nebo regulačních proteinů do oddělených mikrodomén na membráně jako jsou lipidové rafty. Lipidové rafty jsou úseky membrány se zvýšeným podílem cholesterolu a sfingolipidů, často jsou obohaceny také o různé strukturní proteiny jako kaveoliny nebo flotiliny, které udržují signální komplexy pohromadě (Galbiati et al., 2001). Kromě strukturní funkce však kaveoliny mohou mít také regulační funkci a inhibovat některé ze signálních molekul, například PI3K (Zundel et al., 2000).

Jedním z mechanismů, který by mohl vysvětlit rozdílné signalizační procesy, ke kterým dochází po aktivaci β_1 AR a β_2 AR, je kompartmentalizace receptorů do buněčných mikrodomén. β_2 AR jsou totiž v neaktivovaném stavu umístěny v kaveolách a po aktivaci se přesouvají z kaveol, zatímco β_1 AR se vyskytují spíše v nekaveolárních úsecích a ani po aktivaci ligandem se jejich lokalizace příliš nemění (Rybin et al., 2000; Xiang et al., 2002). Stejně jako β_2 AR jsou v kaveolách koncentrovány také některé izoformy AC (5,6), $G_i\alpha$, regulační podjednotka PKA (Rybin et al., 2000) a GRK2 (Carman et al., 1999).

2.4.1.3 Dimerizace GPCR

Dnes existuje již značné množství důkazů o oligomerizaci GPCR. Molekulární organizace GPCR do monomerů, dimerů nebo oligomerů ovlivňuje funkční selektivitu receptoru, spřažení s G proteiny a lokalizaci receptoru a je tak ve farmakologii novým a významným faktorem (Ferré et al., 2014). I β AR se mohou vyskytovat v homodimerech a ve

tvorbě těchto dimerů jsou pravděpodobně zapojeny hydrofobní transmembránové domény (Hebert et al., 1996). U jiných GPCR však může tvorba dimerů probíhat odlišným způsobem, například pomocí disulfidických můstků u glutamátového receptoru (Tsuji et al., 2000).

GPCR tvoří pouze homodimery, ale také heterodimery. Mohou to být například heterodimery dvou blízké příbuzných podtypů GABA_B receptoru (Kuner, 1999), ale dimerizovat mohou také vzdáleněji příbuzné typy receptorů. β_1 AR může tvořit heterodimery s β_2 AR. Díky těmto heterodimerům se v buňkách snižovala internalizace β_2 AR po stimulaci agonistou a také se snížila aktivace ERK1/2 MAPK signální dráhy (Lavoie et al., 2002). Tvorba heterodimerů představuje nový regulační mechanismus, který dodává receptorům nové funkční vlastnosti.

2.4.2 G proteiny

G proteiny jsou proteiny vázající GTP, které se uplatňují v buněčné signalizaci. Existují malé monomerní G proteiny, které se účastní signalizace hlavně uvnitř buňky a mají řadu důležitých regulačních funkcí, a heterotrimerní G proteiny, které pomáhají v přenosu signálu z extracelulárního prostředí dovnitř buňky.

2.4.2.1 Struktura a klasifikace G proteinů

Skládají se z největší $G\alpha$ podjednotky, která má GTPázovou aktivitu, a ze dvou menších podjednotek $G\beta$ a $G\gamma$. $G\alpha$ podjednotka přijímá signál od receptoru a na základě toho ovlivňuje efektorový enzym. Skládá se z GTPázové domény a helikální domény. GTPázová doména zajišťuje navázání a štěpení nukleotidů a také navázání na $G\beta\gamma$, receptor i další proteiny. Mimo jiné obsahuje tři smyčky (switch I, II a III), u kterých se mění strukturní konformace v závislosti na tom, jestli je navázané GTP nebo GDP (Mixon et al., 1995).

Podjednotky $G\beta$ a $G\gamma$ vytváří heterodimerický komplex $G\beta\gamma$, který upevňuje celý protein k membráně pomocí lipidické modifikace jako je prenylace (Wedegaertner et al., 1995), ale také se může účastnit signalizace a aktivovat nebo inhibovat různé cílové proteiny (Bayewitch et al., 1998; Huang et al., 1995). $G\beta\gamma$ tak například mohou pozitivně nebo negativně regulovat funkci AC (Bayewitch et al., 1998; Tang and Gilman, 1991).

Dvacet identifikovaných $G\alpha$ podjednotek bylo na základě podobnosti v primární struktuře rozděleno do čtyř velkých rodin α_s , α_i , α_q a $\alpha_{12/13}$ (a podle nich je pak určeno i rozdělení G proteinů G_i , G_s , G_q , $G_{12/13}$) (Strathmann and Simon, 1991).

2.4.2.2 Aktivace G proteinu

Po navázání agonisty na receptor změní receptor konformaci a díky těsnému spřažení aktivuje G protein. Na inaktivní $G\alpha$ podjednotce G proteinu je uvolněno GDP, na jeho místo se může navázat GTP a $G\alpha$ podjednotka se aktivuje. Aktivovaná $G\alpha$ podjednotka se oddělí od komplexu $G\beta\gamma$ a může ovlivňovat cílové proteiny. Po nějaké době ale $G\alpha$ svojí GTPázovou aktivitou hydrolyzuje navázané GTP, čímž se inaktivuje a s navázaným GDP se $G\alpha$ vrací zpět k $G\beta\gamma$.

2.4.3 Adenylylcykláza

Adenylylcykláza (AC) je enzym uplatňující se v regulačních mechanismech téměř u všech buněk. Katalyzuje odštěpení pyrofosfátu z ATP, čímž vznikne 3',5'-cAMP, který v buňce zastává důležitou roli druhého posla. Struktura AC je tvořena dvěma transmembránovými doménami, z nichž každá se skládá z šesti hydrofobních helixů, a cytoplazmatickou doménou, tvořenou dvěma homologními laloky, které vytváří vazebné a katalytické místo pro nukleotidy.

Identifikováno bylo celkem 10 genů kódujících AC. 9 z těchto genů dává vznik membránově vázaným izoformám AC a jeden kóduje solubilní AC, jejíž struktura a funkce je zřejmě odlišná od ostatních izoform (Chen et al., 2000). Většina izoform je tkáňově specifických a liší se také způsobem regulace. Všechny izoformy jsou aktivovány α podjednotkou Gs proteinu a forskolinem a inhibovány jsou P-site inhibitory. Podle dalších regulačních vlastností jsou izoformy AC rozdělovány do čtyř skupin. Skupina 1 zahrnuje izoformy AC I, AC III a AC VIII a je stimulována navíc komplexem CaM/Ca^{2+} . Do skupiny 2 jsou zařazeny izoformy AC II, AC IV a AC VII, které jsou aktivovány PKC. Do skupiny 3 se řadí izoformy AC V a VI, které jsou inhibovány již velmi malými koncentracemi Ca^{2+} . Skupina 4 zahrnuje jedinou izoformu AC IX, která na rozdíl od ostatních není stimulována forskolinem a inhibována je kalcineurinem (Hanoune and Defer, 2001; Pavan et al., 2009).

AC V a AC VI jsou hlavními srdečními izoformami. AC V se nachází především v srdečních síních, zatímco AC VI je lokalizována v komorách i síních (Wang and Brown, 2004).

2.5 VLIV HYPOXIE NA β AR

Vliv hypoxie na počet β AR je poněkud nejasný. Podle in vivo studií se zvířaty se počet β AR po chronické nebo intermitentní hypoxii snižuje (Bernstein et al., 1990; Guan et

al., 2010; Voelkel et al., 1981). Regulace β AR v živých zvířatech může být ovlivněna zvýšenou hladinou katecholaminů spíše než samotnou hypoxií. Bylo však prokázáno, že hypoxie působí také vlastními účinky na β adrenergní dráhu (León-Velarde et al., 2001). Některé in vitro studie, kde je vliv sympatiku vyloučen, také popisují úbytek receptorů po působení hypoxie (Marsh and Sweeney, 1989), či úbytek receptorů na plazmatické membráně a současný nárůst β AR v cytosolické frakci (Rocha-Singh et al., 1991). Podle Bernsteinovy studie se množství β AR na plazmatické membráně v levé komoře po dvou týdnech hypoxie snižuje, ale jejich počet v cytosolické frakci se nemění (Bernstein et al., 1992).

Jiné studie však popisují naopak nárůst hladin mRNA β_1 AR u izolovaných srdečních myocytů a u izolovaného perfundovaného srdce (Ihl-Vahl et al., 1995; Li et al., 1996) a v některých dalších studiích nebyly pozorovány žádné změny v počtu β AR po působení hypoxie (Germack et al., 2002; Hrbasova et al., 2003).

Na regulaci β AR může mít vliv také jejich lokalizace – liší se mezi levou a pravou komorou (Kacimi et al., 1992). Pravá komora totiž po působení dlouhodobé hypoxie hypertrofuje (McGuire and Bradford, 1999), zatímco levá zůstává většinou nehypertrofovaná.

2.6 VLIV HYPOXIE NA G PROTEINY

Snížení odpovědi na β adrenergní signalizaci nemusí být dáno pouze změnami v β AR, ale hypoxie zřejmě indukuje změny také u dalších členů signální kaskády. Byl tak například pozorován nárůst $G_{i\alpha}$ podjednotky po pětidenním působení hypoxie (Mardon et al., 1998) a zvýšení exprese $G_{i\alpha}$ po několikadenní intermitentní hypoxii (Guan et al., 2010). U jiných studií však žádnou signifikantní změnu v množství proteinu $G_{i\alpha}$ nepozorovali, i když množství mRNA $G_{i\alpha}$ v pravé komoře bylo zvýšené (Kacimi et al., 1995; Pei et al., 2000).

Po chronické hypoxii byla v levé i pravé komoře naměřena snížená funkce G_s proteinu, avšak množství G_s proteinu v hypoxickém srdci zůstalo nezměněno (Kacimi et al., 1995). Po porovnání dvou odlišných sestřihových variant G_s proteinu byl pozorován úbytek $G_{s\alpha-S}$, biologicky aktivní, membránově vázané izoformy $G_{s\alpha}$ proteinu (Pei et al., 2000) a zvýšení cytosolického proteinu $G_{s\alpha-L}$ (Hrbasova et al., 2003).

2.7 VLIV HYPOXIE NA AC

Při adaptaci potkanů na chronickou hypoxii se také snižuje aktivita srdeční AC, zvláště u pravé komory (Hrbasova et al., 2003; Kacimi et al., 1992). U neonatálních potkaních

myocytů vystavených třídní hypoxii však změna v aktivitě AC pozorována nebyla (Li et al., 1996).

2.8 NAVOZENÍ CYTOPROTEKCE HYPOXIÍ

Hypoxie aktivuje řadu různých signálních drah, které regulují buněčnou proliferaci, diferenciaci a přežití nebo smrt. Bylo tak navrženo několik mechanismů, které by se mohly podílet na zvýšení odolnosti buněk proti stresu po působení hypoxie.

2.8.1 PI3K/Akt dráha

Signální dráha PI3K/Akt je jednou z nejlépe charakterizovaných signálních drah, ovlivňujících přežívání buňky u eukaryot. Její aktivace extracelulárními stimuly vede k expresi genů, jejichž úkolem je zajistit přežití buňky. PI3K signalizace je zodpovědná také za vznik srdeční hypertrofie, díky aktivaci tyrozinkinázovým receptorem (Crackower et al., 2002).

2.8.1.1 Struktura a klasifikace PI3K

PI3K je membránově vázaná proteinkináza. Jsou popsány celkem tři třídy PI3K, které jsou rozděleny na základě jejich struktury a substrátové specificity. Katalytické podjednotky všech typů PI3K mají homologní část, která se skládá z katalytické domény HR1 (homolog region), HR2 a C2 domény (Walker et al., 1999).

Kinázy třídy I jsou heterodimery a dělí se na podtřídy IA, které jsou aktivovány receptorovými tyrozinkinázami, a kinázy podtřídy IB, které jsou aktivovány receptory spřaženými s G proteiny (Sasaki et al., 2000). Také protein Ras může aktivovat některé PI3K třídy I (Pacold et al., 2000). Všechny kinázy typu I jsou v srdci exprimovány. Kinázy třídy II se nevyskytují volně v cytosolu, ale byly lokalizovány převážně poblíž plazmatické membrány (Prior and Clague, 1999). PI3K třídy III jsou homologní s kvasinkovým proteinem Vps34p, který se účastní třídění a dopravy proteinů (Volinia et al., 1995). Tyto PI3K jsou pravděpodobně zodpovědné za hlavní část PI3P produkovaného v buňkách a spíše než při signalizaci se uplatňují právě při transportu proteinů.

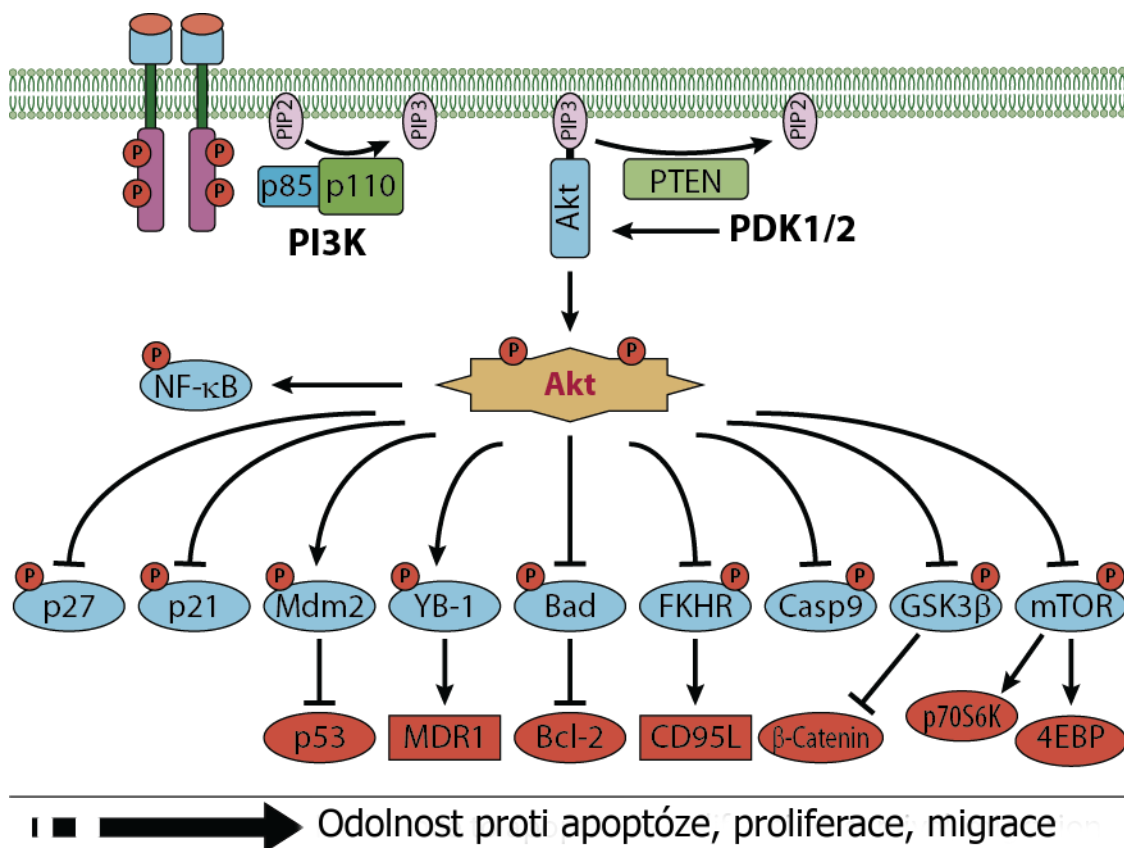
2.8.1.2 Mechanismus ochrany před apoptózou

Na rozdíl od většiny kináz nefosforyluje PI3K jenom proteiny, ale inositolfosfolipidy. Fosfatidylinositol je lipid, který může být reverzibilně fosforylován na různých částech své inositolové hlavičky a tak může vzniknout řada různých fosfoinositidů. Nejdůležitější je vznik fosfatidylinositol-3-fosfátu (PIP₃) z fosfatidylinositol-2-fosfátu (PIP₂). Při normálním stavu je

PIP₃ v membráně poměrně málo a jeho množství stoupá pouze při signalizaci. Na PIP₃ se pak váží intracelulární proteiny přes specifickou interakční doménu Pleckstrin homology domain (PH).

Velmi důležitým proteinem s PH doménou schopnou vázat se na PIP₃ a hlavním efektozem PI3K třídy I je Akt kináza (známá také jako proteinkináza B). Akt je kináza skládající se z N-koncové PH domény, centrální serin/threonin-kinázové domény a C-koncové regulační domény. Po aktivaci Akt fosforyluje různé proteiny v cytosolu i v jádře (Obr. 6). Tyto cílové proteiny většinou mívají apoptotické účinky a fosforylace těchto proteinů vede k jejich inaktivaci, čímž se zvyšuje přežívání buňky. Jedním z takových proteinů je protein Bad, který v aktivním (nefosforylovaném) stavu navozuje apoptózu pomocí proteinu Bax. Díky fosforylaci Akt kinázou vznikne vazebné místo pro scaffold protein 14-3-3, který fosforylovaný Bad protein sekvstruje.

Kromě toho podporuje PI3K/Akt dráha také buněčný růst a to pomocí komplexního systému serin-threoninových kináz TOR, které aktivují p70S6K, a tím indukují syntézu proteinů.



Obrázek 6: Akt kinázová signalizace, upraveno podle http://www.sfb773.de/images/pic_c5.png

2.8.1.3 PI3K/Akt při hypoxii

Při hypoxii u rakovinných plicních buněk je tato dráha aktivována (Lee et al., 2006) a adaptace na hypoxii se účastní pravděpodobně fosforylací HIF1 α , čímž zvyšuje jeho transkripční aktivitu. Aktivace PI3K/Akt dráhy po hypoxii byla prokázána například také u ledvinných epiteliálních buněk (Andreucci et al., 2003; Kwon et al., 2006) nebo u endoteliálních progenitorových buněk (Zhao et al., 2016). Výzkum na buňkách hladkého svalu však aktivaci této dráhy nepotvrdil (Loberg et al., 2002). Zdá se proto, že účinek hypoxie na tuto dráhu je tkáňově specifický.

2.8.1.4 Aktivace PI3K/Akt dráhy

PI3K signalizace je vysoce regulovaná a k nejvyšší aktivaci dochází během přechodu z embryonálního do neonatálního období. Nejnižší aktivitu má v dospělosti (Tseng et al., 2005).

PI3K/Akt dráha je aktivována růstovými faktory a některými cytokiny. Mimo to ale zvyšuje PI3K svoji aktivitu také po stimulaci β_2 AR (Chesley et al., 2000). V srdci byla in vivo pozorována aktivace PI3K a účastní se jí β_2 AR přes $G\alpha_i$, ale v její aktivaci jsou zapojeny také další molekuly: podjednotka $G\beta\gamma$, Src tyrozinkináza a PDGFR (Yano et al., 2007). Stejná stimulace však v jiných tkáních nezvyšovala aktivitu PI3K (Zhang et al., 2011).

Podjednotka $G\beta\gamma$ G proteinu přímo působí na katalytické podjednotky dvou různých izoform PI3K (PI3K γ a PI3K β), a regulační podjednotky kináz tak nejsou potřeba přímo pro aktivaci pomocí GPCR, nicméně regulační podjednotka p101 PI3K γ určuje preferenci kinázy k substrátu PI-4,5-P₂. (Maier et al., 1999). Aktivace PI3K γ zřejmě hraje důležitou roli v procesu desenzitizace a internalizace β AR. PI3K totiž interaguje s GRK-2 (G protein-coupled receptor kinase 2) (Naga Prasad et al., 2001) a zablokováním této interakce dojde k inhibici internalizace fosforylovaného receptoru (Naga Prasad et al., 2005).

2.8.2 Signální dráha MAPK/ERK

Další signální drahou, která by potenciálně mohla přispívat k cytoprotekci po působení hypoxie, je již výše zmiňovaná signální dráha MAPK/ERK. Po 12 hodinové hypoxii bylo v rakovinných plicních buňkách detekováno zvýšené množství ERK. A pomocí inhibice této dráhy byl také prokázán její antiapoptotický účinek (Lee et al., 2006). Zvýšení ERK bylo pozorováno také v renálních epiteliálních buňkách po působení hypoxie/reoxygenace, avšak samotná hypoxie její aktivaci naopak snižovala (Kwon et al., 2006).

3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

1. Charakterizace změn v distribuci β AR a AC v membránových mikrodoménách připravených z H2c2 buněk po působení hypoxie
2. Sledování vlivu hypoxie na viabilitu a redoxní stav H2c2 buněk
3. Sledování vlivu hypoxie na aktivaci vybraných signálních drah účastnících se cytoprotekce v H9c2 buňkách

4 MATERIÁL A METODY

4.1 BUŇKY

Použita byla buněčná linie potkaních embryonálních kardiomyoblastů H9c2. Buňky byly pěstovány při 37°C a 5 % CO₂ v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) od firmy Sigma-Aldrich obsahující 10 % fetálního bovinního séra (FBS). K buňkám bylo přidáváno 10 µl roztoku antibiotik a antimykotik (AAS, Sigma-Aldrich) do 10 ml média. Během pasážování byl k buňkám přidán roztok trypsin – EDTA ředěný s PBS v poměru 1:2.

Buňky byly na 24 h vkládány do hypoxického inkubátoru s nastavenou hladinou kyslíku na 2 %. Alespoň hodinu před vložením do hypoxie bylo k buňkám přidáno 10 ml média s obsahem 1 % FBS a 10 µl roztoku AAS. Po vyjmutí z inkubátoru byly kultivační lahve uzavřeny pevným víčkem, aby nedocházelo k okysličování, a buňky byly co nejrychleji sklizeny. Kontrolní skupina buněk byla 24 h ponechána s médiem s 1 % FBS v inkubátoru s normální hladinou kyslíku.

4.2 SKLÍZENÍ A HOMOGENIZACE BUNĚK

4.2.1 Roztoky

TMES	20 mM Tris (pH 7,4) 3 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 250 mM sacharóza
PBS	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ H ₂ O doplněno do 1000 ml pH 7,4

4.2.2 Pracovní postup:

Buňky byly škrabkou seškrábány z flašek za přítomnosti vychlazeného PBS a stočeny na centrifuze po dobu 10 minut rychlostí 1 800 rpm a teplotě 4°C. Pelet byl resuspendován pufrům TMES a k němu byl přidán inhibitor proteáz (Complete Protease Inhibitor Cocktail), aby se zabránilo nežádoucímu rozštěpení proteinů, a inhibitory fosfatáz (Phosphatase Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich), aby nedocházelo k defosforylaci proteinů. Buňky byly

homogenizovány pomocí injekční jehly a stříkačky, homogenát byl opět stočen na centrifuze rychlostí 1 800 rpm při 4°C po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant (post-nukleární supernatant, PNS) se odsál a byl zamražen v tekutém dusíku a uložen do -80°C v mrazáku pro pozdější analýzy.

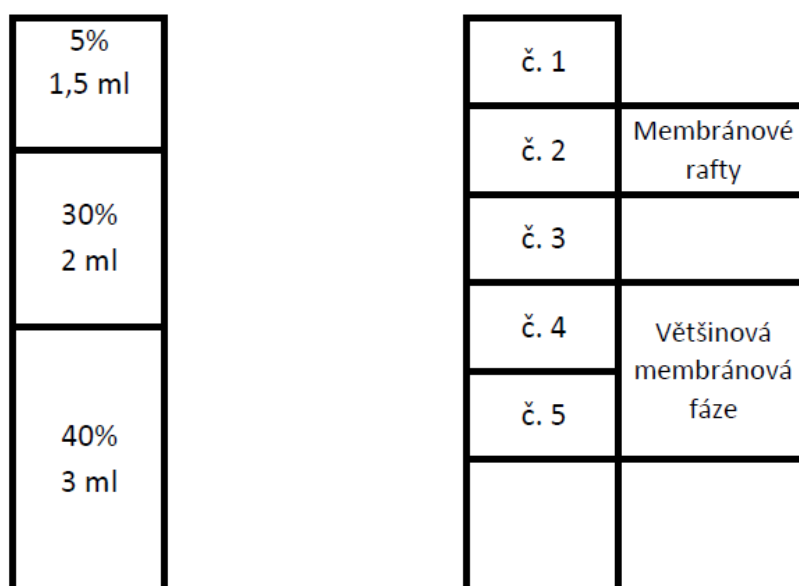
4.3 IZOLACE MEMBRÁNOVÝCH RAFTŮ

4.3.1 Roztoky

TME	20 mM Tris (0,48 g) 3 mM MgCl ₂ (0,12 g) 1 mM EDTA (0,06 g) H ₂ O doplněno do 200 ml
-----	---

4.3.2 Pracovní postup:

Postup pro izolaci membránových raftů byl upraven podle metody Macdonald and Pike, 2005. Vzorek PNS byl naředěn na objem 1 ml a koncentraci 3 µg/µl a poté na ledu sonikován 3 x 20 s při intenzitě 20 %. Tento materiál byl napipetován do centrifugační zkumavky a smíchán s 2 ml 60% OptiPrepu, takže výsledná koncentrace OptiPrepu byla 40%. Následně byl tento vzorek převrstven 2 ml 30% OptiPrepu a 1,5 ml 5% OptiPrepu naředěného v TME pufru. Po 2 hodinách centrifugace při 30 600 rpm (160 000 g) a teplotě 4°C byl gradient shora rozebrán na pět 1-ml frakcí (Obr. 7).



Obrázek 7: Schematické znázornění hustotního gradientu OptiPrepu v centrifugační zkumavce. Vlevo: hustotní gradient OptiPrepu před centrifugací, vpravo: označení jednotlivých frakcí po centrifugaci

Předpokládaná lokalizace membránových raftů je ve frakci číslo 2. Jako vzorky obsahující většinou membránovou fázi byly použity frakce číslo 4 a 5. Pro potvrzení úspěšné izolace membránových raftů byly ve všech frakcích detekovány markery membránových raftů pomocí elektroforézy a Western blotingu.

4.4 STANOVENÍ PROTEINŮ – METODA BCA

4.4.1 Roztoky

Činidlo A	8 g monohydrátu uhličitanu sodného 1,6 g vlnanu sodného H ₂ O doplněno do 100 ml pH 11,25
Činidlo B	3 g bicinchoninové kyseliny (BCA) H ₂ O doplnit do 100 ml
Činidlo C	0,5 g pentahydrátu síranu měďnatého H ₂ O doplnit do 10 ml
Pracovní roztok	1 díl činidla C, 25 dílů činidla B, 26 dílů činidla A

4.4.2 Pracovní postup

Vzorky byly naředěny destilovanou vodou v poměru 1 : 99. Do mikrotitrační destičky byly nanášeny standardy (bovinní serumalbumin, BSA) podle tabulky 1, podle kterých pak byla sestavena kalibrační křivka, a vzorky v triplicátech. Do každé jamky bylo přidáno 100 μ l pracovního roztoku a destička se nechala 30 minut inkubovat při 60°C. Poté byly vzorky změřeny na spektrofotometru Synergy HT při vlnové délce 562 nm. Data byla vyhodnocena pomocí programu Gen 5.

Tabulka 1: Nanášení standardů BSA

μ g BSA		0	0,2	0,5	1	1,5	2,5	4	6	10	15	20	30	50
BSA [0,1 μ g/ μ l]	μ l	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	-
BSA [1 μ g/ μ l]	μ l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50
H ₂ O	μ l	100	98	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70	50

4.5 SDS-PAGE ELEKTROFORÉZA

4.5.1 Roztoky

Pufr 1	18,17 g Tris-HCl H ₂ O doplněno do 100 ml pH 8,8
Pufr 2	6,05 g Tris-HCl H ₂ O doplnit do 100 ml pH 6,8
30% akrylamid	30 g akrylamidu 0,8 g N,N'-methylenbisakrylamidu H ₂ O doplněno do 1 000 ml
Running pufr, 10x konc.	30,3 g Tris-HCl 141,1 g glycinu 10 g dodecylsírany sodného (SDS) H ₂ O doplněno do 1 000 ml
Laemmliho vzorkový pufr, 4x konc.	2,4 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8) 1 ml glycerolu 0,8 g SDS 0,8 g dithiothreitolu (DTT) 1 mg bromfenolové modři H ₂ O doplněno do 10 ml

4.5.2 Příprava vzorků

Vzorky byly naředěny vzorkovým Laemmliho pufrem v poměru 3 : 1 na výslednou koncentraci 4 µg/µl. Poté byly vzorky povařeny při 100°C po dobu 2 minut.

4.5.3 Pracovní postup

Podle velikosti detekovaných proteinů byly připraveny 10% nebo 15% dělicí gely (Tab. 2). Ty byly převrstveny malým množstvím buthanolu a ponechány asi 45 minut polymerovat. Poté byl buthanol slit a jeho zbytky byly smyty vodou. Zbylá voda byla vysušena filtračním papírem. Na dělicí gel byl přidán 4% zaostřovací gel (Tab. 2) a do něj vložen rozdělovací hřebínek, který v gelu vytvořil jamky pro nanesení vzorků. Dělicí gel byl nechán asi 20 minut polymerovat.

Tabulka 2: Složení SDS-polyakrylamidových gelů

	10% dělicí gel	15% dělicí gel	4% zaostřovací gel
H ₂ O	8 ml	4,7 ml	6 ml
Pufř 1	5 ml	5 ml	-
Pufř 2	-	-	2,5 ml
30% Ac-Bis	6,7 ml	10 ml	1,3 ml
10% SDS	200 μ l	200 μ l	100 μ l
10% APS	90 μ l	90 μ l	90 μ l
TEMED	8 μ l	8 μ l	8 μ l

Do jamek v takto připravených gelech se nanášely vzorky a molekulární standardy. Elektroforéza probíhala 1 hodinu při konstantním napětí 200 V.

4.6 WESTERN BLOTING A IMUNODETEKCE

4.6.1 Roztoky

Blotovací pufř	15 g Tris 72 g glycinu 1 000 ml methanolu H ₂ O doplněno do 5 000 ml
TBS pufř, 10x koncentrovaný	84,15 g NaCl 11,63 g Tris H ₂ O doplněno na 960 ml pH 8
Blokovací pufř	2,5 g sušeného mléka 50 ml TBS pufřu 50 μ l Tweenu
Ředící pufř	0,5 g sušeného mléka 50 ml TBS pufřu 50 μ l Tweenu
Promývací pufř	1000 ml TBS pufřu 3 ml Tweenu

4.6.2 Pracovní postup

Proteiny z gelů byly po elektroforéze přenášeny na nitrocelulóзовou membránu pomocí metody Western blotting. Blotování probíhalo 1 hodinu při napětí 100 V. Pro kontrolu nanášky byly nitrocelulóзовé membrány po blotování obarveny Ponceau barvivem. Po oskenování obarvené membrány bylo barvivo opět vymyto vodou a membrány byly vloženy do blokovacího pufru přibližně na 20 minut. Do ředícího pufru byly přidány primární protilátky (ředěny byly dle tabulky 3) a do nich pak byly vloženy membrány. Inkubace v primárních protilátkách probíhala přes noc při teplotě 4°C.

Po vyjmutí z primárních protilátek byly membrány omývány 3 x 10 minut v promývacím pufru. Mezitím byly připraveny sekundární protilátky naředěné 40 000x (Anti-R) nebo 20 000x (Anti-mouse) v ředícím pufru. V sekundárních protilátkách se membrány nechaly inkubovat 1 hodinu a potom byly opět promývány 3 x 10 minut v promývacím pufru. Na závěr byl k membránám přidán substrát pro křenuvou peroxidázu a potom se membrány nechaly ve tmě exponovat různě dlouhou dobu na film, který byl potom vyvolán. Filmy byly oskenovány a data byla vyhodnocena v programu ImageJ.

Tabulka 3: Seznam použitých protilátek

Primární protilátky			
protilátka	označení	ředění	Sekundární protilátka
AC 5/6	sc-590	500x	Anti-R
Akt	sc-8312	2 000x	Anti-R
p-Akt	D9E*	3 000x	Anti-R
Bax	sc-526	2 000x	Anti-R
Bcl-2	sc-492	2 000x	Anti-R
β1-AR	sc-568	1 000x	Anti-R
β2-AR	sc-569	1 000x	Anti-R
Caveolin1	sc-894	10 000x	Anti-R
CD71	sc-9099	1 000x	Anti-R
ERK 1/2	137F5*	10 000x	Anti-R
p-ERK 1/2	197G2*	1 000x	Anti-R
Integrin β1	sc-8978	2 000x	Anti-R
Kaspáza-3	sc-7272	2 000x	Anti-mouse Sc-2380

sc = Santa Cruz Biotechnology, * = Cell Signaling Technology; Anti-R = anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-linked (GE Healthcare, UK)

4.7 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE (FACS)

4.7.1 Roztoky

PBS	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ H ₂ O doplněno do 1000 ml pH 7,4
-----	--

4.7.2 Pracovní postup

Pro metodu průtokové cytometrie byly buňky pěstovány v šestijamkových destičkách. Médium bylo odsáto z jamek a uschováno z každé jamky zvlášť. Do jamek bylo přidáno asi 400 μ l roztoku trypsin – EDTA (v poměru 1:2), který na buňky působil 5 minut při teplotě 37°C. Poté bylo buňkám přidáno 500 μ l PBS a vše bylo smícháno médiem z odpovídající jamky. Vzorky byly točeny 3 minuty na centrifuze rychlostí 1000 rpm při teplotě 4°C. Pelet byl resuspendován v 200 μ l PBS a buňky byly přibližně spočítány pomocí mikroskopu. Potom byly vzorky přefiltrovány na 96 jamkovou destičku tak, aby každý obsahoval kolem 150 000 buněk. Destička byla stočena na centrifuze rychlostí 1250 rpm, 3 minuty při teplotě 4°C. K buněčnému peletu bylo přidáno 100 μ l Annexin vázajícího pufru (ABB) a 1 μ l Annexinu V Dy647. Po 20 minutové inkubaci ve tmě byla destička opět točena na centrifuze po dobu 3 minut rychlostí 1250 rpm při 4°C. K buněčnému peletu bylo přidáno 150 μ l ABB, 15 μ l barviva Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) a vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru.

4.8 DETEKCE ROS POMOCÍ FLUORESCENČNÍCH BARVIV

4.8.1 Roztoky

DHE 10 mM zásobní roztok	32 mg DHE 10 ml DMSO
H ₂ DCFDA 10 mM zásobní roztok	48,7 mg H ₂ DCFDA 10 ml DMSO
PBS	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ H ₂ O doplněno do 1000 ml pH 7,4

4.8.2 Pracovní postup

Zásobní roztoky DHE a H₂DCFDA byly naředěny s PBS na 1 mM pracovní roztoky. Pro detekování kyslíkatých radikálů (ROS) byly buňky pěstovány v šestijamkových kultivačních destičkách. Po působení hypoxie bylo k buňkám do média přidáno fluorescenční barvivo dihydroethidium ve finální koncentraci v jamce 20 μM nebo H₂DCFDA ve finální koncentraci v jamce 10 μM. Inkubace probíhala ve tmě při 37°C. Po 30 minutách byly buňky dvakrát propláchnuty PBS a s 1 ml PBS pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem. Kultury normoxických i hypoxických buněk byly fotografovány vždy při stejném nastavení mikroskopu a parametrů LCD kamery, aby byla zajištěna srovnatelnost získaných výsledků.

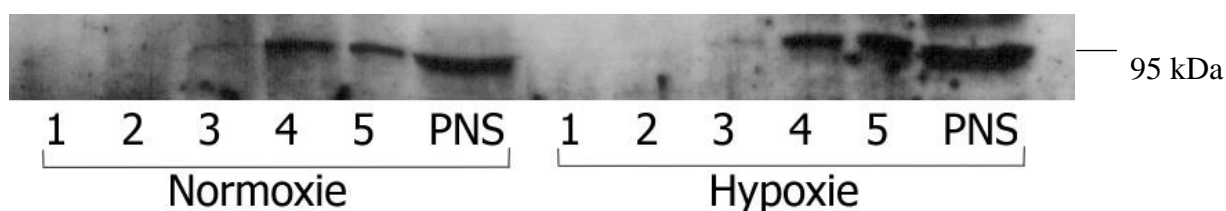
4.9 ANALÝZA DAT

Naměřená data byla vyhodnocena v programu GrapPad Prism 6 a vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka ze tří nezávislých experimentů. K určení statistické významnosti byla použita analýza pomocí nepárového Studentova t-testu. Statistická významnost byla určena na hladině $p < 0,05 - 0,001$.

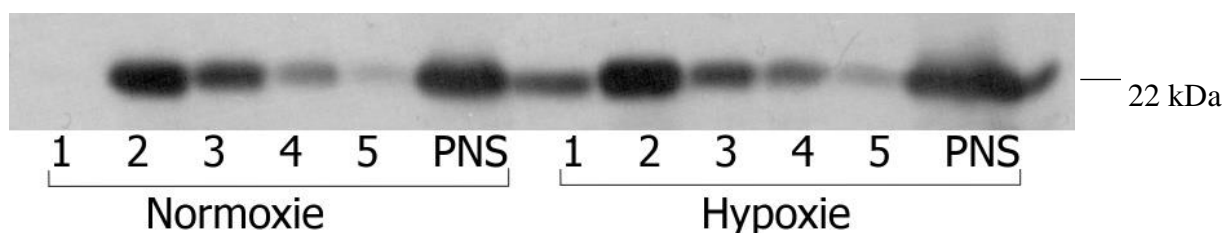
5 VÝSLEDKY

5.1 OVĚŘENÍ ÚSPĚŠNÉ IZOLACE MEMBRÁNOVÝCH RAFTŮ

Po izolaci membránových raftů byly ve vzorcích pomocí elektroforézy a Western blotingu detekovány markery membránových raftů (kaveolin 1) a neraftových frakcí membrán (CD71). Protein CD71 (transferinový receptor) nebyl vůbec detekován v první ani druhé frakci odebrané z gradientu OptiPrepu. V malém množství byl detekován až ve třetí frakci a jeho množství se ve čtvrté a páté frakci dále zvyšovalo (Obr. 8). Raftový marker kaveolin 1 byl v první frakci přítomný jen v malé míře nebo vůbec. Nejsilnější signál byl detekován u druhé frakce a dále se jeho množství snižovalo (Obr. 9).



Obrázek 8: Reprezentativní imunoblot ukazující distribuci proteinu CD71 mezi membránovými frakcemi u H9c2 buněk vystavených normoxickým a hypoxickým podmínkám

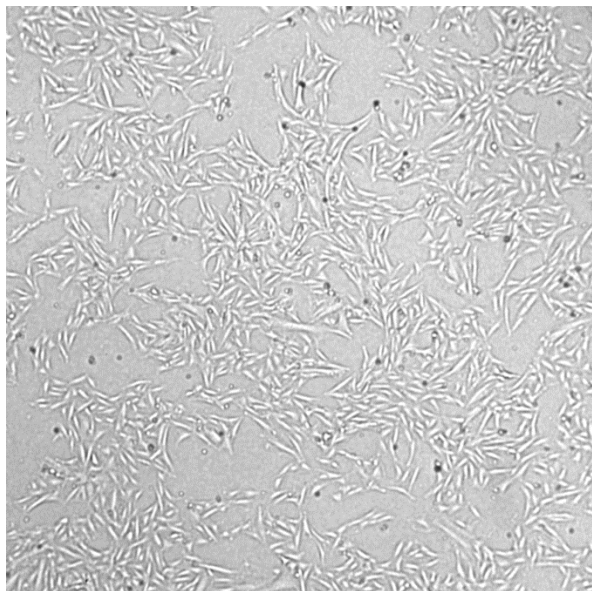


Obrázek 9: Reprezentativní imunoblot ukazující distribuci proteinu kaveolinu 1 mezi membránovými frakcemi u H9c2 buněk vystavených normoxickým a hypoxickým podmínkám

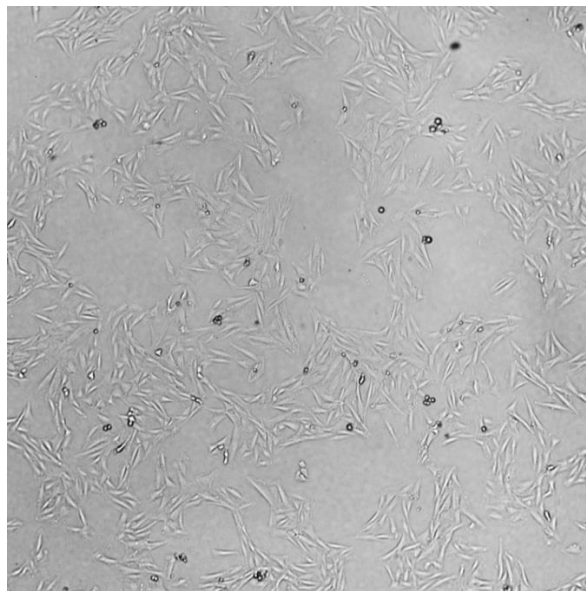
Membránové rafty by měly být podle předpokladu přítomny ve vzorcích z druhé frakce. Podle toho, že v této frakci bylo detekováno nejvyšší množství raftového markeru kaveolinu 1 a naopak žádné množství markeru pro neraftové frakce membrán proteinu CD71, lze říci, že izolace membránových raftů byla úspěšná.

5.2 FOTOGRAFIE BUNĚK

Buňky H9c2 byly vyfotografovány v plastových kultivačních lahvích pomocí invertovaného mikroskopu vybaveného LCD kamerou.



Obrázek 10: Buňky H9c2 před působením hypoxie

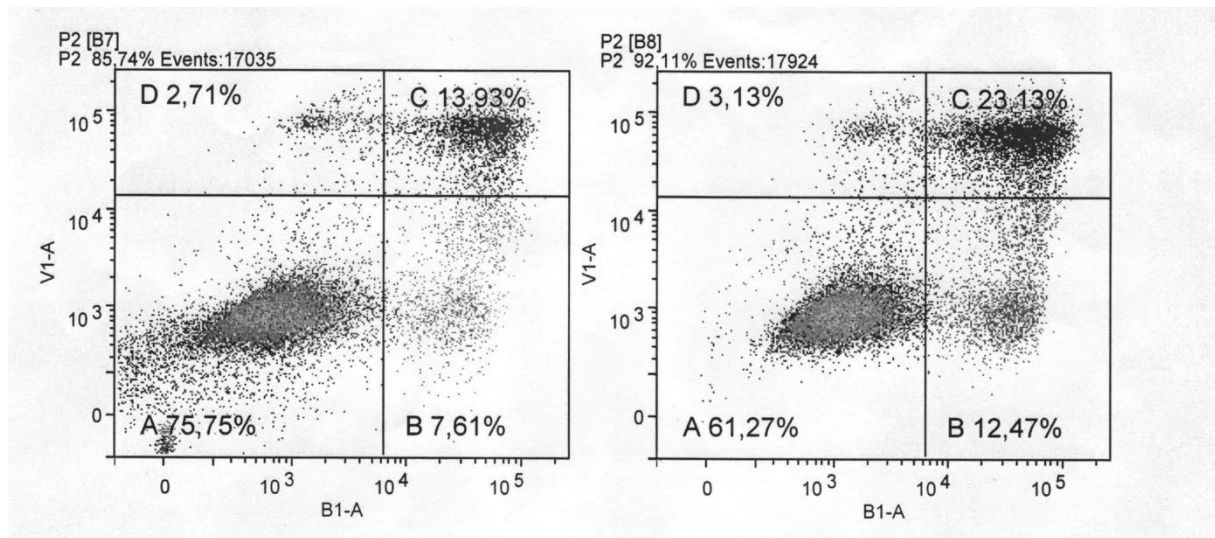


Obrázek 11: Buňky H9c2 po 24h působení hypoxie (2 % O₂)

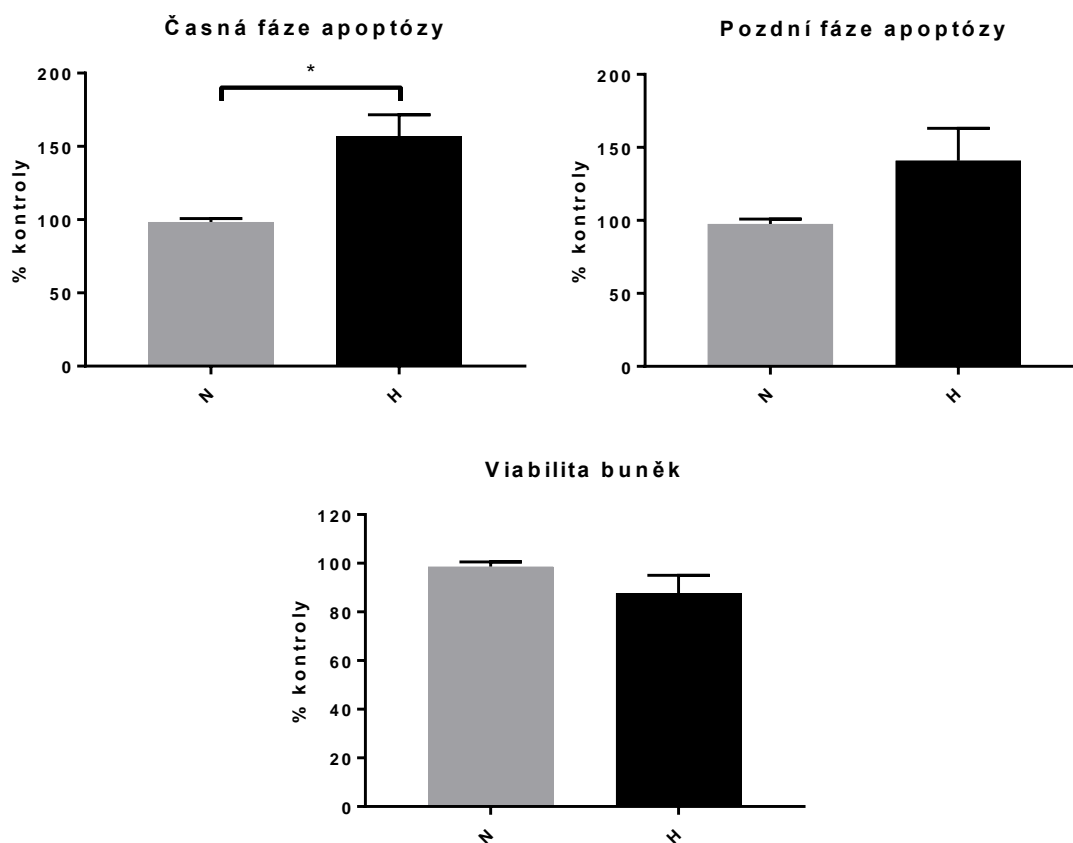
Snímky byly pořízeny před a po vystavení buněk hypoxii 2 % O₂. Na fotografiích je patrné mírné snížení denzity buněk po působení hypoxie (Obr. 10 a 11).

5.3 VÝZKUM VLIVU HYPOXIE NA VIABILITU BUNĚK POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

U buněčné linie H9c2 byl pomocí průtokové cytometrie s použitím barviv Annexinu V Dy647 a Hoechstu 33258 měřen vliv hypoxie 2 % O₂ po dobu 24 hodin na viabilitu buněk a míru apoptózy a nekrózy.



Graf 1: Reprezentativní výsledek z průtokové cytometrie. Vlevo normoxické buňky, vpravo buňky po 24h působení hypoxie 2% O₂. B1-A = buňky obarvené Annexinem, V1-A = buňky obarvené Hoechstovým barvivem; Pole A = živé buňky, pole B = buňky ve fázi časné apoptózy, pole C = buňky ve fázi pozdní apoptózy, pole D = nekrotické buňky



Graf 2: Grafické znázornění vlivu 24h hypoxie 2% O₂ na viabilitu a míru apoptózy buněk vystavených normoxickým (N) a hypoxickým (H) podmínkám

Oproti kontrolní skupině se po působení hypoxie lehce snížila viabilita buněk (Graf 1, pole A; Graf 2). Statistická významnost rozdílu však byla zamítnuta ($p = 0,14$). Počet apoptotických buněk v časně fázi apoptózy (Graf 1, pole B; Graf 2) se u buněk vystavených hypoxii zvedl ($*p < 0,05$). Také počet buněk v pozdní fázi apoptózy (Graf 1, pole C; Graf 2) se zvýšil, ale statistická významnost rozdílu byla zamítnuta ($p = 0,08$).

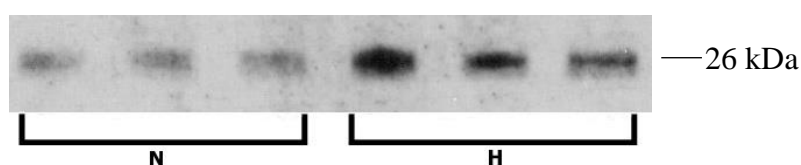
5.4 DETEKCE VYBRANÝCH PROTEINŮ POMOCÍ ELEKTROFORÉZY A WESTERN BLOTINGU

5.4.1 Apoptotické markery

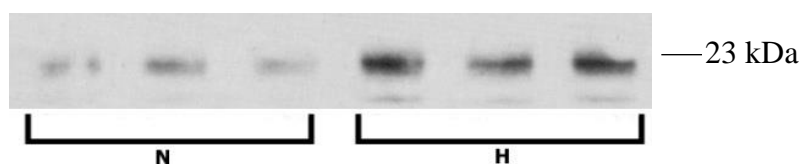
Pomocí elektroforézy a Western blotingu byly v PNS buněk linie H9c2 vystavených hypoxii a v PNS normoxických, kontrolních, buněk detekovány hladiny apoptotických markerů: proteinů Bcl-2, Bax a kaspázy 3.

5.4.1.1 Bcl-2/Bax

Ve vzorcích z buněk vystavených hypoxii byly detekovány signifikantně vyšší hladiny obou proteinů Bcl-2 (***) i Bax (***) oproti normoxickým buňkám (Obr. 12 a 13). Poměr proteinů Bcl-2/Bax byl u vzorků připravených z hypoxických buněk nižší než u normoxických buněk a docházelo tedy k vyšší produkci pro-apoptotického proteinu Bax u hypoxických buněk (Tab. 4).



Obrázek 13: Reprezentativní imunoblot ukazující expresi proteinu Bcl-2 ve vzorcích H9c2 buněk vystavených normoxickým (N) a hypoxickým (H) podmínkám



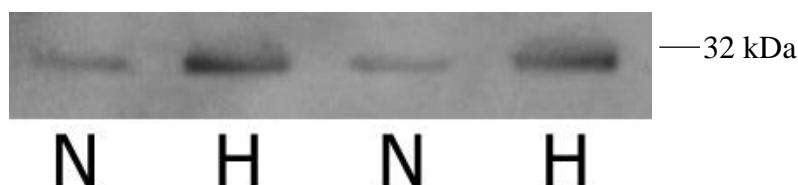
Obrázek 12: Reprezentativní imunoblot ukazující expresi proteinu Bax ve vzorcích H9c2 buněk vystavených normoxickým (N) a hypoxickým (H) podmínkám

Tabulka 4: Poměr exprese proteinů Bcl-2/Bax

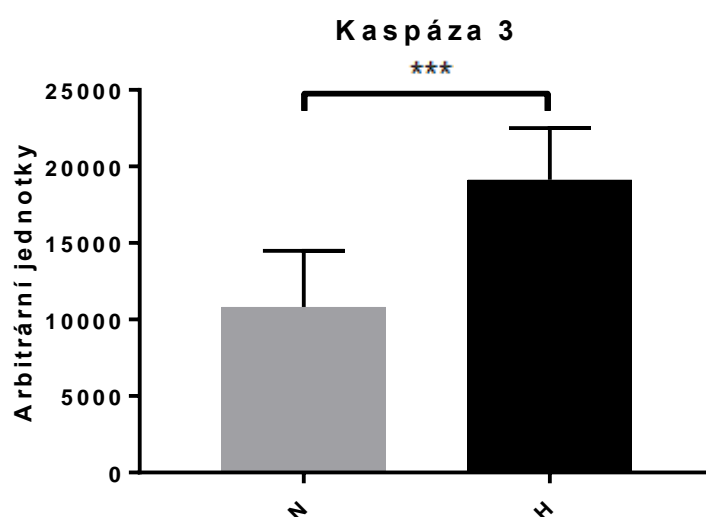
	Normoxie	Hypoxie
Poměr Bcl-2/Bax	0,9	0,71

5.4.1.2 Kaspáza 3

Ve vzorcích z hypoxických buněk bylo detekováno zvýšené množství proteinu kaspázy 3 oproti vzorkům z normoxických buněk (Obr. 14, Graf 3). Zvýšení bylo vyhodnoceno jako signifikantní na hladině významnosti $***p < 0,001$.



Obrázek 14: Reprezentativní imunoblot ukazující expresi proteinu kaspáza 3 ve vzorcích H9c2 buněk vystavených normoxickým (N) a hypoxickým (H) podmínkám



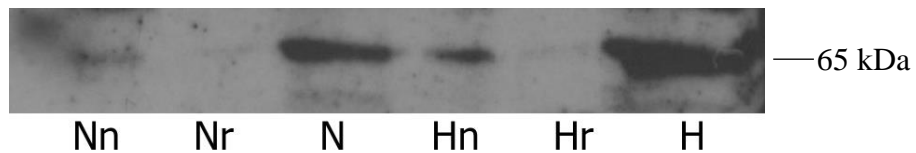
Graf 3: Grafické znázornění exprese kaspázy 3 ve vzorcích buněk vystavených normoxickým (N) a hypoxickým (H) podmínkám

5.4.2 β AR a AC

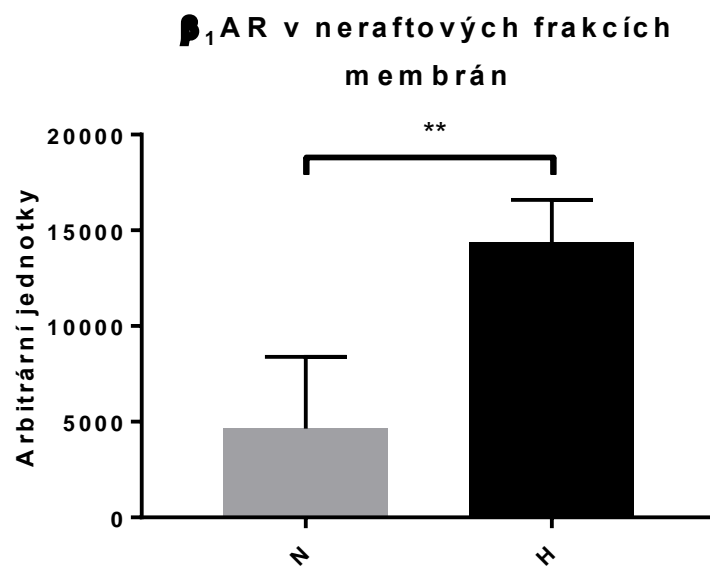
Pomocí elektroforézy a Western blotingu byly detekovány hladiny proteinů β_1 AR, β_2 AR a AC V/VI ve vzorcích izolovaných membránových raftů a v neraftových frakcích membrán z buněk buněčné linie H9c2 vystavených 2 % O_2 a z buněk normoxických.

5.4.2.1 β IAR

β_1 AR byly ve vzorcích z hypoxických i normoxických buněk detekovány především v neraftových částech membrán (Obr. 15). V membránových raftech byl signál β_1 AR jen minimální, většinou neměřitelný. Počet β_1 AR v membránových raftech ve vzorcích z hypoxických buněk byl signifikantně zvýšený na hladině významnosti $**p = 0,001$ oproti vzorkům z normoxických buněk (Graf 4).



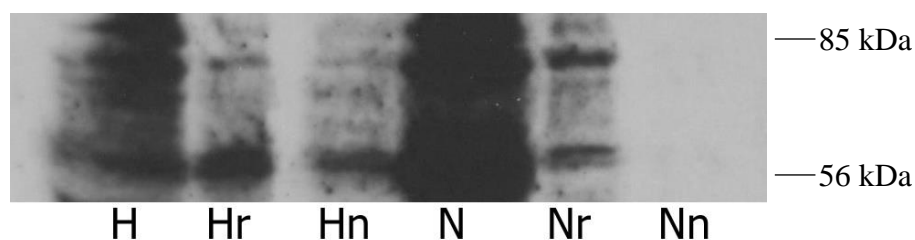
Obrázek 15: Reprezentativní imunoblot ukazující expresi β IAR a jejich distribuci mezi jednotlivými membránovými frakcemi; Nn = Normoxie neraftová frakce, Nr = Normoxie raftová frakce, N = Normoxie PNS, Hn = Hypoxie neraftová frakce, Hr = Hypoxie raftová frakce, H = Hypoxie PNS



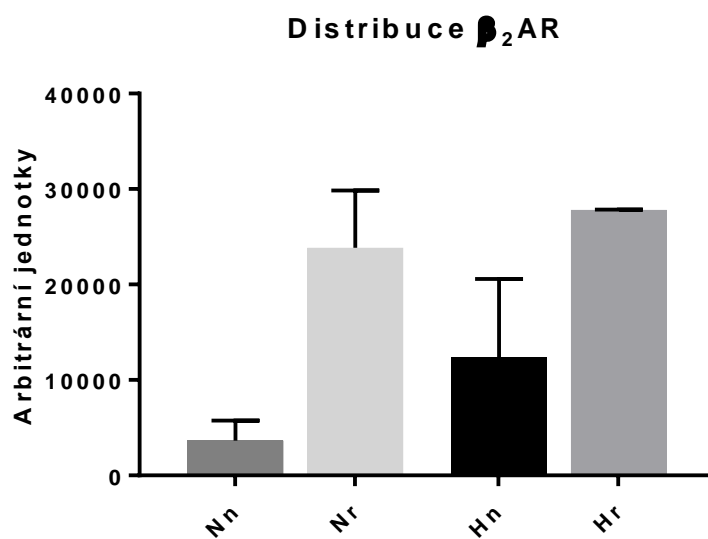
Graf 4: Grafické znázornění exprese β IAR v neraftových frakcích membrán; H = hypoxie, N = normoxie

5.4.2.2 β_2AR

β_2AR byly detekovány u normoxických buněk především v raftových doménách. V neraftových částech membrány nebyly u normoxických buněk detekovány téměř žádné β_2AR . U vzorků z hypoxických buněk byly β_2AR detekovány jak v raftových tak neraftových částech membrány (Obr. 16, Graf 5).



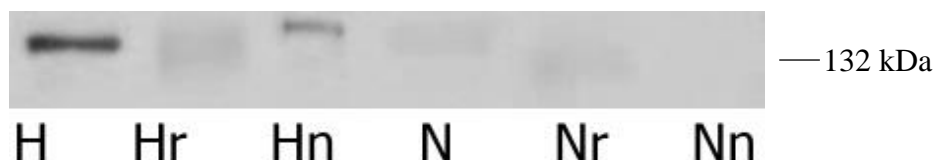
Obrázek 16: Repräsentativní imunoblot ukazující expresi β_2AR a jejich distribuci mezi jednotlivými membránovými frakcemi; H= Hypoxie PNS, Hr = Hypoxie raftová frakce, Hn = Hypoxie neraftová frakce, N = Normoxie PNS, Nr = Normoxie raftová frakce, Nn = Normoxie neraftová frakce



Graf 5: Grafické znázornění distribuce β_2AR v membránových doménách; Hn = Hypoxie neraftová frakce, Hr = Hypoxie raftová frakce, Nn = Normoxie neraftová frakce, Nr = Normoxie raftová frakce

5.4.2.3 AC V/VI

AC V/VI se nepodařilo dobře detekovat. V neraftových frakcích membrány nebyla u normoxických buněk detekována vůbec. Z dostupných výsledků je patrné, že množství AC V/VI je v raftových frakcích membrány u hypoxických buněk vyšší než u normoxických (Obr. 17). Rovněž celkové množství AC V/VI v PNS se zdá být zvýšeno u buněk vystavených hypoxii.



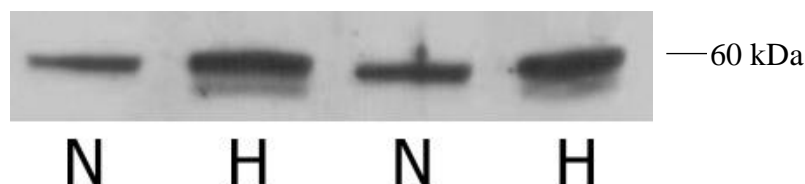
Obrázek 17: Reprezentativní imunoblot ukazující expresi AC V/VI a jejich distribuci mezi jednotlivými membránovými frakcemi; H= Hypoxie PNS, Hr = Hypoxie raftová frakce, Hn = Hypoxie neraftová frakce, N = Normoxie PNS, Nr = Normoxie raftová frakce, Nn = Normoxie neraftová frakce

5.4.3 Kinázy

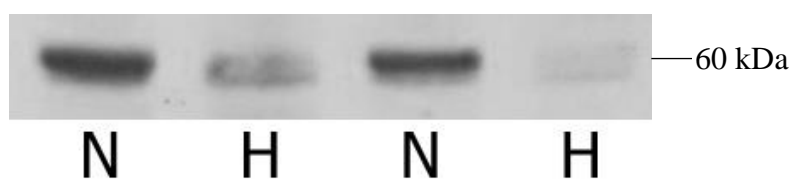
V PNS buněk linie H9c2 vystavených hypoxii a v PNS normoxických buněk byly pomocí elektroforézy a Western blotingu detekovány hladiny kináz Akt a ERK1/2 a jejich fosforylovaných forem.

5.4.3.1 Akt, p-Akt

Hladiny Akt kinázy byly ve vzorcích z hypoxických buněk zvýšené oproti normoxickým buňkám (**p < 0,01) (Obr. 18). Naproti tomu hladiny fosforylované Akt kinázy byly u hypoxických buněk nižší než u normoxických (***p < 0,001) (Obr. 19). Poměr Akt/p-Akt byl signifikantně vyšší u vzorků z hypoxických buněk (***p < 0,001) (Tab. 5).



Obrázek 18: Reprezentativní imunoblot ukazující expresi proteinu Akt ve vzorcích H9c2 buněk vystavených normoxickým (N) a hypoxickým (H) podmínkám



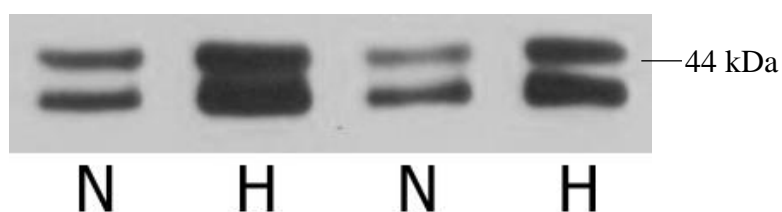
Obrázek 19: Reprezentativní imunoblot ukazující expresi proteinu p-Akt ve vzorcích H9c2 buněk vystavených normoxickým (N) a hypoxickým (H) podmínkám

Tabulka 5: Poměry exprese proteinů Akt/p-Akt

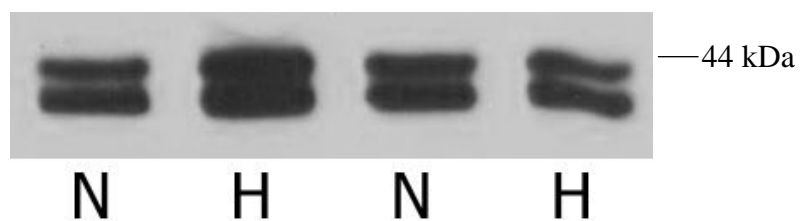
	Normoxie	Hypoxie
Akt/p-Akt	0,75	2,85

5.4.3.2 ERK 1/2, p-ERK 1/2

Hladiny kinázy ERK 1/2 byly signifikantně vyšší u vzorků z hypoxických buněk než u vzorků z normoxických buněk ($***p < 0,001$) (Obr. 20). Hladiny p-ERK 1/2 nevykazovaly mezi hypoxickými a normoxickými buňkami signifikantní rozdíl (Obr. 21). Poměr ERK/p-ERK byl signifikantně vyšší u vzorků z hypoxických buněk ($***p < 0,001$) (Tab. 6).



Obrázek 20: Reprezentativní imunoblot ukazující expresi proteinu ERK 1/2 ve vzorcích H9c2 buněk vystavených normoxickým (N) a hypoxickým (H) podmínkám



Obrázek 21: Reprezentativní imunoblot ukazující expresi proteinu p-ERK 1/2 ve vzorcích H9c2 buněk vystavených normoxickým (N) a hypoxickým (H) podmínkám

Tabulka 6: Poměr mezi expresí proteinů ERK/p-ERK

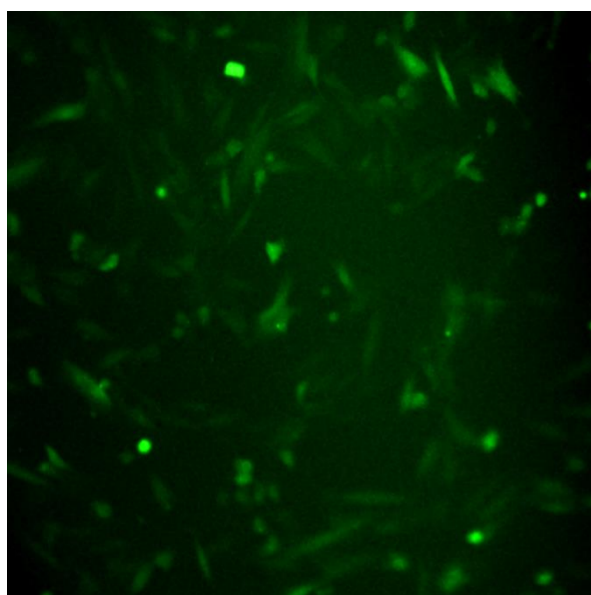
	Normoxie	Hypoxie
ERK/p-ERK	0,46	1,12

5.5 DETEKCE ROS – POMOCÍ FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

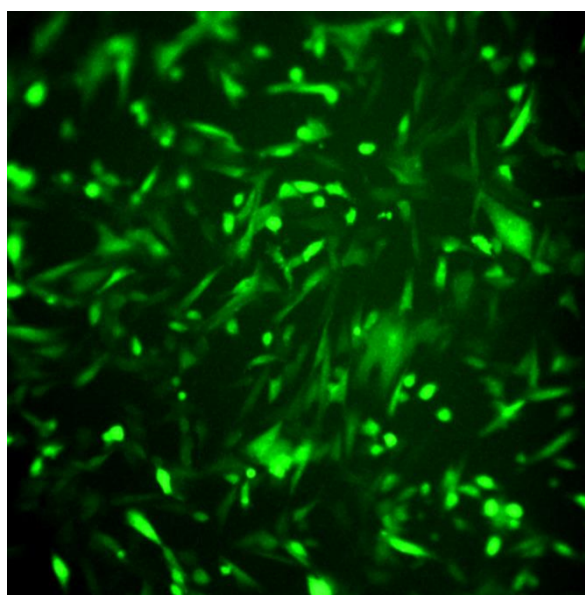
V buňkách buněčné linie H9c2 byla po 24h působení hypoxie (2 % O₂) a u normoxických buněk pozorována tvorba ROS pomocí fluorescenčních sond DHE a H₂DCFDA.

5.5.1 Barvení fluorescenční sondou H₂DCFDA

Fluorescenční sonda 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (H₂DCFDA) diacetát je používána pro hlavně detekci H₂O₂. V redukovaném stavu vstoupí do buňky, kde je díky ROS oxidována, začne vydávat fluorescenci a již neprochází přes membránu. Tato sonda byla využita pro detekci H₂O₂ v buňkách H9c2 vystavených hypoxii a v buňkách normoxických.



Obrázek 22: Normoxické buňky

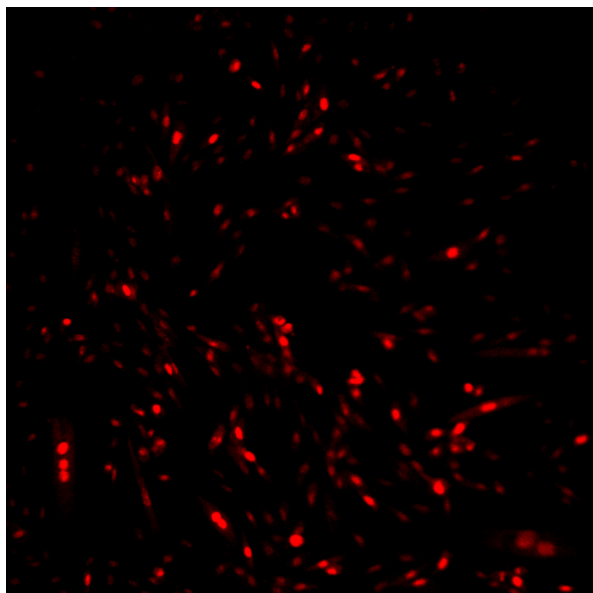


Obrázek 23: Buňky po vystavení hypoxii 2 % O₂, 24 h

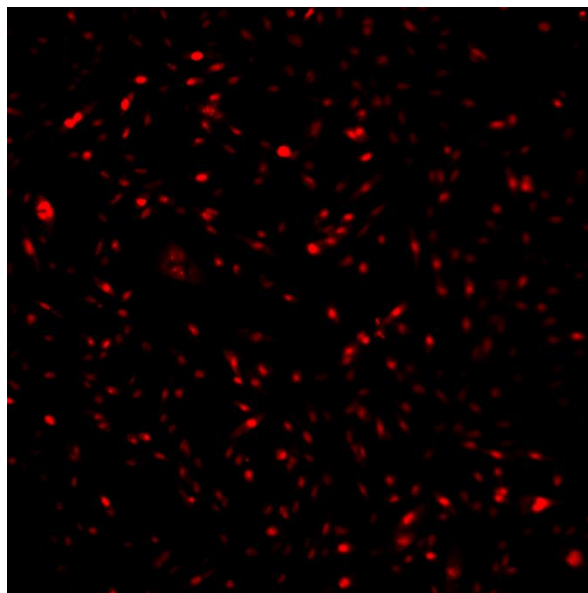
Fluorescence buněk vystavených na 24 h hypoxii po obarvení fluorescenční sondou H₂DCFDA byla zřetelně vyšší než u normoxických buněk (Obr. 22 a 23).

5.5.2 Barvení fluorescenční sondou DHE

Fluorescenční sonda dihydroethidium (DHE) je v buňce oxidována superoxidovým radikálem $O_2^{\cdot-}$ a poté reaguje s DNA a obarví jádro. DHE jsme využili pro detekci tvorby $O_2^{\cdot-}$ v normoxických buňkách a v buňkách vystavených hypoxii.



Obrázek 24: Normoxické buňky



Obrázek 25: Buňky po vystavení hypoxii 2 % O_2 24 h

Po obarvení buněk fluorescenční sondou DHE se nepodařilo detekovat žádné významnější rozdíly mezi buňkami ovlivněnými 24h hypoxií a buňkami normoxickými (Obr. 24 a 25).

6 DISKUZE

Cílem této práce bylo sledovat vliv 24h hypoxie (2 % O₂) na několik buněčných systémů u buněčné linie kardiomyoblastů H9c2. Sledována byla exprese markerů apoptózy Bcl-2, Bax a kaspázy 3, exprese a změna v distribuci vybraných členů adrenergní signalizace (β_1 a β_2 adrenergních receptorů a adenylcyklázy typu V a VI) a změny v expresi a fosforylaci kinázových signálních drah PI3K/Akt a MAPK/ERK, které by se mohly podílet na potenciálních příznivých účincích navozených hypoxií. V rámci této práce byl dále sledován vliv hypoxie na viabilitu buněk a indukci apoptózy a nekrózy pomocí průtokové cytometrie. Zajímala nás také tvorba kyslíkatých radikálů po působení hypoxie, která byla sledována pomocí fluorescenční mikroskopie.

Hladiny proteinů Bcl-2 i Bax byly po působení hypoxie podle našich výsledků z Western blotingu signifikantně zvýšeny. Oba proteiny působí proti sobě, zatímco Bcl-2 brání nástupu apoptózy (Brunelle and Letai, 2009), Bax jejímú spuštění napomáhá. Zdá se tedy, že hypoxií jsou aktivovány jak mechanismy pro-apoptotické, tak i mechanismy zabraňující apoptóze. Po porovnání poměrů Bcl-2/Bax u hypoxických a normoxických buněk bylo zjištěno, že u hypoxických buněk dochází k většímu zvýšení exprese proteinu Bax, a tak u nich převládají spíše pro-apoptotické signály. Zvýšení pro-apoptotického proteinu Bax po působení hypoxie bylo pozorováno také v in vivo studii z roku 2006 (Mishra et al., 2006). Zvýšená pro-apoptotická signalizace byla potvrzena také při sledování exprese kaspázy 3. Kaspáza 3 je efektorová kaspáza, která je aktivována iniciačními kaspázami a uplatňuje se v pozdních fázích apoptózy. V buňkách po 24h hypoxii bylo naměřeno signifikantní zvýšení její exprese, což je také v souladu s dalšími studiemi (Khurana et al., 2002).

Pomocí metod elektroforézy a Western blotingu byla dále pozorována distribuce β AR mezi membránovými frakcemi v hypoxických a normoxických buňkách. β_1 AR se podle údajů v literatuře vyskytují převážně v neraftových frakcích membrán (Rybin et al., 2000). Podle našich výsledků nebyly β_1 AR v neraftových frakcích membrán normoxických ani hypoxických buněk detekovány. V raftových frakcích se β_1 AR vyskytovaly a u hypoxických buněk bylo navíc detekováno signifikantní navýšení hladin β_1 AR oproti normoxickým buňkám.

β_2 AR se vyskytují naopak spíše v membránových raftech a po aktivaci se jejich lokalizace může měnit (Rybin et al., 2000). Také v našich pokusech byly u normoxických

buněk β_2 AR detekovány pouze v membránových raftech. To se však změnilo u hypoxických buněk, kde byly β_2 AR detekovány nejen v raftových frakcích, ale v menší míře také ve frakcích neraftových.

Podle našich výsledků se po působení 24h hypoxie zvyšuje celkové množství β_1 AR i β_2 AR, což je zajímavé zjištění, protože podle velké části dřívějších studií by mělo po působení hypoxie docházet naopak k úbytku receptorů (León-Velarde et al., 2001). Existují však i studie popisující zvýšení hustoty β AR (Li et al., 1996). Vliv hypoxie na distribuci β AR mezi membránovými frakcemi se projevil pouze u β_2 AR, kde se část receptorů přesouvala do neraftových částí membrán, zatímco u β_1 AR nebyla pozorována žádná změna v distribuci receptorů.

Také u AC byly sledovány změny v distribuci mezi membránovými frakcemi pomocí elektroforézy a Western blotingu. Detekce AC se však příliš nezdařila, což mohlo být způsobeno například malou výtěžností buněk H9c2 a výslednou nízkou koncentrací proteinu ve vzorcích. Nicméně podle získaných výsledků se zdá, že AC je lokalizována převážně v raftových frakcích membrán. Po působení hypoxie se množství AC v raftových frakcích membrán mírně zvýšilo. U vzorků PNS bylo zvýšení exprese AC u hypoxických buněk ještě zřetelnější. Podle literatury může být AC lokalizována v membránových raftech i mimo ně (Rybin et al., 2000). Je tedy otázka, jestli naše výsledky, poukazující na lokalizaci pouze v raftových frakcích, jsou dány nízkou koncentrací proteinů ve vzorcích. Odlišnost našich výsledků může také souviset s použitou metodikou pro přípravu lipidických raftů. Existují různé druhy membránových mikrodomén a vlastnosti těchto útvarů závisí na způsobu jejich izolace (Pike, 2009). V tomto ohledu by bylo dobré uskutečnit další experimenty.

Pomocí elektroforézy a Western blotingu byla u PNS z buněk hypoxických a normoxických sledována také exprese kinázy Akt. Po 24h působení hypoxie docházelo ke zvýšení exprese Akt kinázy. Pro aktivaci signální dráhy je potřeba fosforylace Akt kinázy, což se však v našich pokusech nepodařilo prokázat. Hladiny fosforylované Akt kinázy byly mnohem nižší oproti normoxickým buňkám a také poměr Akt/p-Akt naznačuje vyšší aktivaci (fosforylaci) u normoxických buněk.

Podle našich výsledků byla exprese kinázy ERK po vystavení hypoxii výrazně zvýšena, zatímco hladiny fosforylované ERK byly téměř shodné u hypoxických i normoxických buněk. Poměr ERK/p-ERK byl opět vyšší u normoxických buněk.

Podobné výsledky byly získány i ve studii z roku 2006 (Kwon et al., 2006), ve které se fosforylace kináz Akt a ERK po působení hypoxie snižovala. Existuje však i řada prací, podle kterých hypoxie zvyšovala fosforylaci Akt kinázy (Alvarez-Tejado et al., 2001; Chen et al., 2001) i kinázy ERK (Minet et al., 2000; Osorio-Fuentealba et al., 2009). Výsledky další studie (Beitner-Johnson et al., 2001), zkoumající vliv 6h hypoxie o různých hladinách kyslíku, však poukazují na to, že při nižší míře hypoxie se sice fosforylace Akt kinázy zvedá, ale nejvyšší hodnoty p-Akt byly naměřeny u 5 % O₂ a při dalším snížení, na 1 % O₂, se již míra fosforylace začala opět snižovat. Podobně také výsledky další studie (Lo et al., 2001) ukazují, že při krátkém působení hypoxie dochází k dočasné fosforylaci ERK, ale s prodloužením doby hypoxie hladiny p-ERK opět klesají. Zdá se tedy, že při mírnějším nebo kratším působení hypoxie může docházet k fosforylaci ERK a Akt kinázy, ale v našich podmínkách, kdy hypoxie o koncentraci kyslíku 2% na buňky působila 24 hodin, k aktivaci cytoprotektivní dráhy PI3K/Akt a MAPK/ERK již nedochází.

Vliv hypoxie na viabilitu buněk byl pozorovatelný již ze snímků z mikroskopu, kde je patrné mírné snížení denzity buněk. Lehké snížení viability buněk bylo potvrzeno také pomocí průtokového cytometru, i když výsledek nevyšel statisticky signifikantně. Pomocí průtokové cytometrie byl zjištěn také nárůst buněk v časně i pozdní fázi apoptózy, čemuž odpovídají i výsledky z Western blotingu, kde byly detekovány zvýšené hladiny apoptotických markerů. Nekrózu však hypoxie u buněk nevyvolávala.

Fluorescenční sonda H₂DCFDA může ve svém redukovaném stavu procházet membránou do buňky. Tam je díky zvýšenému množství ROS (především H₂O₂, v menší míře i některé další ROS) oxidována a přeměněna na fluorescenční DCF. Po obarvení touto sondou vykazovaly hypoxické buňky mnohem vyšší míru fluorescence ve srovnání s normoxickými buňkami, což potvrzuje zvýšení tvorby ROS vlivem hypoxie pozorované v celé řadě studií (Chandel et al., 1998; Duranteau et al., 1998; Wilhelm et al., 1999).

Fluorescenční sonda DHE je používána k detekci O₂^{-•}. DHE má v cytosolu modrou fluorescenci a po oxidaci reaguje s buněčnou DNA a změní barvu, takže obarví červeně jádra. Na našich snímcích po obarvení fluorescenční sondou DHE se neprojevuje žádný znatelný rozdíl v produkci O₂^{-•} mezi hypoxickými a normoxickými buňkami. Vzhledem k tomu, že tvorba ROS byla dobře znatelná u fluorescenční sondy H₂DCFDA, je nepravděpodobné, že by k produkci O₂^{-•} nedocházelo. O₂^{-•} vzniklý v matrix mitochondrie je ve stejném kompartmentu také eliminován a jen část O₂^{-•} se dostává do cytosolu (Han et al., 2001), a proto se možná nepodařilo fluorescenční sondou DHE detekovat žádné zvýšení tvorby O₂^{-•} po hypoxii.

7 ZÁVĚR

Výsledky této práce ukazují, že vystavení koncentraci kyslíku 2 % po dobu 24 hodin působí značné změny v buněčné signalizaci H9c2 kardiomyoblastů. Snižuje se viabilita buněk a buňky podstupují apoptózu, což bylo potvrzeno nejen pomocí průtokové cytometrie, ale také pomocí Western blotingu detekcí apoptotických markerů. Bylo prokázáno, že se po hypoxii značně zvyšuje exprese pro-apoptotických proteinů kaspázy 3 a Bax.

U β -adrenergního systému dochází ke zvýšení exprese β AR i AC a dochází k přesunu β_2 AR z membránových raftů do neraftových částí membrán. Aktivace protektivních kinázových signálních drah nebyla potvrzena. Expese kinázy Akt a ERK byla sice navýšena, ale hladiny jejich fosforylovaných forem byly u ERK stejné u hypoxických i normoxických buněk a hladiny p-Akt byly detekovány dokonce nižší u buněk vestavených hypoxii ve srovnání s normoxickými buňkami.

Ze získaných výsledků vyplývá, že hypoxické podmínky 2 % O₂ sice nevyvolávají u buněk okamžitou smrt, avšak delší působení buňkám neprospívá a neprojevují se u nich protektivní mechanismy, ale naopak převládají signální procesy navozující apoptózu. V námi zvolených hypoxických podmínkách se sice cytoprotekce nepotvrdila, avšak i tak poslouží tato práce jako základ dalších experimentů, které mohou pomoci k rozluštění složitých adaptačních mechanismů na molekulární úrovni, které v buňkách hypoxie vyvolává.

8 LITERATURA

- Alvarez-Tejado, M., Naranjo-Suarez, S., Jimenez, C., Carrera, A.C., Landazuri, M.O., del Peso, L., 2001. Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells: Protective role in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 22368–22374. doi:10.1074/jbc.M011688200
- Andreucci, M., Michael, A., Kramers, C., Park, K.M., Chen, A., Matthaeus, T., Alessandrini, A., Haq, S., Force, T., Bonventre, J. V., 2003. Renal ischemia/reperfusion and ATP depletion/repletion in LLC-PK1 cells result in phosphorylation of FKHR and FKHRL1. *Kidney Int.* 64, 1189–1198. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00204.x
- Barja, G., 1999. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 347–66.
- Bauer, M.K.A., Vogt, M., Los, M., Siegel, J., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K., 1998. Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APO-1/Fas) ligand expression. *J. Biol. Chem.* 273, 8048–8055. doi:10.1074/jbc.273.14.8048
- Bayewitch, M.L., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Pfeuffer, T., Nevo, I., Simonds, W.F., Vogel, Z., 1998. Inhibition of adenylyl cyclase isoforms V and VI by various Gbetagamma subunits. *FASEB J.* 12, 1019–25.
- Beckman, K.B., Ames, B.N., 1998. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol. Rev.* 78, 547–581.
- Beitner-Johnson, D., Rust, R.T., Hsieh, T.C., Millhorn, D.E., 2001. Hypoxia activates Akt and induces phosphorylation of GSK-3 in PC12 cells. *Cell. Signal.* 13, 23–27. doi:10.1016/S0898-6568(00)00128-5
- Bernstein, D., Doshi, R., Huang, S., Strandness, E., Jasper, J.R., 1992. Transcriptional regulation of left ventricular beta-adrenergic receptors during chronic hypoxia. *Circ. Res.* 71, 1465–1471. doi:10.1161/01.RES.71.6.1465
- Bernstein, D., Voss, E., Huang, S., Doshi, R., Crane, C., 1990. Differential regulation of right and left ventricular beta-adrenergic receptors in newborn lambs with experimental cyanotic heart disease. *J. Clin. Invest.* 85, 68–74. doi:10.1172/JCI114435
- Boveris, A., 1977. Mitochondrial Production of Superoxide Radical and Hydrogen Peroxide. *Adv. Exp. Med. Biol.* 78, 67-82. doi:10.1007/978-1-4615-9035-4_5
- Bristow, M.R., Ginsburg, R., Umans, V., Fowler, M., Minobe, W., Rasmussen, R., Zera, P., Menlove, R., Shah, P., Jamieson, S., 1986. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ. Res.* 59, 297–309. doi:10.1161/01.RES.59.3.297
- Brodde, O.-E., Bruck, H., Leineweber, K., 2006. Cardiac Adrenoceptors: Physiological and pathophysiological relevance. *J. Pharmacol. Sci. J Pharmacol Sci* 100, 323–337. doi:10.1254/jphs.CRJ06001X
- Brunelle, J.K., Letai, A., 2009. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J. Cell Sci.* 122, 437–41. doi:10.1242/jcs.031682
- Carman, C. V., Lisanti, M.P., Benovic, J.L., 1999. Regulation of G protein-coupled receptor kinases by caveolin. *J. Biol. Chem.* 274, 8858–8864. doi:10.1074/jbc.274.13.8858

- Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C., Schumacker, P.T., 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 11715–20. doi:10.1073/pnas.95.20.11715
- Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., Schumacker, P.T., 2000. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 during hypoxia: A mechanism of O₂ sensing. *J. Biol. Chem.* 275, 25130–25138. doi:10.1074/jbc.M001914200
- Chen, E.Y., Mazure, N.M., Cooper, J.A., Giaccia, A.J., 2001. Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer Res* 61, 2429–2433. doi:10.1074/jbc.271.30.17771
- Chen, Y., Cann, M.J., Litvin, T.N., Iourgenko, V., Sinclair, M.L., Levin, L.R., Buck, J., 2000. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* 289, 625–628. doi:10.1126/science.289.5479.625
- Chesley, A., Lundberg, M.S., Asai, T., Xiao, R.-P., Ohtani, S., Lakatta, E.G., Crow, M.T., 2000. The beta2-Adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through Gi-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-Kinase. *Circ. Res.* 87, 1172–1179. doi:10.1161/01.RES.87.12.1172
- Communal, C., Singh, K., Sawyer, D.B., Colucci, W.S., 1999. Opposing Effects of β 1- and β 2-Adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis. Role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation* 100, 2210–2212. doi:10.1161/01.CIR.100.22.2210
- Crackower, M.A., Oudit, G.Y., Koziaradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., Hirsch, E., Suzuki, A., Shioi, T., Irie-Sasaki, J., Sah, R., Cheng, H.-Y.M., Rybin, V.O., Lembo, G., Fratta, L., Oliveira-dos-Santos, A.J., Benovic, J.L., Kahn, C.R., Izumo, S., Steinberg, S.F., Wymann, M.P., Backx, P.H., Penninger, J.M., 2002. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* 110, 737–749. doi:10.1016/S0092-8674(02)00969-8
- Dunwoodie, S.L., 2009. The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev. Cell* 17, 755–73. doi:10.1016/j.devcel.2009.11.008
- Duranteau, J., Chandel, N.S., Kulisz, A., Shao, Z., Schumacker, P.T., 1998. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 11619–11624. doi:10.1074/jbc.273.19.11619
- Ferré, S., Casadó, V., Devi, L.A., Filizola, M., Jockers, R., Lohse, M.J., Milligan, G., Pin, J.-P., Guitart, X., 2014. G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol. Rev.* 66, 413–34. doi:10.1124/pr.113.008052
- Galbiati, F., Razani, B., Lisanti, M.P., 2001. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 106, 403–411. doi:10.1016/S0092-8674(01)00472-X
- Germack, R., Leon-Velarde, F., De La Barra, R.V., Farias, J., Soto, G., Richalet, J.P., 2002. Effect of intermittent hypoxia on cardiovascular function, adrenoceptors and muscarinic receptors in Wistar rats. *Exp. Physiol.* 87, 453–460. doi:10.1111/j.1469-445X.2002.tb00058.x
- Guan, Y., Gao, L., Ma, H., Li, Q., Zhang, H., Yuan, F., Zhou, Z., Zhang, Y., 2010. Chronic intermittent hypobaric hypoxia decreases beta-adrenoceptor activity in right

- ventricular papillary muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 1267–1272. doi:10.1152/ajpheart.00410.2009.
- Guyton, K.Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., Holbrook, N.J., 1996. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J. Biol. Chem.* 271, 4138–42.
- Guzy, R.D., Hoyos, B., Robin, E., Chen, H., Liu, L., Mansfield, K.D., Simon, M.C., Hammerling, U., Schumacker, P.T., 2005. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing, *Cell Metabolism*. doi:10.1016/j.cmet.2005.05.001
- Hägerhäll, C., 1997. Succinate: quinone oxidoreductases: Variations on a conserved theme. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1320, 107–141. doi:10.1016/S0005-2728(97)00019-4
- Han, D., Williams, E., Cadenas, E., 2001. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem. J.* 353, 411–6.
- Hanoune, J., Defer, N., 2001. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 145–174. doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.145
- Hargrave, P.A., McDowell, J.H., Curtis, D.R., Wang, J.K., Juszczak, E., Fong, S.-L., Mohana Rao, J.K., Argos, P., 1983. The structure of bovine rhodopsin. *Biophys. Struct. Mech.* 9, 235–244. doi:10.1007/BF00535659
- Hebert, T.E., Moffett, S., Morello, J.-P., Loisel, T.P., Bichet, D.G., Barret, C., Bouvier, M., 1996. A peptide derived from a beta₂-Adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J. Biol. Chem.* 271, 16384–16392. doi:10.1074/jbc.271.27.16384
- Hrbasova, M., Novotny, J., Hejnova, L., Kolar, F., Neckar, J., Svoboda, P., 2003. Altered myocardial Gs protein and adenylyl cyclase signaling in rats exposed to chronic hypoxia and normoxic recovery. *J. Appl. Physiol.* 94, 2423–2432. doi:10.1152/jappphysiol.00958.2002
- Hu, Y., Ding, L., Spencer, D.M., Núñez, G., 1998. WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J. Biol. Chem.* 273, 33489–33494. doi:10.1074/jbc.273.50.33489
- Huang, C.-L., Slesinger, P.A., Casey, P.J., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 1995. Evidence that direct binding of Gβγ to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. *Neuron* 15, 1133–1143. doi:10.1016/0896-6273(95)90101-9
- Ihl-Vahl, R., Marquetant, R., Bremerich, J., Strasser, R.H., 1995. Regulation of beta-adrenergic receptors in acute myocardial ischemia: subtype-selective increase of mRNA specific for beta 1-adrenergic receptors. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27, 437–52.
- Jassal, B., Jupe, S., Caudy, M., Birney, E., Stein, L., Hermjakob, H., D'Eustachio, P., 2010. The systematic annotation of the three main GPCR families in Reactome. *Database J. Biol. Databases Curation* 2010, baq018. doi:10.1093/database/baq018
- Kacimi, R., Moalic, J.M., Aldashev, A., Vatner, D.E., Richalet, J.P., Crozatier, B., 1995. Differential regulation of G protein expression in rat hearts exposed to chronic hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 269, H1865-1873.

- Kacimi, R., Richalet, J.P., Corsin, A., Abousahl, I., Crozatier, B., 1992. Hypoxia-induced downregulation of beta-adrenergic receptors in rat heart. *J Appl Physiol* 73, 1377–1382.
- Kast, B., Schori, C., Grimm, C., 2015. Hypoxic preconditioning protects photoreceptors against light damage independently of hypoxia inducible transcription factors in rods. *Exp. Eye Res.* 146, 60–71. doi:10.1016/j.exer.2015.12.008
- Khurana, P., Ashraf, Q.M., Mishra, O.P., Delivoria-Papadopoulos, M., 2002. Effect of hypoxia on caspase-3, -8, and -9 activity and expression in the cerebral cortex of newborn piglets. *Neurochem. Res.* 27, 931–8.
- Kobilka, B.K., 2007. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 794–807. doi:10.1016/j.bbamem.2006.10.021
- Kulisz, A., Chen, N., Chandel, N.S., Shao, Z., Schumacker, P.T., 2002. Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 282, L1324–L1329. doi:10.1152/ajplung.00326.2001
- Kuner, R., 1999. Role of Heteromer Formation in GABAB Receptor Function. *Science* 283, 74–77. doi:10.1126/science.283.5398.74
- Kwon, D.S., Kwon, C.H., Kim, J.H., Woo, J.S., Jung, J.S., Kim, Y.K., 2006. Signal transduction of MEK/ERK and PI3K/Akt activation by hypoxia/reoxygenation in renal epithelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 1189–99. doi:10.1016/j.ejcb.2006.06.001
- Laderoute, K.R., Webster, K.A., 1997. Hypoxia/reoxygenation stimulates Jun kinase activity through redox signaling in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 80, 336–344. doi:10.1161/01.RES.80.3.336
- Lambeth, J.D., 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181–189. doi:10.1038/nri1312
- Lavoie, C., Mercier, J.-F., Salahpour, A., Umapathy, D., Breit, A., Villeneuve, L.-R., Zhu, W.-Z., Xiao, R.-P., Lakatta, E.G., Bouvier, M., Hébert, T.E., 2002. Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J. Biol. Chem.* 277, 35402–10. doi:10.1074/jbc.M204163200
- Lee, S.-M., Lee, C.-T., Kim, Y.W., Han, S.K., Shim, Y.-S., Yoo, C.-G., 2006. Hypoxia confers protection against apoptosis via PI3K/Akt and ERK pathways in lung cancer cells. *Cancer Lett.* 242, 231–238. doi:10.1016/j.canlet.2005.11.001
- León-Velarde, F., Bourin, M.C., Germack, R., Mohammadi, K., Crozatier, B., Richalet, J.P., 2001. Differential alterations in cardiac adrenergic signaling in chronic hypoxia or norepinephrine infusion. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R274–281.
- Levy, F.O., Zhu, X., Kaumann, A.J., Birnbaumer, L., 1993. Efficacy of beta 1-adrenergic receptors is lower than that of beta 2-adrenergic receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 10798–802.
- Li, H.-T., Honbo, N.Y., Karliner, J.S., 1996. Chronic Hypoxia Increases beta 1-Adrenergic receptor mRNA and density but not signaling in neonatal rat cardiac myocytes. *Circulation* 94, 3303–3310. doi:10.1161/01.CIR.94.12.3303

- Lo, L.-W., Cheng, J.-J., Chiu, J.-J., Wung, B.-S., Liu, Y.-C., Wang, D.L., 2001. Endothelial exposure to hypoxia induces Egr-1 expression involving PKC-mediated Ras/Raf-1/ERK1/2 pathway. *J. Cell. Physiol.* 188, 304–312. doi:10.1002/jcp.1124
- Loberg, R.D., Vesely, E., Brosius, F.C., 2002. Enhanced glycogen synthase kinase-3 β activity mediates hypoxia-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells and is prevented by glucose transport and metabolism. *J. Biol. Chem.* 277, 41667–73. doi:10.1074/jbc.M206405200
- Macdonald, J.L., Pike, L.J., 2005. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J. Lipid Res.* 46, 1061–1067. doi:10.1194/jlr.D400041-JLR200
- Maier, U., Babich, A., Nürnberg, B., 1999. Roles of non-catalytic subunits in G β γ -induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms β and γ . *J. Biol. Chem.* 274, 29311–29317. doi:10.1074/jbc.274.41.29311
- Mardon, K., Merlet, P., Syrota, A., Maziere, B., 1998. Effects of 5-day hypoxia on cardiac adrenergic neurotransmission in rats. *J Appl Physiol* 85, 890–897.
- Marsh, J.D., Sweeney, K.A., 1989. Beta-adrenergic receptor regulation during hypoxia in intact cultured heart cells. *Am. J. Physiol.* 256, H275-81.
- McGuire, M., Bradford, A., 1999. Chronic intermittent hypoxia increases haematocrit and causes right ventricular hypertrophy in the rat. *Respir. Physiol.* 117, 53–58. doi:10.1016/S0034-5687(99)00047-X
- McNeill, L.A., Hewitson, K.S., Gleadle, J.M., Horsfall, L.E., Oldham, N.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Schofield, C.J., 2002. The use of dioxygen by HIF prolyl hydroxylase (PHD1), *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. doi:10.1016/S0960-894X(02)00219-6
- Meves, A., Stock, S.N., Beyerle, A., Pittelkow, M.R., Peus, D., 2001. H₂O₂ mediates oxidative stress-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation, *Toxicology Letters*. doi:10.1016/S0378-4274(01)00359-9
- Minet, E., Arnould, T., Michel, G., Roland, I., Mottet, D., Raes, M., Remacle, J., Michiels, C., 2000. ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett.* 468, 53–58. doi:10.1016/S0014-5793(00)01181-9
- Mishra, O.P., Randis, T., Ashraf, Q.M., Delivoria-Papadopoulos, M., 2006. Hypoxia-induced Bax and Bcl-2 protein expression, caspase-9 activation, DNA fragmentation, and lipid peroxidation in mitochondria of the cerebral cortex of newborn piglets: The role of nitric oxide. *Neuroscience* 141, 1339–1349. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.05.005
- Mixon, M.B., Lee, E., Coleman, D.E., Berghuis, A.M., Gilman, A.G., Sprang, S.R., 1995. Tertiary and quaternary structural changes in G α induced by GTP hydrolysis. *Science* 270, 954–960. doi:10.1126/science.270.5238.954
- Morgan, M.J., Liu, Z., 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res.* 21, 103–115. doi:10.1038/cr.2010.178
- Mortimer, E.A., Monson, R.R., MacMahon, B., 1977. Reduction in mortality from coronary heart disease in men residing at high altitude. *N. Engl. J. Med.* 296, 581–5. doi:10.1056/NEJM197703172961101
- Naga Prasad, S. V, Barak, L.S., Rapacciuolo, A., Caron, M.G., Rockman, H.A., 2001. Agonist-dependent recruitment of phosphoinositide 3-kinase to the membrane by beta-

- adrenergic receptor kinase 1. A role in receptor sequestration. *J. Biol. Chem.* 276, 18953–9. doi:10.1074/jbc.M102376200
- Naga Prasad, S. V., Jayatilleke, A., Madamanchi, A., Rockman, H.A., 2005. Protein kinase activity of phosphoinositide 3-kinase regulates β -adrenergic receptor endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 7, 785–796. doi:10.1038/ncb1278
- Nakashima, I., Takeda, K., Kawamoto, Y., Okuno, Y., Kato, M., Suzuki, H., 2005. Redox control of catalytic activities of membrane-associated protein tyrosine kinases. *Arch. Biochem. Biophys.* 434, 3–10. doi:10.1016/j.abb.2004.06.016
- Neely, J.R., Morgan, H.E., 1974. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 36, 413–59. doi:10.1146/annurev.ph.36.030174.002213
- Osorio-Fuentealba, C., Valdés, J.A., Riquelme, D., Hidalgo, J., Hidalgo, C., Carrasco, M.A., 2009. Hypoxia stimulates via separate pathways ERK phosphorylation and NF-kappaB activation in skeletal muscle cells in primary culture. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 106, 1301–10. doi:10.1152/jappphysiol.91224.2008
- Pacold, M.E., Suire, S., Perisic, O., Lara-Gonzalez, S., Davis, C.T., Walker, E.H., Hawkins, P.T., Stephens, L., Eccleston, J.F., Williams, R.L., 2000. Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase γ . *Cell* 103, 931–944. doi:10.1016/S0092-8674(00)00196-3
- Paddenberg, R., Ishaq, B., Goldenberg, A., Faulhammer, P., Rose, F., Weissmann, N., Braun-Dullaeus, R.C., Kummer, W., 2003. Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, L710-9. doi:10.1152/ajplung.00149.2002
- Pavan, B., Biondi, C., Dalpiaz, A., 2009. Adenylyl cyclases as innovative therapeutic goals. *Drug Discov. Today* 14, 982–991. doi:10.1016/j.drudis.2009.07.007
- Pei, J.M., Yu, X.C., Fung, M.L., Zhou, J.J., Cheung, C.S., Wong, N.S., Leung, M.P., Wong, T.M., 2000. Impaired G(s)alpha and adenylyl cyclase cause beta-adrenoceptor desensitization in chronically hypoxic rat hearts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C1455-63.
- Piasecik, M.T., Perez, D.M., 2001. α 1-Adrenergic receptors: New insights and directions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 403–410.
- Pike, L.J., 2009. The challenge of lipid rafts. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, S323-8. doi:10.1194/jlr.R800040-JLR200
- Prior, I.A., Clague, M.J., 1999. Localization of a class II phosphatidylinositol 3-kinase, PI3KC2alpha, to clathrin-coated vesicles. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* MCBRC 1, 162–6. doi:10.1006/mcbr.1999.0126
- Rocha-Singh, K.J., Honbo, N.Y., Karliner, J.S., 1991. Hypoxia and glucose independently regulate the beta-adrenergic receptor-adenylate cyclase system in cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* 88, 204–13. doi:10.1172/JCI115279
- Rybin, Xu, X., Lisanti, M.P., Steinberg, S.F., 2000. Differential targeting of beta-adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae: A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 41447–41457. doi:10.1074/jbc.M006951200

- Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Jones, R.G., Oliveira-dos-Santos, A.J., Stanford, W.L., Bolon, B., Wakeham, A., Itie, A., Bouchard, D., Kozieradzki, I., Joza, N., Mak, T.W., Ohashi, P.S., Suzuki, A., Penninger, J.M., 2000. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* 287, 1040–6.
- Schulze-Osthoff, K., Bakker, A.C., Vanhaesebroeck, B., Beyaert, R., Jacob, W.A., Fiers, W., 1992. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J. Biol. Chem.* 267, 5317–23.
- Silverman, H.S., Wei, S.-k., Haigney, M.C.P., Ocampo, C.J., Stern, M.D., 1997. Myocyte adaptation to chronic hypoxia and development of tolerance to subsequent acute severe hypoxia. *Circ. Res.* 80, 699–707. doi:10.1161/01.RES.80.5.699
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., Brand, M.D., 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277, 44784–44790. doi:10.1074/jbc.M207217200
- Strathmann, M.P., Simon, M.I., 1991. G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5582–6.
- Tang, W., Gilman, A., 1991. Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science*.
- Thannickal, V.J., Fanburg, B.L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 279, L1005–L1028.
- Tseng, Y.-T., Yano, N., Rojan, A., Stabila, J.P., McGonnigal, B.G., Ianus, V., Wadhawan, R., Padbury, J.F., 2005. Ontogeny of phosphoinositide 3-kinase signaling in developing heart: effect of acute beta-adrenergic stimulation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H1834–42. doi:10.1152/ajpheart.00435.2005
- Tsuji, Y., Shimada, Y., Takeshita, T., Kajimura, N., Nomura, S., Sekiyama, N., Otomo, J., Usukura, J., Nakanishi, S., Jingami, H., 2000. Cryptic dimer interface and domain organization of the extracellular region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. *J Biol Chem* 275, 28144–28151.
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344. doi:10.1111/j.1469-7793.2003.00335.x
- Voelkel, N.F., Hegstrand, L., Reeves, J.T., McMurty, I.F., Molinoff, P.B., 1981. Effects of hypoxia on density of beta-adrenergic receptors. *J. Appl. Physiol.* 50, 363–6.
- Volinia, S., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., MacDougall, L.K., Stein, R., Zvelebil, M.J., Domin, J., Panaretou, C., Waterfield, M.D., 1995. A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *EMBO J.* 14, 3339–48.
- Walker, E.H., Perisic, O., Ried, C., Stephens, L., Williams, R.L., 1999. Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature* 402, 313–20. doi:10.1038/46319
- Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V., Boldin, M.P., 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 331–367. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.331

- Wang, T., Brown, M., 2004. Differential expression of adenylyl cyclase subtypes in human cardiovascular system. *Mol. Cell. Endocrinol.* 223, 55–62. doi:10.1016/j.mce.2004.05.012
- Wedegaertner, P.B., Wilson, P.T., Bourne, H.R., 1995. Lipid modifications of trimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 503–506. doi:10.1074/jbc.270.2.503
- Wilhelm, J., Frydrychová, M., Vízek, M., 1999. Hydrogen peroxide in the breath of rats: the effects of hypoxia and paraquat. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 48, 445–9.
- Xiang, Y., Rybin, V.O., Steinberg, S.F., Kobilka, B., 2002. Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta 2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 34280–6. doi:10.1074/jbc.M201644200
- Xiao, R.P., Ji, X., Lakatta, E.G., 1995. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.* 47, 322–329.
- Yano, N., Ianus, V., Zhao, T.C., Tseng, A., Padbury, J.F., Tseng, Y.-T., 2007. A novel signaling pathway for beta-adrenergic receptor-mediated activation of phosphoinositide 3-kinase in H9c2 cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H385–93. doi:10.1152/ajpheart.01318.2006
- Yu, F., White, S.B., Zhao, Q., Lee, F.S., 2001. HIF-1 binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 9630–9635. doi:10.1073/pnas.181341498
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., Kroemer, G., 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* 182, 367–77.
- Zhang, W., Yano, N., Deng, M., Mao, Q., Shaw, S.K., Tseng, Y.-T., 2011. β -Adrenergic receptor-PI3K signaling crosstalk in mouse heart: elucidation of immediate downstream signaling cascades. *PloS One* 6, e26581. doi:10.1371/journal.pone.0026581
- Zhao, R., Feng, J., He, G., 2016. Hypoxia increases Nrf2-induced HO-1 expression via the PI3K/Akt pathway. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 21, 385–96.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X., 1999. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274, 11549–11556. doi:10.1074/jbc.274.17.11549
- Zundel, W., Swiersz, L.M., Giaccia, A., 2000. Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1507–1514. doi:10.1128/MCB.20.5.1507-1514.2000