



## Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

**APVV-0212-10**

**Vápníkové kanály v neuronálnej excitabilite**

Zodpovedný riešiteľ **doc. RNDr. Ľubica Lacinová, DrSc**

Príjemca **Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV
2. Ústav pre výskum srdca SAV
3. Farmaceutická fakulta UK
- 4.
- 5.

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

- 1.
- 2.
- 3.

### Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

- 1.
- 2.
- 3.

### Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Lucia Lichvárová, Katarína Jašková and Ľubica Lacinová (2012) NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells is independent of calcium entry through L-type calcium channels. Gen. Physiol. Biophys. 31: 473 – 478
2. Robert Mallmann, Thomas Wilmes, Lucia Lichvárová, Anja Bühner, Barbara Lohmüller, Jan Castonguay, Lubica Lacinova and Norbert Klugbauer (2013) Tetraspanin-13 modulates voltage-gated CaV2.2 Ca<sup>2+</sup>channels. Scientific Reports Article number: 1777, doi:10.1038/srep01777
3. Katarina Jaskova, Michaela Pavlovicova, Michal Cagalinec, Lubica Lacinova, Dana Jurkovicova (2014) TGFbeta1 down regulates neurite outgrowth, expression of Ca<sup>2+</sup> transporters and mitochondrial dynamics of in vitro cerebellar granule cells. Neuroreport 25:

340-346.

4. . Belička M., Kučerka N., Uhríková D., Islamov A.Kh, Kuklin A.I., Devínsky F., Balgavý P. (2014): Effect of N,N-dimethyl-N-alkylamine-N-oxides on DOPC bilayer in unilamellar vesicles: small-angle neutron scattering study. Eur. Biophys. J. 43, 179-189

5. Lucia Lichvárová and Ľubica Lacinová (2014) CaV1.2 and CaV1.3 L-type calcium channels regulate the resting membrane potential but not the expression of calcium transporters in differentiated PC12 cells. Gen. Physiol. Biophys. in press

### **Uplatnenie výsledkov projektu**

Projekt bol projektom základného výskumu, takže hlavným uplatnením jeho výsledkov je rozšírenie poznatkov o funkcii a regulácii vápnikových kanálov a vápnikovej homeostázy. V dlhšom časovom meradle tieto poznatky môžu prispieť k vývoju nových terapeutických stratégií.

Konkrétne, výsledky boli publikované v 8 recenzovaných časopisoch evidovaných v „current content“ alebo impaktovaných (časopis Scientific Reports nie je evidovaný v CC, ale v roku publikovania nášho článku mal impakt faktor 5,078). Jedna práca je po pozitívnej primárnej recenzii, ďalšie sú v štádiu príprav. Publikované práce boli zatiaľ podľa WoS citované 7-krát (bez autocitácií). Okrem toho boli výsledky publikované v 4 recenzovaných knižných publikáciách a 7 prác bolo publikovaných v zborníkoch. Ďalším uplatnením výsledkov bola príprava nových odborníkov – v rámci riešenia projektu bolo vypracovaných a obhájených 7 diplomových prác a vypracované boli 4 dizertačné práce, z ktorých 1 je už odovzdaná a ďalšie dve budú odovzdané začiatkom roku 2015.

### **CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV**

#### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)**

Vápnikové kanály L-typu CaV1.2 a CaV1.3 sú štrukturálne veľmi podobné, napriek tomu majú rozdielnu funkciu. Pri neurodiferenciacii PC12 buniek z feochromocytómu potkana vplyvom neuronálneho rastového faktoru expresia aj aktivita oboch kanálov vzrastá a dosahuje 30% celkového vápnikového prúdu, avšak jej zmeny boli späté iba so zmenami pokojového membránového potenciálu (Vrest). Naopak, expresia Na-K-ATPázy sa pri zmenách Vrest nemenila. V hipokampálnych neurónoch potkana cez oba kanály tečie 50% celkového vápnikového prúdu. Pri potlačení expresie CaV1.2 kanála transfekciou špecifických siRNA bolo inhibované generovanie sérií akčných potenciálov (AP), znížená expresia inozitol-1,4,5-trisfosfátových receptorov (IP3R), zvýšená expresia ryanodínových receptorov a znížený nárast vnútrobunkovej koncentrácie [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> po depolarizácii membrány alebo po aktivácii IP3R. Pri potlačení expresie CaV1.3 kanála transfekciou špecifických siRNA bolo generovanie sérií AP facilitované, bola mierne znížená expresia IP3R a mierne znížený nárast [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> po depolarizácii membrány. Potlačenie expresie oboch kanálov znížilo frekvenciu mitochondriálnych fúzií, ale zatiaľ čo potlačenie expresie CaV1.2 kanálu znížilo priemernú dĺžku mitochondrií, potlačenie expresie CaV1.3 kanálu ju naopak zvýšilo. Pre optimalizáciu transfekcie sme študovali fyzikálno-chemické charakteristiky troch typov prenosových vektorov pozostávajúcich z nukleových kyselín, neutrálneho fosfolipidu a kladného povrchového náboja vytvoreného z: a) kationových gemini tenzidov; b) pH citlivých tenzidov; c) dvojmocnými kationmi. Vzťah medzi štruktúrou a transfekčnou efektívnosťou sme špecifikovali pre prenosový vektor s gemini tenzidmi. Experimenty na PC12 bunkách naznačujú zmeny štruktúry bunkovej membrány vyvolané transfekciou.

#### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)**

In spite of high structural homology CaV1.2 and CaV1.3 L-type calcium channels have different physiological function. During neurodifferentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells expression of both channels was upregulated and reached 30% of total calcium current.

Changes in their activity were accompanied by changes in a resting membrane potential ( $V_{rest}$ ) only. Expression of Na-K-ATPase was not altered while  $V_{rest}$  was changed. In hippocampal neurons CaV1.2 and CaV1.3 carried 50% of total calcium current. When the expression of the CaV1.2 channel was downregulated by siRNA, generation of action potential (AP) series was suppressed, expression of inositol-1,4,5-trisphosphate receptors (IP3) was downregulated, expression of ryanodine receptors was upregulated, and an increase in intracellular calcium concentration  $[Ca^{2+}]_i$  upon cell depolarization or upon an activation of IP3Rs was suppressed. Downregulation of the expression of the CaV1.3 channel by siRNA resulted in a facilitation of a firing of AP series, in a moderate suppression of the IP3Rs expression, and in moderate attenuation of  $[Ca^{2+}]_i$  increase upon cell depolarization. Downregulation of the expression of either channel caused a decrease in the rate of mitochondrial fusions. Average mitochondrial length decreased upon the CaV1.2 downregulation and increased upon the CaV1.3 downregulation. To optimize transfection we have studied physico-chemical characteristics of potential delivery vectors of three different compositions, each of consisting from nucleic acid, neutral phospholipid, and positive surface charge formed with: a) gemini surfactants; b) pH responsive surfactants; c) divalent cations. Transfection experiments with gemini surfactants based vectors contribute to understanding the structure-transfection efficiency relationship. Experiments on PC12 cells indicate structural changes of cell membrane due to a transfection.

Svojím podpisom potvrdzujem, že údaje uvedené v záverečnej karte sú pravdivé a úplné a súhlasím s ich zverejnením.

**Zodpovedný riešiteľ**

doc. RNDr. Ľubica Lacinová, DrSc.

V Bratislave 27.11.2014

**Štatutárny zástupca príjemcu**

doc. Ing. Oľga Križanová, DrSc.

V Bratislave 27.11.2014

.....  
podpis zodpovedného riešiteľa

.....  
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu