

**Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky a
Ústav experimentálnej endokrinológie
Slovenská akadémia vied
Bratislava**

Mgr. Ľubomíra Žáčiková

**LOKALIZÁCIA VYBRANÝCH Ca^{2+} -TRANSPORTNÝCH
SYSTÉMOV V SRDCI A OBLIČKE POTKANA A ICH
MODULÁCIA STRESOM**

Autoreferát dizertačnej práce na získanie vedecko-akademickej hodnosti
philosophiae doctor

Vedný odbor: 14-10-9
Biochémia

Bratislava 2000

Dizertačná práca bola vypracovaná v rámci doktorandského štúdia na Ústave molekulárnej fyziológie a genetiky a Ústave experimentálnej endokrinológie SAV v Bratislave.

Predkladateľka: Mgr. Lubomíra Žáčiková
Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV
Vlárska 5
833 34 Bratislava

Školiteľka: Doc. Ing. Oľga Križanová, CSc.
Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV
Vlárska 5
833 34 Bratislava

Oponenti: *Prof. MUDr. J. Bednář, DrSc.*
.....
.....
.....

Doc. RNDr. J. Zelkočík, CSc.
.....
.....
.....

Ing. A. Kiegelhoffer, DrSc.
.....
.....
.....

Autoreferát bol zaslaný dňa: *30.8.2000*.....

Obhajoba dizertačnej práce sa uskutoční dňa *27.9.2000 13:00* hod. na Prírodovedeckej fakulte UK v miestnosti *B7-107* pred komisiou pre obhajoby dizertačných prác v odbore 14-10-9 Biochémia.

Prof. RNDr. Marta Kollárová, CSc.
PríF UK, Katedra Biochémie, Pavilón CH1
Mlynská dolina
842 15 Bratislava

1. SÚČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Ióny vápnika zohrávajú významnú úlohu vo vnútrobunkovej signalizácii, kde slúžia ako sekundárny posol pri iniciovaní alebo regulovaní množstva biochemických a elektrických javov v bunkách. Napríklad, Ca^{2+} ióny sa podieľajú na kontrole génovej expresie, sú esenciálne pre kontrakciu vo všetkých typoch svalov, pôsobia ako vnútrobunkový regulátor metabolizmu bunky a zohrávajú významnú úlohu ako kofaktor pre extracelulárne enzýmy a bielkoviny.

V pokojovom stave bunky je koncentrácia voľného vápnika v cytoplazme 10 000-krát nižšia ako v mimobunkovom prostredí. Pre fyziologické fungovanie bunky je nevyhnutné, aby v pravej chvíli hladina vápnika v cytoplazme stúpala. Potrebný vápnik si bunka získava buď z vnútrobunkových zdrojov (mitochondrie, endoplazmatické retikulum a ďalšie organely), alebo z mimobunkového prostredia. Dôležité je tiež, aby po rýchlom vzostupe koncentrácie vápnika, vyvolanom extracelulárnym signálom, došlo k dostatočne rýchlemu návratu hladiny vápnika na pokojovú úroveň.

Na bunkovej signalizácii kontraktálnych buniek môžu participovať dva odlišné cykly pre vápnik, ktoré kontrolujú vtok a odstránenie vápnika z cytosólu. Najprimitívnejší je extracelulárny Ca^{2+} cyklus, pri ktorom je kontrakcia závislá na vápniku, ktorý vchádza do cytosólu z mimobunkového prostredia. Je typický pre bunky hladkého svalstva ciev a srdca embrya (Katz, 1996). Intracelulárny Ca^{2+} cyklus je známy pre špecializovanejšie bunky, ako napr. myocyty kostrového svalstva a dospelého srdca, kde je vápnik pumpovaný do zásobárni v bunke a von z nich. Závislosť na úniku Ca^{2+} z vnútrobunkových vápnikových zdrojov vyžaduje funkčné spojenie medzi depolarizáciou plazmatickej membrány (akčný potenciál) a otvorením Ca^{2+} kanálov v sarkoplazmatickom retikule (Katz, 1996).

Pre oba Ca^{2+} cykly je esenciálna membrána, nepriepustná pre vápnik, ktorá obsahuje vápnikové kanály, cez ktoré vápnik difunduje do cytosólu bunky a Ca^{2+} pumpy a výmenníky, ktoré aktívne transportujú tieto katióny do mimobunkového prostredia a lúmenu SR. Membránové proteíny, ktoré aktívne transportujú Ca^{2+} von z cytosólu zahŕňajú adenosín trifosfát (ATP)-závislé Ca^{2+} pumpy v plazmatickej membráne a membráne SR. V plazmatickej membráne sa nachádza Ca^{2+} -ATPáza a elektrogénny $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenník, ktoré môžu efektívne vypudiť vápnik von z bunky. V srdcových myocytoch je 75% vápnika uvoľnených von z bunky cez $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenník a zvyšok cez

Ca²⁺-ATPázu v sarkoleme (Cannell, 1991). Lederer a kol. (1990) popísali dôležitú úlohu Na⁺/Ca²⁺ výmenníka ako aktivátora vápnikových kanálov sarkoplazmatického retikula. Na⁺/Ca²⁺ výmenník, ktorý zohráva úlohu spúšťača, bol definovaný ako reverzný model Na⁺/Ca²⁺ výmenníka. Rozličné štúdie poukazujú na zvýšenú expresiu Na⁺/Ca²⁺ výmenníka u pacientov s chorobami koronárnych artérií, dilatovanou kardiomyopatiou (Reinecke a kol., 1996) a tiež pri ischemickej a idiopatickej kardiomyopatii (Studer a kol., 1994; Flesh a kol., 1996). Ca²⁺ kanály v sarkoplazmatickom retikule a plazmatickej membráne patria k dvom odlišným proteínovým rodinám. Kanály uvoľňujúce vápnik z vnútrobunkových zásobární sú veľké proteíny, ktoré vyčnievajú do cytosólu medzi sarkoplazmatickým retikulom a plazmatickou membránou. Niektoré vnútrobunkové Ca²⁺ kanály sú známe pod názvom ryanodínové receptory, pretože viažu rastlinný alkaloid ryanodín. Tie, ktoré viažu inozitol trifosfát (IP₃) a sú ním aktivované, sa nazývajú IP₃ receptory. Moschella a Marks (1993) ukázali, že IP₃ receptor typu 1 je exprimovaný v srdcových myocytoch. Funkcia IP₃-regulovaných Ca²⁺ kanálov nachádzajúcich sa v srdci nie je doteraz jasná (Katz, 1996). V srdci by mohol byť IP₃ receptor zahrnutý vo fyziologickej modulácii srdcovej kontraktility v odpovedi na farmakologické činitele a hormóny. IP₃R1 sa nachádza vo vyšších koncentráciách v Purkyněho vláknach srdca (Gorza a kol., 1993), ktoré vedú elektrické signály z predsiení do komôr, čo môže mať úlohu v generovaní srdcového rytmu. IP₃ receptor sa nachádza aj v obličke, ale názory na jeho presnú lokalizáciu sa v jednotlivých štúdiách odlišujú (Monkawa a kol., 1998; Yang a kol., 1995).

Nedávno objavenou signálnou molekulou, ktorá sa zúčastňuje na uvoľňovaní vápnika z vnútrobunkových zásob, je NAADP („*nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate*“), ktorý je endogénnym metabolitom β-NADP (Lee, 2000). NAADP-signálny mechanizmus sa môže farmakologicky odlišovať od iných Ca²⁺-signálnych mechanizmov. Bak a kol. (1999) ako prví zistili, že NAADP spúšťa uvoľnenie vápnika z mikrozómov mozgu potkana mechanizmom, ktorý je odlišný od tých, ktoré sú citlivé k IP₃ alebo cADPR (cyklická ADP ribóza). NAADP by mohol fungovať ako vnútrobunkový posol v cicavčích bunkách (Cancela a kol., 1999). Na srdci doteraz takéto merania neboli publikované.

2. CIELE PRÁCE

Všeobecný cieľ dizertačnej práce možno definovať ako štúdium vybraných Ca^{2+} -transportných systémov v srdci a obličke potkana a ich moduláciu. Keďže otázka vplyvu stresu na rozvoj niektorých ochorení je v súčasnosti veľmi aktuálna, ako modelový faktor sme si vybrali imobilizačný stres (Kvetňanský a Mikulaj, 1970).

Parciálne ciele kandidátskej dizertačnej práce boli nasledovné:

- charakterizovať expresiu $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenníka na úrovni mRNA a proteínu v jednotlivých častiach srdca potkana (v komorách a predsieňach), sledovať jeho aktivitu a vplyv imobilizačného stresu na $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenník v danom tkanive
- charakterizovať expresiu IP_3 receptora typu 1 a 2 na úrovni mRNA v jednotlivých častiach srdca potkana a ich prípadnú moduláciu imobilizačným stresom
- sledovať účinok NAADP na zmeny koncentrácie vápnika v mikrozómoch srdca
- charakterizovať expresiu $\text{IP}_3\text{R1}$ receptora na úrovni mRNA a proteínu v kôre a dreni obličky potkana a sledovať vplyv imobilizačného stresu na $\text{IP}_3\text{R1}$ receptor v danom tkanive

3. METODICKÁ ČASŤ

3.1. Imobilizačný stres

Ako stresový model sme v našich experimentoch používali imobilizáciu podľa Kvetňanského a Mikulaja (1970).

3.2. Izolácia RNA

RNA sme izolovali metódou podľa Chomczynského a Sacchiho (1987) s využitím guanidín izotiokyanátu (Fisher Scientific, USA) s následnou fenol-chloroformovou extrakciou.

3.3. Relatívna kvantifikácia hladín mRNA pomocou RT-PCR

Vyizolovanú RNA sme použili na amplifikáciu študovaných génov pomocou RT-PCR, v ktorých sme použili špecifické primery pre $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenník, IP_3 receptor typu 1 a 2 (Genazzani a kol., 1999). Produkty amplifikácie sme kvantifikovali relatívne k expresii „housekeeping“ génu: glyceraldehydtrifosfát dehydrogenáza (GAPDH) (Terada a kol., 1993).

3.4. „Seminested“ PCR

V tkanivách, kde bola expresia daného génu na úrovni mRNA na veľmi nízkej, slabo detegovateľnej úrovni pomocou PCR metódy, sme použili metódu „*seminested*“ PCR. Pomocou tejto metódy sme mohli určiť, či sa daný gén v tkanive naozaj exprimuje, alebo nie.

3.5. Transport vápnika cez membránu do vezikúl

Plazmatické membrány z častí srdca potkanov sme pripravili ultracentrifugáciou podľa Križanovej a kol. (1990). Ca^{2+} transport bol meraný v súlade s metódou podľa Reevesa a Sutka (1979) s menšími modifikáciami. Membrány z kôry a drene obličiek boli pripravené ultracentrifugáciou podľa Križanovej a kol. (1990).

3.6. Transport vápnika do srdcových mikrozómov

Mikrozómy zo srdca boli pripravené podľa Webstera a kol. (1994). Uvoľnenie $^{45}\text{Ca}^{2+}$ zo srdcových mikrozómov sme robili podľa práce Bak a kol. (1999).

3.7. Štatistická analýza

Štatistické analýzy sme robili jednocestnou analýzou variancie (ANOVA).

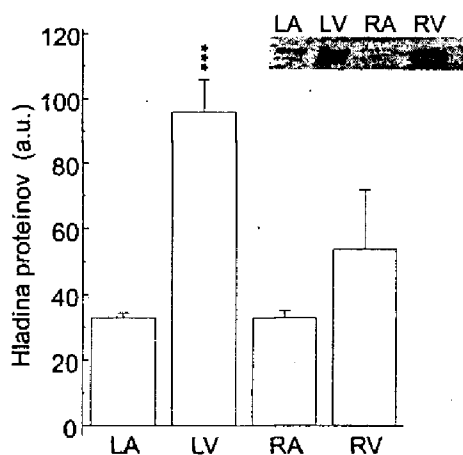
4. VÝSLEDKY

4.1. Charakterizácia expresie $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenníka v srdci potkana a jeho modulácia imobilizačným stresom

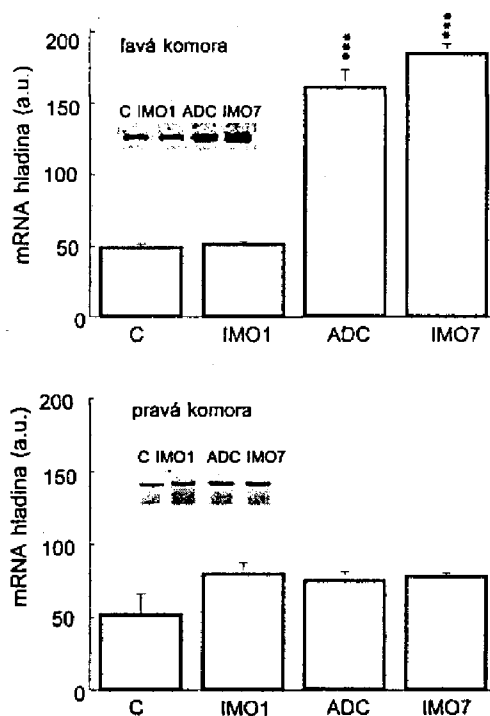
Pomocou Western blot analýzy s monoklonálnou protilátkou proti $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenníku sme pozorovali najvyššiu hladinu proteínu v ľavej komore srdca potkana (LV; 96 ± 10 a.u.; Obr. 1). V oboch predsieňach bola hladina proteínu $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenníka oveľa nižšia ($33,0 \pm 1,2$ a $33,0 \pm 2,0$ a.u.) v porovnaní s ľavou komorou (Obr. 1). Preto sme v nasledujúcich experimentoch porovnávali vplyv imobilizačného stresu na expresiu $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenníka jednotlivivo v ľavej a pravej komore.

Na sledovanie hladín mRNA sme využívali metódu izolácie RNA s následnou RT-PCR. Výsledky boli kvantifikované relatívne ku „*housekeeping*“ génu GAPDH. Jednorázová imobilizácia po dobu 2 hodín (IMO1) nemenila hladinu mRNA $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenníka ani v ľavej, ani v pravej komore (Obr. 2). Hladina mRNA pre výmenník sa signifikantne zvýšila v ľavej komore po šestnásobnej imobilizácii s následným 24-hodinovým kľudom v kletke (ADC), ako aj po sedemnásobnej imobilizácii (IMO7). V

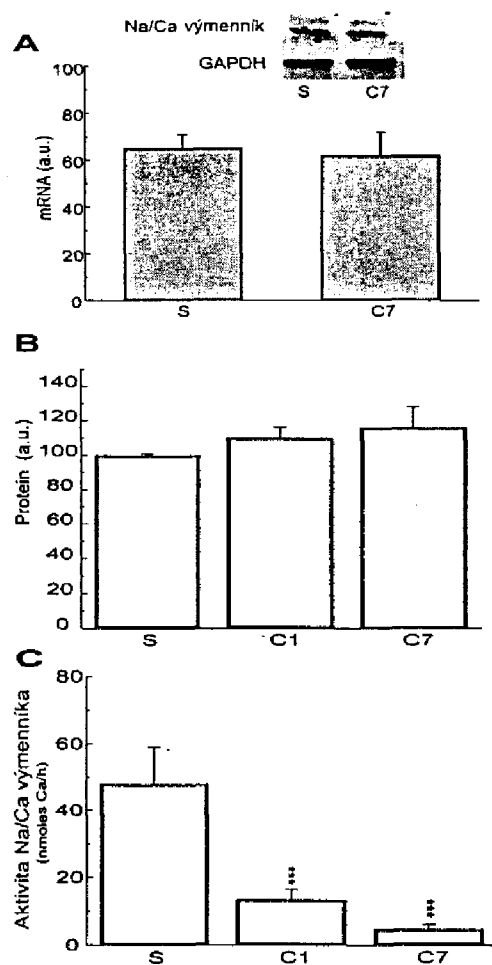
pravej komore neboli pozorované žiadne významné zmeny na úrovni mRNA vplyvom imobilizačného stresu.



Obrázok 1. Distribúcia proteínovej hladiny $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenníka v jednotlivých častiach srdca. LA: ľavá predsieň, LV: ľavá komora, RA: pravá predsieň, RV: pravá komora. *** $p < 0,001$.



Obrázok 2. Vplyv imobilizačného stresu na hladinu mRNA $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenníka v ľavej a v pravej komore. C: kontrolná skupina; IMO1: potkany imobilizované 1-krát; IMO7: potkany imobilizované 7-krát; ADC: adaptovaná kontrola, kde boli zvieratá imobilizované 6-krát a následne ponechané 24 hod v kľude. *** $p < 0,001$.



Obrázok 3. mRNA hladina, proteinové množstvo a aktivita $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenníka v srdci kontrolných potkanov (S) a potkanov, ktorým bol podávaný kortizol 1 deň (C1) alebo 7 dní (C7). mRNA hladina bola porovnávaná relatívne ku GAPDH. *** $p < 0,001$.

Výsledky, ktoré boli získané na úrovni merania hladiny mRNA pre $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenník, korelovali s výsledkami získanými na úrovni merania hladiny proteínu pomocou Western blot analýzy s monoklonálnou protilátkou proti $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenníku.

Aktivita $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenníka bola tiež zvýšená po opakovanom imobilizačnom strese (ADC, IMO7) v ľavej komore, ale v pravej komore sa vplyvom stresu nemenila.

Keďže stres je známy tým, že rapídne zvyšuje hladinu glukokortikoidov, predpokladali sme, že zvýšená génová expresia $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenníka môže byť spôsobená zvýšenou aktivitou cez glukokortikoidný responzívny element (GRE). Uvedenú hypotézu sme testovali v experimente, kde sme potkanom kontinuálne aplikovali kortizol v dávkach

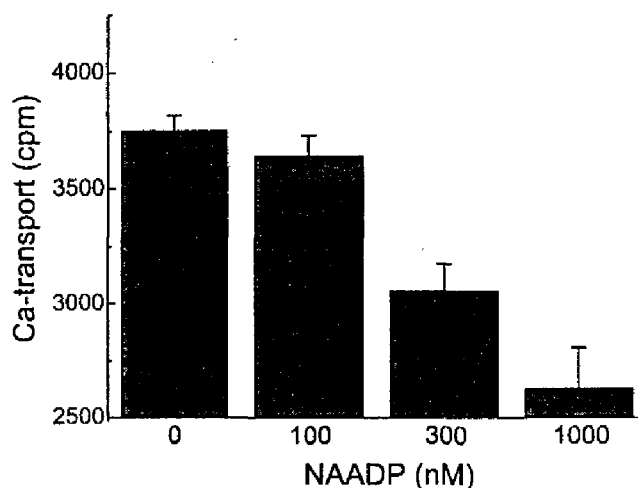
24 mg/kg/deň po dobu 1 deň a 7 dní. Sledovali sme, či táto aplikácia bude sprostredkovať podobný efekt na $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenník ako imobilizačný stres.

Nepozorovali sme žiadne rozdiely v množstve mRNA v kontrolnej skupine (62 ± 10 a.u.) a v skupine zvierat, ktorým bol podávaný kortizol (65 ± 6 a.u.) (Obr. 3). Podobné výsledky sme získali aj na úrovni proteínu. Aktivita $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenníka v srdci potkana sa rapidne znížila po podaní kortizolu po dobu 24 hod (zo $48,0 \pm 11,0$ nmol Ca^{2+} /hod na $13,5 \pm 2,9$ nmol Ca^{2+} /hod) (Obr. 3). Po podaní kortizolu potkanom po dobu 7 dní bolo zníženie aktivity výmenníka ešte výraznejšie (na $4,8 \pm 1,4$ nmol Ca^{2+} /hod).

Z uvedených výsledkov vyplýva, že imobilizačný stres zvyšuje génovú expresiu $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenníka v ľavej komore srdca potkana. Tento efekt nie je sprostredkovaný cez GRE.

5.2. Sledovanie účinku NAADP na zmeny koncentrácie vápnika v mikrozómoch srdca

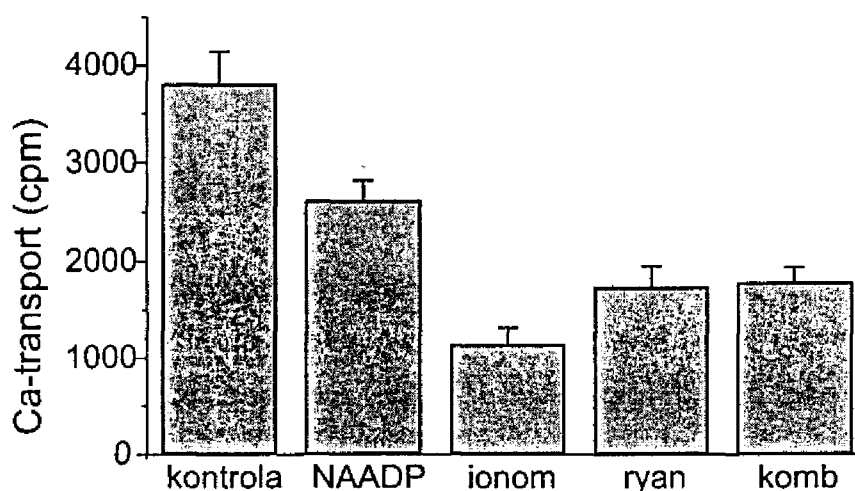
V prvých experimentoch sme ukázali, že NAADP indukuje uvoľnenie $^{45}\text{Ca}^{2+}$ z mikrozómov srdca koncentračne závislým spôsobom (Obr. 4). Pridávaním rozličných koncentrácií NAADP (od 100 do 1000 nM) sme zistili, že už 1 μM NAADP indukoval maximálne uvoľnenie vápnika z mikrozómov, zatiaľ čo 100 nM NAADP neuvolňoval vápnik prakticky vôbec. Podobne sme ukázali aj časovo-závislé pôsobenie NAADP. Maximálne uvoľnenie $^{45}\text{Ca}^{2+}$ zo srdcových mikrozómov nastalo po 1 min od podania 10 μM NAADP pri laboratórnej teplote.



Obrázok 4. Koncentračná závislosť uvoľňovania $^{45}\text{Ca}^{2+}$ z mikrozómov srdca vplyvom NAADP.

Ďalšie experimenty boli založené na predpoklade, že NAADP ovplyvňuje ryanodínové receptory. Preto sme sledovali závislosť uvoľnenia $^{45}\text{Ca}^{2+}$ od podania 3 μM NAADP, 1 μM ionomycínu, 1 μM ryanodínu a ako aj od podania kombinácie 1 μM ryanodínu + NAADP v porovnaní s kontrolou. Ionomycín pôsobí ako ionofor, t.j. uvoľní všetok vápnik, ktorý sa nachádza v mikrozómoch a slúžil teda ako pozitívna kontrola.

Všetky podávané látky spôsobili uvoľnenie $^{45}\text{Ca}^{2+}$ z mikrozómov srdca potkana (Obr. 5), pričom vplyvom ionomycínu bolo uvoľnenie vápnika najvýraznejšie. Súčasné podanie ryanodínu a NAADP uvoľnilo rovnaké množstvo vápnika ako samotný ryanodín, čo naznačuje, že NAADP pôsobí zrejme na ryanodínové receptory.



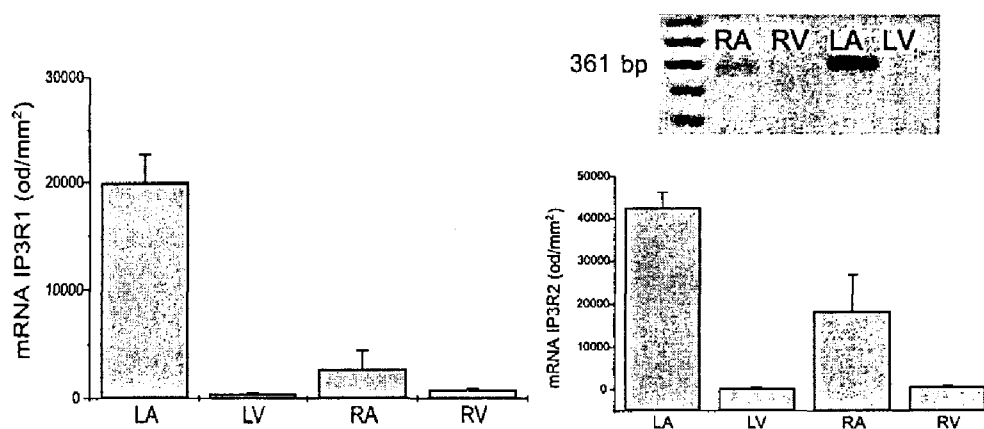
Obrázok 5. Závislosť uvoľnenia $^{45}\text{Ca}^{2+}$ od podania 3 μM NAADP, 1 μM ionomycínu (ionom), 1 μM ryanodínu (ryan) a kombinácie 1 μM ryanodínu a NAADP (komb).

5.3. Identifikácia $\text{IP}_3\text{R1}$ v srdci potkana a jeho modulácia imobilizačným stresom

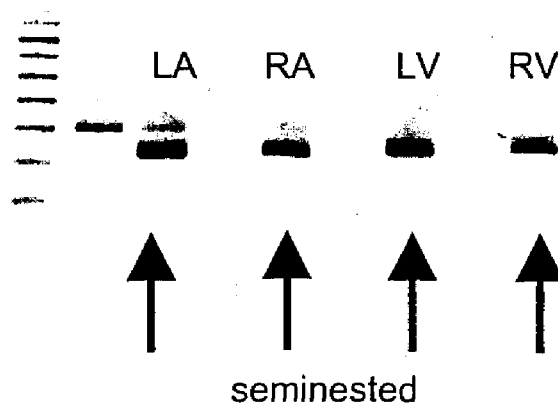
Najväčšie množstvo mRNA pre IP_3R typu 1 sme stanovili v ľavej predsieni (Obr. 6, vľavo). Veľmi malé množstvá sa nachádzali v pravej a ľavej komore (Obr. 6, vľavo). Keďže tieto množstvá boli jednoduchou RT-PCR a detekciou na agarózovom géli pomocou etídiumbromidu veľmi zle detegovateľné, na overenie prítomnosti mRNA $\text{IP}_3\text{R1}$ v srdcových komorách sme využili tzv. „*seminested*“ PCR (Obr. 7). Podobnú distribúciu, ako pre $\text{IP}_3\text{R1}$, sme zistili aj pre $\text{IP}_3\text{R2}$ (Obr. 6, vpravo). Na dôkaz $\text{IP}_3\text{R2}$ v komorách srdca sme tiež použili „*seminested*“ PCR, ktorou sme získali podobný výsledok ako pri $\text{IP}_3\text{R1}$.

Významný nárast hladín mRNA pre $\text{IP}_3\text{R1}$ a 2 sme zaznamenali aj vplyvom imobilizačného stresu v predsieniach (Obr. 8). Pretože hladina mRNA $\text{IP}_3\text{R1}$ a 2 bola v

komorách veľmi nízka, nerobili sme pozorovania vplyvu imobilizačného stresu v komorách. Je veľmi zaujímavé, že nárast hladín mRNA pre oba typy IP_3 receptora bol zaznamenaný už po jednorázovom strese po dobu 2 hod s následným 3 hod oddychom.

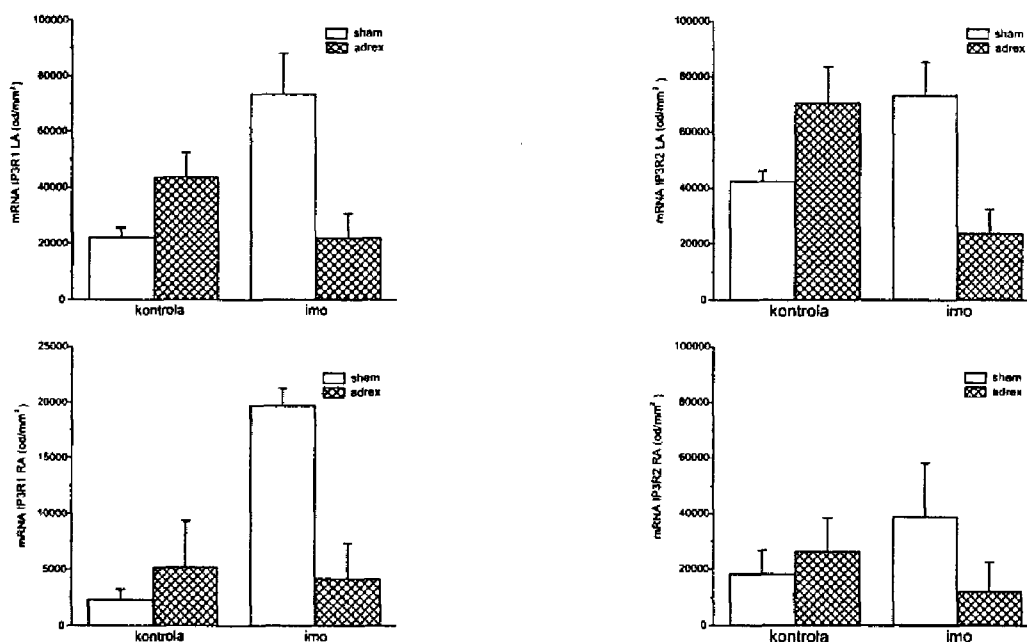


Obrázok 6. Distribúcia IP_3R1 (vľavo) a IP_3R2 (vpravo) na hladine mRNA v jednotlivých častiach srdca. LA: ľavá predsieň, RA: pravá predsieň, LV: ľavá komora, RV: pravá komora. Hodnoty mRNA pre IP_3R1 boli porovnávané vzhľadom k hodnotám mRNA pre GAPDH.



Obrázok 7. Typický príklad „seminested“ PCR pre IP_3R1 . LA: ľavá predsieň, RA: pravá predsieň, LV: ľavá komora, RV: pravá komora. V prvej dráhe sa nachádza štandarda. Šípky označujú dráhy, v ktorých sa nachádza amplifikovaný produkt po druhej PCR a v dráhach bez šípky produkt po prvej PCR.

Ukázali sme, že u adrenalectomovaných potkanov z kmeňa Sprague-Dawley (ktorým boli operatívne odstránené nadobličky) sme v srdcových predsieňach nepozorovali žiadny nárast hladín mRNA IP_3 receptorov typu 1 a 2 (Obr. 8). Bazálne hladiny mRNA pre oba typy IP_3 receptorov boli u adrenalectomovaných zvierat rovnaké ako u kontrol, ktoré nie sú ovplyvňované glukokortikoidmi.

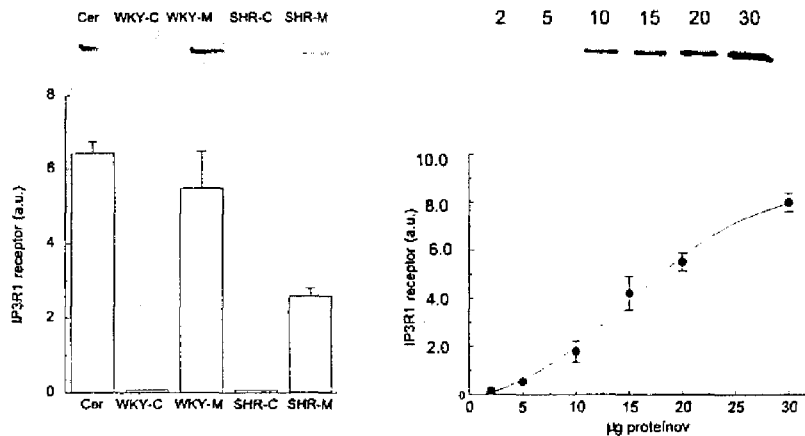


Obrázok 8. Vplyv imobilizačného stresu na hladinu mRNA IP₃R1 (vpravo) a IP₃R2 (vľavo) v ľavej (LA) a v pravej predsieni (RA) srdca u neadrenalectomovaných kontrolných (sham; prázdne stĺpce) a adrenalectomovaných (adrex; šrafované stĺpce) potkanov. kontrola: potkany, ktoré neboli imobilizované, imo: potkany imobilizované 1-krát.

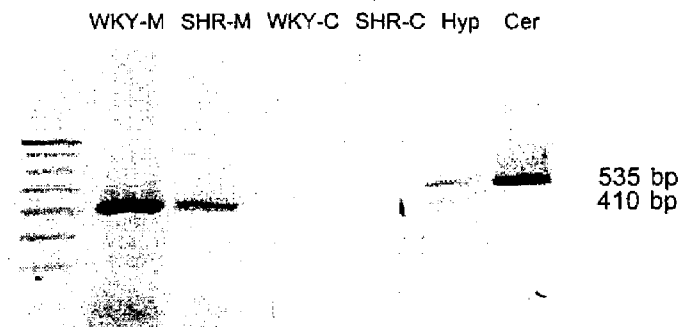
3.4. Identifikácia IP₃R1 v obličke potkana a jeho modulácia imobilizačným stresom

Pomocou polyklonálnej protilátky proti IP₃R1 sme stanovili tento typ receptora v dreni, ale nie v kôre obličky (Obr. 9). Sledovali sme hladinu mRNA aj proteínu u normotenzívnych WKY a spontánne hypertenzívnych SHR potkanov. Kratší zostrihový variant pre IP₃R1 (neneuronálnu formu) sme detegovali na hladine mRNA v dreni obličiek u WKY aj SHR potkanov (Obr. 10). Signál pre mRNA IP₃R1 sme nepozorovali v kôre obličiek ani u jedného z oboch kmeňov potkanov. Ako pozitívnu kontrolu na sledovanie expresie IP₃R1 sme používali mRNA z mozočka a hypotalamu. V týchto častiach mozgu sa exprimuje dlhší variant IP₃R1 (neuronálna forma). Okrem toho sme v hypotalame detegovali aj kratšiu neneuronálnu formu tohto typu receptora (Obr. 10). Génová expresia IP₃R1 bola väčšia v dreni u WKY potkanov ako u SHR potkanov.

V ďalšej časti experimentu sme stanovovali proteínovú hladinu IP₃R1. Proteínovú hladinu pre IP₃R1 sme detegovali v dreni, ale nie v kôre obličky u WKY a SHR potkanov (Obr. 9). Výsledky získané na úrovni mRNA korelovali s výsledkami získanými na úrovni proteínu.



Obrázok 9. Hľadina proteínu IP₃R1 v kôre (C) a v dreni (M) obličky normotenzívnych (WKY) a hypertenzívnych (SHR) potkanov. CER: mozoček, pozitívna kontrola. Vpravo: Krivka koncentračnej závislosti. Nami nanášané množstvo proteínu (20 µg) na elektroforézu sa nachádzalo v lineárnej oblasti krivky.



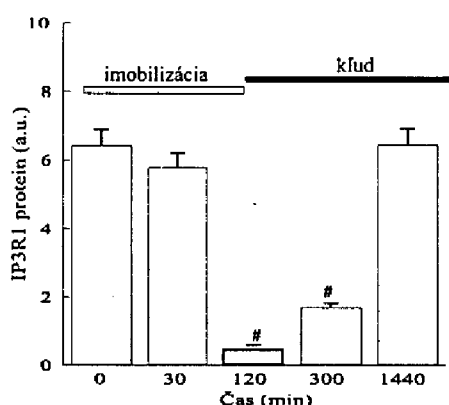
Obrázok 10. Typický príklad amplifikovaného produktu (cDNA) IP₃R1 v kôre (C) a dreni (M) obličky. WKY: normotenzívne potkany, SHR: spontánne hypertenzívne potkany. PCR fragment veľkosti 535 bp - neuronálna forma IP₃R1 a veľkosti 410 bp - neneuronálna forma IP₃R1. CER: mozoček, Hyp: hypotalamus.

Imobilizačný stres významne vplýval na zmeny hladiny proteínu IP₃R1 v dreni obličky u normotenzívnych potkanov. Po 2 hod imobilizácie sme pozorovali signifikantné zníženie hladiny proteínu IP₃R1 (Obr. 11). Toto zníženie bolo približne 5-násobné po jednorázovej imobilizácii (IMO1; #*p* < 0,001) v porovnaní s kontrolou v čase *t*=0. Po následnom vystavení zvierat 24 hod kľudu, sa množstvo proteínu vrátilo na pôvodnú hladinu ako v kontrolnej skupine. Proteín pre IP₃ receptor typu I sme nepozorovali v kôre obličky ani po vystavení WKY a SHR potkanov imobilizačnému stresu.

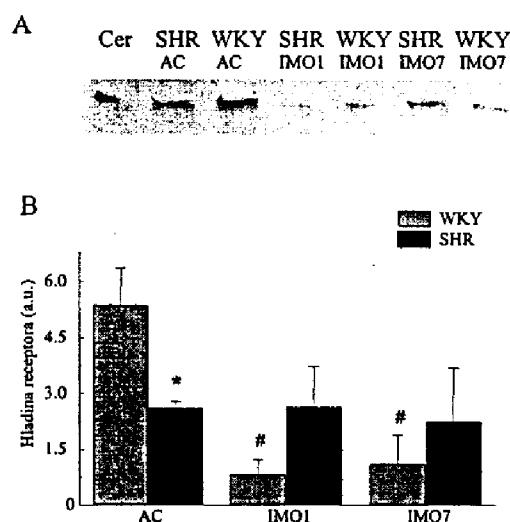
Taktiež sme porovnávali mRNA a proteínovú hladinu IP₃R1 medzi WKY a SHR potkanmi v dreni obličky po vplyve imobilizačného stresu, v porovnaní s kontrolnou skupinou. mRNA, ako aj proteínové hladiny IP₃R1 boli signifikantne vyššie (*p* < 0,01) v kontrolnej skupine (AC) WKY potkanov v porovnaní s SHR potkanmi (Obr. 12). Zistili

sme, že imobilizačný stres ovplyvňuje zmenu hladiny mRNA aj proteínu IP₃R1 v dreni obličky u WKY potkanov, ale nemá nijaký vplyv na IP₃R1 u SHR potkanov. Jednorázová imobilizácia spôsobovala na úrovni mRNA približne 2-násobné zníženie IP₃R1, kým po opakovanej 7-násobnej imobilizácii (IMO7) bolo zníženie ešte výraznejšie. Jednorázová imobilizácia (IMO1) a tiež opakovaná imobilizácia (IMO7) výrazne znižovali hladinu proteínu IP₃R1 v porovnaní s kontrolnou skupinou (od 5,37 ± 0,99 po 1,10 ± 0,78 a.u.).

Funkčnosť IP₃ receptora sme dokázali uvoľnením ⁴⁵Ca²⁺ z mikrozómov drene obličky po pridaní IP₃. Takúto kontrolu sme robili nielen na mikrozómoch kontrolných zvierat, ale aj zvierat, ktoré boli imobilizované 1 a 7-krát (nie je ukázané).



Obrázok 11. Vplyv imobilizačného stresu na IP₃ receptor typu 1 v dreni obličky normotenzívnych potkanov. #p < 0,001.



Obrázok 12. Vplyv imobilizačného stresu na hladinu proteínu IP₃R1 v dreni obličky (B). Typický príklad výsledku Western blot analýzy (A). WKY: normotenzívne potkany, SHR: spontánne hypertenzívne potkany, AC: kontrola, IMO1: potkany imobilizované 1-krát, IMO7: potkany imobilizované 7-krát, Cer: mozogček, *p < 0,001; #p < 0,001.

5. ZÁVERY

- Naše výsledky jasne ukázali, že $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenník sa nachádzal vo veľkom množstve v ľavej komore srdca potkana. Opakovaný imobilizačný stres zvyšoval expresiu $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenníka na transkripčnej aj translačnej úrovni a tiež aj jeho aktivitu. Zistili sme, že tento efekt nebol sprostredkovaný cez glukokortikoidný responzívny element (GRE). Ukázali sme, že kortizol vplýval na $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenník znížením jeho aktivity bez ovplyvnenia hladiny mRNA a proteínu.
- Zamerali sme sa na sledovanie možnej úlohy NAADP ako induktora uvoľnenia vápnika z mikrozómov srdca potkana. Ukázali sme koncentračne aj časovo-závislé pôsobenie NAADP na uvoľnenie vápnika $^{45}\text{Ca}^{2+}$ z mikrozómov srdca. Naše experimenty boli založené na predpoklade, že NAADP ovplyvňuje ryanodínové receptory, čo sme dokazovali podávaním rozličných látok. Súčasné podanie ryanodínu a NAADP uvoľnilo rovnaké množstvo vápnika ako samotný ryanodín, čo naznačuje, že NAADP pôsobí zrejme na RYR.
- V srdci potkana sme sledovali distribúciu IP_3 receptora typu 1 a 2. Najväčšie množstvo $\text{IP}_3\text{R1}$ a 2 sme stanovili v ľavej predsieni. Nakoľko bola v komorách srdca génová expresia $\text{IP}_3\text{R1}$ a 2 veľmi nízka, potvrdili sme ju pomocou metódy „*seminested*“ PCR. V ďalšom kroku sme sledovali moduláciu IP_3 receptora typu 1 a 2 vplyvom imobilizačného stresu. Už po jednorázovom strese sme zaznamenali významný nárast hladín mRNA pre $\text{IP}_3\text{R1}$ a 2 v predsieňach srdca. Dokázali sme, že tento nárast bol spôsobený glukokortikoidmi.
- Distribúciu IP_3 receptora typu 1 sme sledovali aj v kôre a dreni obličky potkana. $\text{IP}_3\text{R1}$ sme detegovali len v dreni obličky. Expresia $\text{IP}_3\text{R1}$ bola vyššia u normotenzívnych (WKY) potkanov ako u spontánne hypertenzívnych potkanov (SHR). Vplyv imobilizačného stresu sa prejavil znížením expresie $\text{IP}_3\text{R1}$ na transkripčnej i translačnej úrovni v dreni obličky u WKY potkanov. Imobilizačný stres nemal vplyv na $\text{IP}_3\text{R1}$ u SHR potkanov.

6. LITERATÚRA

- Bak J, White P, Timár G, Missiaen L, Genazzani AA, Galione A.** Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate triggers Ca^{2+} release from brain microsomes. *Current Biology* 1999;9:751-754
- Cancela JM, Churchill GC, Galione A.** Coordination of agonist-induced Ca^{2+} -signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature* 1999;398:74-76
- Cannell MB.** Contribution of sodium-calcium exchange to calcium regulation in cardiac muscle. *Ann NY Acad Sci* 1991;639:428-443
- Flesh M, Schwinger RH, Schiffer F, Frank K, Sudkamp M, Kuhn-Regnier F, Arnold G, Bohm M.** Evidence for functional relevance of an enhanced expression of the Na^+ - Ca^{2+} exchanger in failing human myocardium. *Circulation* 1996;94:992-1002
- Genazzani A, Carafoli E, Guerini D.** Calcineurin controls inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor expression in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5797-5801
- Gorza L, Schiaffino S, Volpe P.** Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in heart: evidence for its concentration in Purkinje myocytes of the conduction system. *J Cell Biol* 1993;121:345-353
- Chomczynski P, Sacchi N.** Single step method of RNA isolation by acid guanidine isothiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159
- Katz AM.** Calcium channel diversity in the cardiovascular system. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:522-529 *Review*
- Křižanová O, Novotová M, Zachar J.** Characterization of DHP binding protein in crayfish striated muscle. *FEBS Lett* 1990;267:311-315
- Kvetňanský R, Mikulaj L.** Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeat immobilization stress. *Endocrinol* 1970;87:738-743
- Lederer WJ, Niggli E, Hadley RW.** Sodium-calcium exchange in excitable cells: fuzzy space. *Science* 1990;248:283
- Lee HC.** NAADP: An emerging calcium signaling molecule. *J Membrane Biol* 2000;173:1-8 *Review*
- Moschella MC, Marks AR.** Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression in cardiac myocytes. *J Cell Biol* 1993;120:1137-1146
- Monkawa T, Hayashi M, Miyawaki A, Sugiyama T, Yamamoto-Hino M, Hasegawa M, Furuichi T, Mikoshiba K, Saruta T.** Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the rat kidney. *Kidney Int* 1998;53:296-301

- Reeves JP, Sutko JL.** Sodium-calcium ion exchange in cardiac membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:590-594
- Reinecke H, Studer R, Vetter R, Holtz J, Drexler H.** Cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity in patients with end-stage heart failure. *Cardiovasc Res* 1996;31:48-54
- Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Böhm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H.** Gene expression of the cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 1994;75:443-453
- Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Marumo F.** PCR localization of angiotensin II receptor and angiotensinogen mRNAs in rat kidney. *Kidney Int* 1993;43:1251-1259
- Webster RJ, Sabbadini RA, Dettbarn CA, Paolini PJ.** Sphingosine effects on the contractile behavior of skinned myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26:1273-1290
- Yang T, Terada Y, Nonoguchi H, Tomita K, Marumo F.** Expression of mRNA for different types of IP_3 receptors in rat kidneys. *Am J Physiol* 1995;268:1046-1052

7. ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH PRÁČ

IN EXTENSO

1. Lieskovska J, Opavsky R, **Zacikova L**, Glasova M, Pastorek J, Pastorekova S. Study of in vitro conditions modulating expression of MN/CA IX protein in human cell lines derived from cervical carcinoma. *Neoplasma* 1999;46:17-24
2. **Žáčiková L**, Križanová O. Structure and function of selected Ca^{2+} transport systems in cardiac cells. (in Slovak), *Čs Fyziol* 1999;48:62-76
3. **Žáčiková L**, Kvetňanský R., Križanová O. Increased expression of the Na/Ca exchanger in the rat heart after immobilization stress is not induced by cortisol. *FEBS Letters* 1999; 457:423-428
4. **Žáčiková L**, Ondriaš K, Kvetňanský R, Križanová O. Identification of type 1 IP_3 receptors in the rat kidney and their modulation by immobilization stress. *BBA* 2000;77831:1-7
5. **Zacikova L**, Ondrias K, Kvetnansky R, Krizanova O. Immobilization stress affects the calcium homeostasis in rat kidney by modulation of calcium transport systems. In: *Stress: Neural, Endocrine and Molecular Studies* (in press).

6. Mojžišová A, Križanová O, **Žáčiková L**, Kominková V, Ondriaš K. Nicotinic acid dinucleotide phosphate activates ryanodine calcium release channel in heart. *Gen Physiol Biophys* 2000 (submitted)

ABSTRAKTY

1. Obdržálková D, **Žáčiková L**, Križanová O. The optimisation of methods and conditions for expression studies of some systems. (in Slovak), *Klinická biochemie a metabolismus* 1998;3
2. **Žáčiková L**, Kvetňanský R, Križanová O. Effect of the immobilization stress on changes in expression of the Na/Ca exchanger in heart parts. *Physiol Res* 1998;47:p.15
3. **Žáčiková L**, Kvetňanský R, Križanová O. Increase in the expression of the Na/Ca exchanger in the rat heart after immobilization stress is not induced by cortisol. 9th International Congress of the Czech and Slovak Neurochemical Society, Martin, Slovakia. Programme and Abstracts 1998;p.22
4. Križanová O, **Žáčiková L**, Gerová M, Kristek F. Study of the mutual interaction of angiotensin II and the nitric oxide in the cardiovascular system of rat. 75th Physiological days, Košice, Slovakia. Abstract book 1999;p.62-63.
5. **Žáčiková L**, Ondriaš K, Kvetňanský R, Križanová O. Immobilization stress affects the Ca²⁺-homeostasis by modulation of calcium transport systems. Seventh Symposium On Catecholamines And Other Neurotransmitters In Stress. Smolenice Castle, Slovakia. Abstracts 1999;p.72
6. **Záčiková L**, Jurkovicová D, Gerová M, Kristek F, Križanová O. Mutual interaction of angiotensin II and the nitric oxide in the cardiovascular system of rat. *Free Radicals, Nitric Oxide and Antioxidants in Health and Disease*. Antalya, Turkey. Abstract book 1999;p.77
7. **Žáčiková L**, Ondriaš K, Kvetňanský R, Križanová O. Identification of type 1 IP₃ receptors in the rat kidney. 76th Physiological days, Hradec Králové, Czech Republic, 2000
8. Križanová O, **Žáčiková L**, Kvetňanský R. Modulation of selected Ca²⁺ transport systems in the rat heart. 76th Physiological days, Hradec Králové, Czech Republic, 2000

9. **Žáčiková Ľ**, Ondriaš K, Kvetňanský R, Križanová O. Identification of type 1 IP₃ receptors in the rat kidney and their modulation by immobilization stress. 3rd International symposium on Membrane channels, transporters and receptors. Smolenice Castle, Slovakia. Abstract book 2000;p.69
10. Mojžišová A, Križanová O, **Žáčiková Ľ**, Ondriaš K. Effect of nicotinic acid dinucleotide phosphate on RYR2 calcium release channel. 3rd International symposium on Membrane channels, transporters and receptors. Smolenice Castle, Slovakia. Abstract book 2000;p.39
11. Križanová O, **Žáčiková Ľ**, Kvetňanský R. Modulation of selected calcium transport systems by immobilization stress. 3rd International symposium on Membrane channels, transporters and receptors. Smolenice Castle, Slovakia. Abstract book 2000;p.61

8. SUMMARY

This thesis deals with the identification of selected calcium transport systems and their modulation by immobilization stress in rat heart and kidney.

In our experiments we used normotensive (Sprague-Dawley, Wistar-Kyoto) and hypertensive (SHR) strains. We compared mRNA levels, protein expression and activity of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger from hearts of control animals, animals subjected to a single (once) or repeated (seven times) immobilization stress and from animals treated continually with cortisol. We have observed that immobilization stress increased both, gene expression and protein message of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in rat cardiac left, but not right ventricle. This effect is not mediated through the glucocorticoid responsive element. We have found that cortisol decreased activity of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger without changing expression and protein amount of this transport system.

IP_3 receptor of type 1 and 2 was detected on mRNA levels in rat cardiac atria. Very small amounts of these receptors were observed in rat cardiac ventricles. Since it was difficult to detect these amounts in ventricles, we used „*seminested*“ PCR to verify expression of $\text{IP}_3\text{R1}$ and 2 in cardiac ventricles. The highest levels of $\text{IP}_3\text{R1}$ and 2 were expressed in left atria. Immobilization stress significantly increased mRNA $\text{IP}_3\text{R1}$ and 2 in rat cardiac atria.

We observed both, mRNA and type 1 IP_3 receptor's protein in renal medulla, but not in renal cortex. We have found that this receptor was approximately twice as abundant in normotensive as in genetically hypertensive rat kidney. Immobilization stress significantly down-regulated $\text{IP}_3\text{R1}$ in renal medulla, but not in renal cortex.

To investigate the role of NAADP in signaling we measured $^{45}\text{Ca}^{2+}$ release from rat cardiac microsomes. We examined concentration and time dependence of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ release from rat cardiac microsomes.

All these results could contribute to the understanding of Ca^{2+} modulation in cardiac and kidney under normal and pathophysiological conditions.