

**Intracelluláris kalciumoszillációk mechanizmusának
vizsgálata elektromosan nem ingerelhető sejtekben**

Doktori (PhD) – értekezés

Visegrády András

Programvezető:	Dr. Sümegi Balázs, egyetemi tanár
Alprogramvezető:	Dr. Somogyi Béla, egyetemi tanár
Témavezető:	Dr. Somogyi Béla, egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézete
2002.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Somogyi Bélának bizalmát és szakmai támogatását, amit az új kutatási téma felfedezéséhez nyújtott.

Köszönetet szeretnék mondani dr. Lustyik Györgynek, Grama Lászlónak, dr. Lakos Zsuzsának, dr. Homolya Lászlónak, és bátyámnak, dr. Visegrády Tamásnak szakmai segítségükért, Garajszkyné Papp Erzsébetnek és Sándorné Soós Mónikának pedig segítőkész közreműködésükért. Ezen kívül köszönettel tartozom a PTE ÁOK Biofizikai Intézet összes dolgozójának.

Végül hálámat szeretném kifejezni szüleimnek, akik támogatásukkal lehetőséget teremtettek e munka elkészítéséhez.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	5
2. A kalcium jelátvitel elektromosan nem ingerelhető sejtekben	6
2.1. A kalcium szerepe elektromosan nem ingerelhető sejtekben	6
2.2. Az intracelluláris kalciumhomeosztázis	8
2.3. Kémiai inger keltette kalciumfelszabadulás mechanizmusa	10
3. Biokémiai oszcillációk	12
3.1. Kémiai oszcillációk	12
3.2. Biokémiai oszcillációk	13
4. Intracelluláris kalciumoszcillációk.....	15
4.1. Kalciumoszcillációk tulajdonságai.....	15
4.2. Visszacatolási folyamatok a kalcium jelátvitelben	17
4.3. Az intracelluláris kalciumoszcillációk mechanizmusa	19
4.3.1. Bevezetés	19
4.3.2. Kétraktaás kalcium-indukált kalciumfelszabadulás modellje	20
4.3.3. A foszfolipáz C periódikus aktiválásán alapuló modell	20
4.3.4. A protein kináz C szerepén alapuló modell.....	21
4.3.5. Az IP ₃ -függő kalcium-indukált kalcium felszabadulás modellje....	22
4.4. Kalciumoszcillációk szerepe	23
5. Kérdésfelvetés	25
5.1. Intercelluláris kalciumhullámok légúti epitélsejtekben.....	25
5.2. A SERCA aktivitásának hatása a kalciumoszcillációk frekvenciájára	26
5.3. Célkitűzés.....	27
6. Vizsgálati módszerek	28
6.1. A módszerekről	28
6.2. Fluoreszcens kalciumszint-meghatározás humán karcinóma sejtekben	
.....	30
6.2.1. Sejttenyésztés.....	30
6.2.2. Fluoreszcens jelölés és mérés.....	30

6.3. Kalciumoszillációk numerikus szimulációja	32
7. Eredmények.....	33
7.1. Extracelluláris nukleotidok-kiváltotta kalciumjelek HEp-2 sejtekben	33
7.2. Az endoplazmatikus retikulum Ca ²⁺ -ATPáz aktivitásának hatása az oszillációk frekvenciájára	39
7.2. Az endoplazmatikus retikulum Ca ²⁺ -ATPáz aktivitásának hatása az oszillációk frekvenciájára	40
8. Következtetések.....	48
8.1. Nukleotid-aktivált kalcium jelátvitel HEp-2 sejtekben.....	48
8.2. Az SERCA aktivitásának hatása az oszillációk frekvenciájára.....	49
9. Az eredmények jelentősége	52
Függelék	53
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	59
Az eddig megjelent közlemények.....	60
Referált folyóiratban megjelent poszterkivonatok.....	60
Irodalomjegyzék	61

1. Bevezetés

A magasabbrendű élőlényeknek életbenmaradásukhoz az egymástól fizikailag elkülönült sejtek működését össze kell hangolni. A sejt-sejt közötti kommunikáció néhány esetet kivéve a sejtközi térbe juttatott kémiai anyagok segítségével történik. Ezek az anyagok a célsejthez érve általában abban valamilyen újabb jelátviteli anyag, ún. másodlagos hírvivő megjelenését okozzák. Ez az a vegyület, amely aztán a sejt működését megfelelő módon megváltoztatja.

A kalciumion az eukarióta sejtek egyik legáltalánosabb másodlagos hírvivője. Szinte nincsen olyan életfolyamat, amelyet ne szabályozna a kalcium. A kalciumszint változása kíséri a petesejtek megtermékenyítését, a sejtosztódást, differenciációt és a szabályozott sejthalált, az apoptózist. Jól ismert a kalcium nélkülözhetetlen szerepe az ideg- és izomsejtek működésében, ezen kívül azonban a limfociták, mirigy-, máj-, epitel- és csontsejtek működéséhez is nélkülözhetetlen.

Ahhoz hogy a kalciumion ilyen sokféle folyamatot tudjon szabályozni, a hozzá kapcsolt jelátviteli útnak rendkívül komplexnek, nagyon jól szabályozottnak kell lennie. Ennek a szabályozórendszernek a felderítése az elmúlt évtizedekben kezdődött, és az egyre bonyolultabb molekuláris folyamatok feltárása alapján feltételezhetően még sokáig eltart.

Dolgozatomban a kalcium jelátvitelnek az egyik legérdekesebb és legkevésbé tisztázott jelenségét, a kalciumszint periódikus változását, a kalciumoszillációkat vizsgáltam. Céлом az volt, hogy a jelenség molekuláris hátteréről új információkat szerezzek.

2. A kalcium jelátvitel elektromosan nem ingerelhető sejtekben

2.1. A kalcium szerepe elektromosan nem ingerelhető sejtekben

A sejt élete során számos folyamatot szabályoz a kalcium koncentrációja. Ezt idegsejtek kivételével kizárólag egy féle módon, fehérjékhez kötődve, azok konformációjának megváltoztatásán keresztül éri el (Clapham, 1995). Időtartamát tekintve a kalciumnak lehet gyors, de rövid ideig tartó, és lassabban kialakuló, tartós hatása is (Berridge és mtsai., 1998). Az előbbi csoportba citoskeletális és transzport fehérjék működésének megváltoztatása, az utóbbiba pedig metabolikus fehérjéket és a génátírást szabályozó hatása sorolható.

A kalcium gyakran nem közvetlenül a célfehérjéhez kötődik, hanem a citoplazmában található kalciumérzékelő fehérjékkel alkot komplexet, és azokban okoz szerkezeti változást. Ilyen molekula a kalcineurin foszfatáz enzim és a kalbindin fehérjecsald tagjai, de a legelterjedtebb célfehérje a kalmodulin (CaM). Ez emberben egy 16,7 kDa tömegű fehérje, amely négy, 10^{-5} - 10^{-6} mol/l disszociációs állandójú kalciumkötőhellyel rendelkezik. A kötőhelyek betöltöttsége a fehérje alakjában jelentős változást okoz, s ezáltal az aktivált kalmodulin egyéb fehérjék számára szolgál szabályozófaktorként.

A sejten végigterjedő kalciumtranziens kíséri a petesejtek megtermékenyítését (Stricker, 1999), s számos sejtben a differenciációt, illetve a sejtosztódást is kalciumtranziensek segítik elő (Swanson és mtsai., 1997; Patel és mtsai., 2001). A kalcium, kalcium-kalmodulin-függő aktivitású kinázok és foszfatázok segítségével transzkripciós faktorokat is képes aktiválni, így számos génátírást szabályozó kaszkádfolyamatban is részt vesz (Enslin és Soderling, 1994; Cruzalegui és Bading, 2000).

Differenciált, elektromosan nem ingerelhető sejtekben a kalcium rengeteg folyamatot szabályozhat. Ezek közé tartozik a mirigysejtek működése. Mind belső-, mind külső-elválasztású mirigyek működésében szerepet játszik a kalcium (Shuttleworth, 1997). Az ingerelt sejtekben citoskeletális fehérjékre

kifejtett hatásával vezikulák kiválasztását, kalcium-vezérelt transzporterek aktiválásával pedig a plazmamembránon keresztüli ion- és folyadékszekréciónak képes kiváltani (Kasai és Petersen, 1994; Hartmann, 1998).

Szintén jelentős a szerepe májsejtek metabolikus szabályozásában (Williamson és mtsai., 1981). Vazoaktív anyagok hatására ezek a sejtek glikogénből a sejtek számára felhasználható glükózt termelnek és juttatnak a vérbe. Ebben a folyamatban a kalcium a glikogén foszforiláz enzim aktiválásával vesz részt (Bollen és mtsai., 1998).

A vizsgálataim szempontjából fontos légúti epitelsejtekben a csilló mozgás és az ionszekréciónak áll szoros kapcsolatban a kalciumszinttel (Evans és Sanderson, 1999b; Koslowsky és mtsai., 1994). Az utóbbinak igen fontos szerep juthat olyan rendellenességek, például a cisztikus fibrózis esetében, amikor egyéb mechanizmusok elégtelenek az ionszekréciónak normális működéséhez (Devidas és Guggino, 1997).

A fentiekén kívül elengedhetetlen a kalcium limfociták, fibroblasztok, endotél-, csont- és gliasejtek működéséhez.

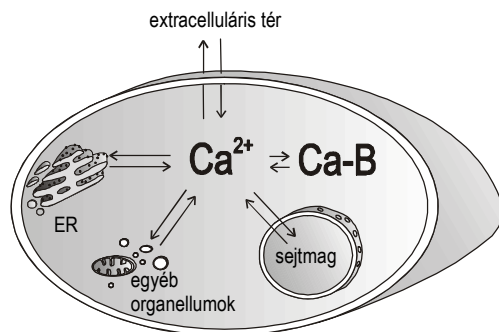
A kalcium a sejtosztódás és -működés szabályozása mellett azonban a sejtek halálában is szerepet játszik. A citoplazmában számos lebontó enzimet képes aktiválni (Kass és Orrenius, 1999), így tartósan megemelkedett szintje nekrozishoz vezethet, míg a rendellenes kalciumtranziensek a mitochondriumból kiinduló apoptózisban játszhatnak szerepet (Hajnóczky és mtsai., 2000; Nicotera és Orrenius, 1998).

Ahhoz, hogy a kalcium önmagában több folyamatot tudjon egymástól függetlenül szabályozni, az szükséges, hogy az egyes specifikus jeleket ne pusztán a kalciumszint kódolja, hanem annak térbeli és időbeli változása is információt hordozzon. Ezt rendkívül finoman szabályozott jelátviteli út és transzportmechanizmus teszi lehetővé. A kalciumháztartás sérülése így igen súlyos következményekkel járhat, több, specifikusan a kalciumegyensúlyt felborító vegyszer (így az általunk is használt ionomicin, thapsigargin, A23187) például bizonyítottan vagy feltételezetten karcinogén hatású.

2.2. Az intracelluláris kalciumhomeosztázis

A citoplazma szabad kalciumion koncentrációját az ott található kalciumkötő molekulák és a plazmát határoló membránok kalciumszállító fehérjéi szabályozzák (1. ábra).

A citoplazma kalciummennyiségének 95-99,9 %-át különböző citoplazmatikus molekulák, elsősorban kis mozgékonyaságú fehérjék (Roberts, 1993; Zhou és Neher, 1993) igen gyorsan megkötik, így a citoplazma szabad kalciumszintje viszonylag alacsony, nyugvó sejtben 50-200 nmol/l (Carafoli, 1987). Ezzel szemben mind a sejtben kívüli térben, mind egyes sejtorganelumokban a szabad kalcium koncentrációja ennél több nagyságrenddel magasabb; 1,5 mmol/l illetve 100-500 $\mu\text{mol/l}$ (Meldolesi és Pozzan, 1998). Ilyen koncentrációviszonyok mellett a citoszól kalciumszintjének emelése leggazdaságosabban ioncsatornákon keresztül érhető el, csökkentése pedig aktív kalciumtranszporterek segítségével történhet.



1. ábra
A sejt kalciumháztartásának vázlatja (ER: endoplazmatikus retikulum, Ca-B: Ca^{2+} és kalciumkötő molekula komplexe)

Kalciumbeáramlás elsősorban az extracelluláris térből, illetve az endoplazmatikus hálózathoz, vagy annak specializált részeiből történik (Jaconi és mtsai., 1997). Emellett egyéb források is előfordulhatnak, így például mirigysejtek apikális vezikulumai (Yamamoto-Hino és mtsai., 1998), de általános esetben ezeket is az endoplazmatikus retikulumhoz hasonló raktárnak lehet tekinteni. A mitochondrium ezzel szemben nem tekinthető jelentős kalciumforrásnak, benne nyugalomban a citoplazmatikushoz közeli a szabad kalcium koncentrációja (Pozzan és mtsai., 1994).

A sejtmembrán kalciumcsatornái három csoportba sorolhatók (Berridge, 1997): feszültségfüggő kalciumcsatornák, amelyek nyitását a membránpotenciál értéke szabja meg, ligand-vezérelt csatornák, amelyek extracelluláris vagy sejten belüli anyagok hatására aktiválódnak, és a legkevésbé felderített „store-operated” csatornák, amelyek ma még ismeretlen mechanizmus szerint a kalciumraktárak kimerülésének hatására képesek kalciumot engedni a sejtbe (Berridge, 1995a).

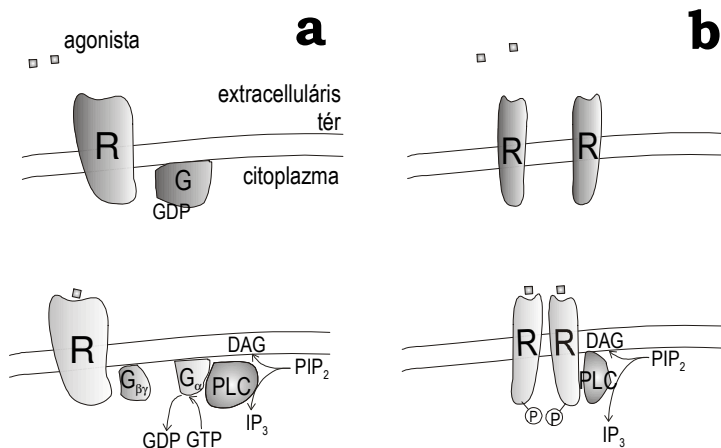
Az endoplazmatikus retikulum dinamikus, többé-kevésbé összefüggő hálózat, aminek a hártáján mai ismereteink szerint csak ligand-vezérelt csatornák találhatók. Ennek két legnagyobb csoportja a szarkoplazmatikus retikulum (rianodin receptor néven is ismert) kalciumcsatornája és az inozitol 1,4,5-triszfoszfát receptor (Berridge, 1993). Emellett az elmúlt években a sejtorganellumokon újabb csatornák létét is felvetették (Patel és mtsai., 2001).

Az aktív kalciumtranszporterek közül a legfontosabbak az ATPáz aktivitással rendelkező ún. kalciumpumpák. Ezek a fehérjék ATP hidrolíziséhez csatoltan képesek kalciumot juttatni a magasabb kalciumkoncentrációjú térbe. A plazmamembrán kalciumpumpái (ang.: plasma membrane Ca^{2+} -ATPase, PMCA) és az endoplazmatikus retikulum kalciumpumpái (ang.: sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA) mind affinitásukban, mind kinetikai tulajdonságaikban eltérnek egymástól. Négy SERCA izoformát ismerünk (Misquitta és mtsai., 1999). Kinetikájuk Hill-típusú egyenlettel írható le, a pumpák 270-1100 nM közötti K_M értékekkel rendelkeznek. A legnagyobb affinitású a nem-izom típusú 2b izoforma. Mivel aktivitásuk a fiziológias tartományban a legérzékenyebb a kalciumszint változásaira, elsősorban ezek a molekulák felelősek a citoplazmából történő kalciumeltávolításért (Camello és mtsai., 1996; Mogami és mtsai., 1998). A plazmamembrán kalciumpumpáiról kevesebbet tudunk, részben azért, mert – ellentétben a SERCA fehérjékkel – egyelőre nem ismert fajlagos gátlószerük. Legfontosabb szerepük feltételezhetően nem az aktuális kalciumszint meghatározásában, hanem a sejt és környezete közti kalciumegyensúly fenntartásában van (Camello és mtsai., 1996).

Az aktív kalciumtranszporterek másik csoportja egy másik ion transzmembrán koncentrációkülönbségének hajtóerejét használja fel a termodinamikailag akadályozott kalciumszállításra. Ilyen a plazmamembrán $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ antiportere (Valant és mtsai., 1992). Ez a molekula, akárcsak a mitochondrium Ca^{2+} uniportere, (Pozzan és mtsai., 1994), $1\ \mu\text{M}$ feletti K_M értékű Hill-kinetikával írható le, ezért szerepe nem tűnik jelentősnek a kalciumszint rövidtávú szabályozásában. A mitochondrium kis affinitású de nagy kapacitású kalciumtranszportere pedig feltételezhetően a mitochondriumhoz közeli kalciumjelek érzékelését szolgálja (Rizzuto és mtsai., 1993), a mitochondrium oxidatív folyamatainak megzavarása azonban globális kalciumjelek alakulását is befolyásolhatja (Jouaville és mtsai., 1995).

2.3. Kémiai inger keltette kalciumfelszabadulás mechanizmusa

A rendkívül sokféle kémiai inger – hormonok, citokinek, antigének, neurotranszmitterek – kétféleképpen okozhatnak kalciumszint-emelkedést a célsejtben. A plazmamembrán ligand-vezérelt kalciumcsatornához kötődve a külső térből válhatnak ki kalciumbeáramlást (Clapham, 1995), vagy – és ez a gyakoribb mód – a sejtfelszínen található fajlagos felismerésre képes receptorfehérjéhez kötődhetnek. Ez a kötődés különböző mechanizmusokon keresztül másodlagos hírvivő molekulák keletkezését váltja ki, amelyek a belső raktárak hártáján található ligand-vezérelt ioncsatornákon keresztül indítanak kalciumfelszabadulást (Toescu, 1995).



2. ábra
A receptorfüggő foszfolipáz C aktiválásának mechanizmusa G-fehérjék segítségével (a), és tirozin kináz receptorokkal (b). R: receptor, G: G-fehérje, PLC: foszfolipáz C, PIP₂: foszfoinozitol 4,5-biszfoszfát, DAG: diacilglicerin, IP₃: inozitol 1,4,5-triszfoszfát

Elektromosan nem ingerelhető sejtekben a legfontosabb kalcium mobilizáló másodlagos hírvívó az inozitol 1,4,5-triszfoszfát (Berridge, 1993). Keletkezésének sémája a 2. ábrán látható. A receptoraktiváció, azaz a transzmembrán receptorfehérje konformációjának agonista-okozta megváltozása a plazmamembrán citoplazmatikus oldalára is átterjed. A konformációváltozás továbbítása leggyakrabban G-fehérjékkal történik (2.a ábra). Ekkor a membránhoz kötött heterotrimer G-fehérje kötődik a receptorhoz és ennek hatására az eddig kötött GDP-t GTP-re cseréli, majd $G\alpha$ és $G\beta\gamma$ alegységre esik szét. Az aktivált $G\alpha$ alegység ezután a membránhoz köti a citoplazmában jelen levő foszfoinozitol-specifikus foszfolipáz C enzim β izoformáját, amely elhasítja a membrán egyik komponensét, a foszfoinozitol 4,5-biszfoszfátot (Rebecchi és Pentylala, 2000). Így két másodlagos hírvívó molekula keletkezik: a lipofil diacilglicerin és a vízdékony inozitol 1,4,5-triszfoszfát (IP_3). Az előbbi a membránhoz köti és aktiválja a protein kináz C enzimet, az utóbbi pedig a citoplazmában diffundálva intracelluláris organelumok hártáján jelen levő receptorához, egy ligand-vezérelt kalciumcsatornához kötődik. A jel megszűnését az okozza, hogy a $G\alpha$ fehérje lassan hidrolizálja a hozzá kötött GTP-t, és így magától inaktiválódik.

A receptorok másik típusa G-fehérjék nélkül képes jelátvitelre (2.b ábra). Ezek a fehérjék ligand-kötés után dimerizálódnak és egymást specifikus tirozin oldalláncaikon foszforilálják. A foszforilált receptorfehérjehez SH2 régiójával a foszfolipáz C enzim γ izoformája képes kötődni, s ez szintén foszfoinozitol 4,5-biszfoszfát hidrolízishez vezet (Rebecchi és Pentylala, 2000).

A kalciumszint-emelkedést okozó receptorok másik osztályát olyan ioncsatornák alkotják, amelyek nyugalmi állapotban zárva vannak. Agonista kötődése ezeket a csatornákat vagy közvetlenül aktiválja, vagy a feszültségküszöb megváltozásával okoz nyitást, ami változó szelektivitással kalciumbeáramlást tesz lehetővé.

A fenti típusokra példa a sejtfelszín nukleotid receptorainak P_2Y és P_2X_7 alosztálya. Az előbbi receptorcsalád a foszfoinozitol jelátvitelhez kapcsolódik, míg az utóbbiak nukleotid-vezérelt kalciumcsatornaként működnek (Conigrave és Jiang, 1995).

3. Biokémiai oszcillációk

3.1. Kémiai oszcillációk

A kémiai oszcillációk olyan reakciók, amelyek során egy vagy több komponens koncentrációja időben periódikusan változik. Az ilyen reakciókat sokáig a termodinamika második főtételének ellentmondónak és ezért lehetetlennek tartották. Az álláspont megváltozását Belouszov, majd Zsabotyinszkij eredményei váltották ki, és az általuk leírt Belouszov-Zsabotyinszkij (rövidítve BZ) reakció, amely az oszcilláló reakciók máig leginkább vizsgált prototípusa. A reakciót a tudományos világ elé táró közlemény éppen a szovjet „Biofizika” című lapban jelent meg (Zsabotyinszkij, 1964).

Ma már elfogadott, hogy az oszcilláló kémiai reakciók és kémiai hullámok nem mondanak ellent a termodinamika törvényeinek. A zárt rendszerben létrejövő oszcilláló kémiai reakciók időben valóban elhalnak, de nyitott rendszerben állandósult periódikus viselkedés is megfigyelhető. Elméleti és kísérleti vizsgálatok nyomán ma már azt is tudjuk, hogy milyen folyamatok okozhatják ezeket a különleges jelenségeket. Gyakran a különböző reaktánsok, intermedierek és termékek egymás átalakulási folyamatait különböző visszacsatolásokon keresztül befolyásolni tudják. Negatív visszacsatolás (ang.: feedback) esetén egy komponens gátolni, pozitív visszacsatolás esetén gyorsítani képes a képződéséhez vezető reakcióutat. A pozitív visszacsatolás speciális fajtája az autokatalízis, amikor egy termék közvetlenül az azt termelő reakciót képes felgyorsítani. Kémiai oszcillációk létrejöttének az a feltétele, hogy a rendszer eltérő kinetikájú negatív és pozitív visszacsatolási körökkel rendelkezzen (Gray és Scott, 1994). Legegyszerűbb esetben egy pozitív és egy késleltetett jelentkező negatív visszacsatolás elégséges a kémiai instabilitás létrejöttéhez.

Az oszcilláló reakciók egy másik jellegzetessége, hogy nemlineáris kinetikájú lépésekkel rendelkeznek. Egyes komponensek koncentrációjának kis mértékű

változása így a reakciósebesség jelentős változását okozhatja.

Az egzotikus kémiai reakciók számos érdekes tulajdonsága közé tartozik a térbeli mintázatképződés. Ekkor a térben monoton inhomogén kezdeti koncentrációeloszlás maximumokkal és minimumokkal rendelkező mintázatot vehet fel. Ilyen alakzatok például a térben terjedő koncentrációfrontok, vagy kémiai hullámok. Ha ezek a hullámok állandó sebességgel terjednek, az arra utal, hogy a mintázat kialakulásáért felelős reakcióban helyi erősítési folyamat (pozitív visszacsatolás) vesz részt.

3.2. Biokémiai oszcillációk

Az élő szervezetek az egyensúlytól távol működő nyitott termodinamikai rendszerek, működésükhöz nagyfokú rendezettség kialakítása és fenntartása szükséges. Az időbeli rendezettség elérésének egyik legkézenfekvőbb módja sejtek vagy azok csoportjainak szinkronizált működtetése. Az élő szervezetekre ezért általánosan jellemzőek a ritmikus folyamatok (Lloyd és Rossi, 1993). Ez enzimreakciók sebességétől kezdve akár egyes szervek működéséig is jellemző lehet (Goldbeter, 1996). A pacemaker sejtek szívösszehúzódást kiváltó periódikus membránpotenciál-változása ugyanúgy az ember életének jellemzője, mint a közel 24 órás circadián napi biológiai ritmus.

A ma ismert biokémiai oszcillátorok közül a legtöbb különböző folyamatok szabályozásában vesz részt. Ezek a periódikus folyamatok vezérelnek aztán olyan egyszeri, irreverzibilis folyamatokat, mint a sejtosztódás (Tyson és mtsai., 1996), szekréció (Murray, 1989) vagy izomösszehúzódás.

A biológiai folyamatok oszcillátorokkal történő szabályozásának számos előnye van (Rapp, 1987). Ezeknek a folyamatoknak a periódusideje jóval hosszabb, mint az alapul szolgáló egyes biokémiai reakciók időállandói. Így egymáshoz kapcsolt, egyenként rövid hatású reakciókkal hosszú időtartamú pontos szabályozás valósítható meg. Ezen kívül kiemelkedő előnye a ritmusokkal történő szabályozásnak, hogy kevésbé érzékeny az egyes komponensek koncentrációját megzavaró véletlen környezeti behatásokra

(Rapp és mtsai., 1981).

Bár a kémiai oszcillációk ismeretében nyilvánvaló, hogy a biológiai ritmusok az állandósult állapotokhoz hasonlóan a természeti törvények szabályos következményei, részletes kutatásuk, és így gyógyászati alkalmazásuk (kronofarmakológia) még sokkal korlátozottabb.

Egy olyan rendszerben, amelyet biológiai ritmus irányít, nemcsak a részreakciók hiánya okozhat zavart, hanem az is, ha az oszcilláló rendszert alkotó folyamatok közti kapcsolatok sérülnek. A funkcióvesztésnek ez az oka kizárólag periódikus folyamatokra értelmezhető, és nem jelentkezik monoton folyamatok esetén. Talán éppen ezért, és mert vizsgálatuk igen körülményes, nem annyira kutatottak azok a működési rendellenességek, amelyeket önmagukban funkcióképes biokémiai folyamatok tökéletlen kapcsolata okoz. Ilyen kóros jelenséget mind sejtek (Gomez és mtsai., 1997; Witkowski és mtsai., 1998), mind szervek szintjén kimutattak (Godin és Buchman, 1996).

4. Intracelluláris kalciumoszillációk

4.1. Kalciumoszillációk tulajdonságai

Bár az intracelluláris kalciumkoncentráció szabályozó szerepe régóta ismert (Rasmussen, 1970), a különböző hatásokra bekövetkező változásának kinetikáját sokáig csak sejtpopulációkban tudták meghatározni, mert egészen az 1980-as évek elejéig nem állt rendelkezésre olyan módszer, amellyel kisméretű egyedi sejtek citoplazmatikus kalciumszintjét megbízhatóan és reprodukálhatóan mérni lehetett volna. Az áttörést az egyidőben megjelenő indikátorok, az aequorin fotoprotein (Cobbold és mtsai., 1983), de méginkább a fluoreszcens kalciumindikátorok, a quin-2 (Tsien, 1980; Tsien és mtsai., 1982), majd a fura-2 (Gryniewicz és mtsai., 1985) hozták meg, amelyekkel intakt sejtek kalciumtranzienseit tudták megfigyelni. Mindjárt az első mérések különös felfedezéseket hoztak.

A köztudat szerint (Berridge, 1995b) a citoplazmatikus kalciumszint-változás kinetikájáról az első meglepő megfigyelést Cobbold és munkatársai közölték 1986-ban a Nature-ben (Woods és mtsai., 1986). Valójában azonban hasonló eredmények már korábban megjelentek a szakirodalomban (Ueda és mtsai., 1983; Cuthbertson és Cobbold, 1985), az első már 1980-ban (ennek szerzői szabadkoztak is a számukra is hihetetlen megfigyelés miatt) (O'Doherty és mtsai., 1980). Ezek a közlemények egybehangzóan megállapították, hogy szubmaximális kémiai inger hatására a sejtekben a citoplazma szabad kalciumszintje időben periódikusan változik. Ezt a jelenséget *intracelluláris kalciumoszillációnak* nevezik.

1986 után sorozatosan jelentek a meg különböző sejtekben lejátszódó kalciumoszillációkról szóló beszámolók (áttekintést közöl többek közt (Berridge, 1990; Tsien és Tsien, 1990; Fewtrell, 1993)), majd biokémiai mechanizmusuk rendszeres felderítése is elkezdődött (Thomas és mtsai., 1996).

Bár kalciumoszillációkat mára már nagyon sok sejtben leírtak, szinte nincs

két sejtípus, amelyben azok jellemzői teljesen megegyeznének. A következőkben összefoglalom az oszcillációkra legjellemzőbb tulajdonságokat, majd az oszcillációkban feltételezhetően fontos szerepet játszó biokémiai folyamatokat (részletes ismertetésük megtalálható többek közt a fenti közleményekben és az azokban hivatkozott publikációkban).

1. A kalciumtranziensek lefutása

A leggyakrabban megfigyelt kalciumoszcillációk során a citoplazma átlagos kalciumszintjében rövid ideig tartó csúcsok és ezeket elválasztó hosszabb, a nyugalmi szinthez közeli szakaszok váltakoznak.

A másik gyakran megfigyelt típusnál, az ún. szinuszos oszcillációknál a kalciumszint egy megemelkedett érték körül mutat többé-kevésbé szimmetrikus ingadozást.

Egyes sejtípusokban a válasz jellege az aktiváló anyagtól is függ.

2. A kalciumoszcillációk időtartama és amplitúdója

Az oszcillációk állandó kémiai inger hatására jönnek létre, és megfelelő körülmények között akár órákon keresztül is megfigyelhetők. A periódusidő sejtípusról-sejtípusra és külső paramétereiktől függően is változik, néhány másodperctől órákig terjedhet, de leggyakrabban 30-60 s körüli. Az ismétlődő kalciumtranziensek amplitúdója általában 500-1000 nM.

3. A frekvencia függése az inger erősségétől

Az alapvonallal elválasztott kalciumoszcillációk egyik legérdekesebb tulajdonsága az, hogy a tranziensek gyakorisága függ az alkalmazott kémiai inger erősségétől. Az agonista koncentrációját növelve a frekvencia többszörösére növekszik, miközben az amplitúdó nem változik jelentősen. Ez a tulajdonság a szinuszos oszcillációkra nem jellemző, ezekben az inger nem befolyásolja a frekvenciát.

4. Oszcillációk extracelluláris Ca^{2+} hiányában

Néhány kivételtől eltekintve az oszcillációk akkor is létrejönnek, ha a külső térben nincsen jelen kalcium. Ebben az esetben sejttípustól függő ideig a szokásoshoz hasonló lefutású tranziensek figyelhetők meg, amelyek idővel elhalnak.

5. Az IP_3 szintje az oszcillációk során

Számos sejtben az oszcillációkat állandó koncentrációban intracellulárisan adagolt IP_3 -mal vagy annak nem metabolizálható analógjával is ki lehet váltani, ezért azt feltételezik, hogy az oszcillációkhoz nem szükséges az IP_3 szintjének változása. Egyes kísérletek azonban arra utalnak, hogy néhány sejttípusban a kalciumoszcillációkat az IP_3 szintjének periódikus változása kísérheti.

4.2. Visszacsatolási folyamatok a kalcium jelátvitelben

1. Az IP_3 receptor szabályozása

A legtöbb sejttípusban az oszcillációkban feltételezhetően az IP_3 receptor játszik kulcsszerepet. Ennek mind az IP_3 , mind a kalcium általi szabályozása rendkívül bonyolultnak tűnik, és molekuláris részletei még nincsenek kellően tisztázva.

A receptor négy azonos alegységből álló transzmembrán fehérje, amelynek legnagyobb része a citoplazmatikus oldalon helyezkedik el (Taylor és Traynor, 1995). Feltételezések szerint a négy alegység transzmembrán hélicei egy csatornát alkotnak, amely nyugalmi állapotban zárva van.

Az IP_3 – egyes feltételezések szerint kooperatív (Meyer és Stryer, 1988; Marchant és mtsai., 1999) – kötődése konformációváltozást okoz a fehérjében, aminek következtében kalciumkötőhely alakul ki a fehérje felszínén (Taylor,

1998). A kalcium kötődése a csatorna nyitását eredményezi (Marchant és mtsai., 1999). A receptor azonban feltételezhetően egy másik kalciumkötőhellyel is rendelkezik. Ha a kalcium ide kötődik, az a csatorna inaktiválódását okozza (Iino, 1990; Finch és mtsai., 1991; Bezprozvanny és mtsai., 1991). Feltételezések szerint a két kalciumkötőhely affinitása hasonló, a kötési és disszociációs sebességi állandók azonban eltérnek egymástól; az aktiválódási hely gyorsabban köti meg és engedi el a kalciumot (Bootman és mtsai., 1995).

Ha az IP_3 kötődését követően egy időintervallumon belül nem történik csatornaaktiváció, IP_3 receptor önmagától bezárul (Hajnóczky és Thomas, 1994). Ezáltal a csatorna szigorúan szabályozott koincidencia detektorként működik, ami a sejt számára biztonságos működést biztosít (Marchant és Taylor, 1997); nem engedi, hogy a csatorna véletlen aktivációja a nyugvó sejtben kalciumjelet keltsen.

Az IP_3 receptor működését egyelőre tisztázatlan mértékben még számos egyéb tényező befolyásolja (Taylor, 1998). Ezek közül igen jelentősnek tűnik a receptor lumenális kalcium általi szabályozása (Parys és mtsai., 1996). Eszerint az IP_3 receptor érzékeli az általa kinyitott kalciumraktár kalciumtartalmának csökkenését. Egyelőre nem tisztázott mechanizmuson keresztül a kalciumraktár részleges kimerülése a csatorna bezáródását okozza.

2. A foszfolipáz C kalcium általi aktivációja

Jól ismert, hogy az IP_3 -at termelő enzim, a foszfolipáz C aktivitása függ a kalcium koncentrációtól (Eberhard és Holz, 1988), és arra éppen a fiziológias tartományban a legérzékenyebb (Mouillac és mtsai., 1990). Lehetséges, hogy ennek – egyelőre nem tisztázott mértékben – szerepe lehet a kémiai ingerrel kiváltott kalciumszint-emelkedésben. Az IP_3 által felszabadított kalcium ugyanis megfelelő esetben az IP_3 termelés fokozásával további kalciumkiáramlást okozhat. A foszfolipáz C δ aktivitásának igen érzékeny kalciumfüggése és a receptoraktivációtól való kismértékű függése alapján

lehetséges, hogy ennek az izoformának egyenesen a kalciumválaszok felerősítése a feladata (Rebecchi és Pentyala, 2000). Ennek a feltételezett visszacsatolásnak azonban több lényeges eleme még felderítetlen, így például nem jellemzett a kalciumraktárak és a foszfolipáz C elsősorban plazmamembránban található szubsztrátjának sejten belüli előfordulása.

3. Sejtfelszíni receptor deszenzitizáció

Számos sejtben állandó kémiai inger időben csökkenő hatást vált ki. Ennek az oka többek közt a receptorok deszenzitizálódása lehet, aminek számos módja létezik. A kalciumtranziensek szempontjából különösen érdekes lehet a receptor vagy G-fehérje protein kináz C általi foszforilációját követő inaktiváció (Morley és mtsai., 1996; Sagi-Eisenberg, 1989). A protein kináz C-t ugyanis, a fentiek alapján az IP₃-mal párhuzamosan képződő hírvívó, a diacilglicerin aktiválja, ezért a jelátvivő molekulák foszforilációja a Ca²⁺ szinttől független visszacsatolásként szolgálhat.

Molekuláris biológiai módszerekkel sikerült is kimutatni a protein kináz C periódikus transzlokációját a sejtthártyához (Oancea és Meyer, 1998), ennek szerepe a jelátvitelben azonban egyelőre még ismeretlen.

4.3. Az intracelluláris kalciumoszillációk mechanizmusa

4.3.1. Bevezetés

A citoplazmatikus kalciumoszillációk mechanizmusának felderítése elengedhetetlen az ismétlődő kalciumjeleket alkalmazó jelátviteli út működési rendellenességeinek orvoslásához. A folyamat bonyolultságából és a vizsgálandó rendszer sérülékenységből adódóan azonban ennek a jelenségnek a molekuláris háttere még koránt sincs feltárva.

Jelenleg a megismerés korai szakaszánál tartunk: egyes javaslatok megpróbálják összefoglalni az oszcillációkhoz nélkülözhetetlennek tartott kölcsönhatásokat, és a folyamatot ezekkel a leegyszerűsített modellekkel

próbálják leírni. A viszonylag kevés folyamatot tárgyaló, és szükségszerűen számos önkényes feltételezést tartalmazó modellektől nem várhatjuk el, hogy tökéletesen leírják a kísérletekben tapasztaltakat, azonban kiindulási pontként fontos szerepük van az oszcillációk részletesebb felderítésében. A kalciumjelátvitel felderítéséhez tehát nélkülözhetetlen pontosításuk és molekuláris részleteik tisztázása.

A következőkben a kísérletekkel leginkább alátámasztott, legfontosabb feltételezett mechanizmusokat mutatom be.

4.3.2. Kétraktáros kalcium-indukált kalciumfelszabadulás modellje

Ez a modell állandó IP_3 szint mellett ír le oszcillációkat. Azt feltételezi, hogy a sejtben két, funkcionálisan különböző kalciumraktár létezik (Berridge, 1991). Az egyiket az IP_3 , a másikat a citoszólikus Ca^{2+} aktiválja. A modell szerint az IP_3 -érzékeny raktárból kiáramló kalcium nyitja meg a nagyobb kapacitású, nem IP_3 -érzékeny raktárat. Mivel az innen kiszabaduló kalcium is aktiválólólag hat, a második raktárból autokatalitikus felszabadulás indul el, aminek a raktár kimerülése vet véget. Ezt a raktár lassú feltöltődése, majd a ciklus újraindulása követi.

Noha a mechanizmus alapján felállított matematikai modell (Goldbeter és mtsai., 1990) az oszcillációk számos dinamikai tulajdonságát reprodukálja (Wakui és mtsai., 1990; Dupont és mtsai., 1991), számos kísérleti megfigyelést nem képes megmagyarázni. Legtöbbször kalcium injektálása önmagában nem okoz kalciumoszcillációt (Yao és Parker, 1992), másrészt, nem ingerelhető sejtekből az IP_3 független kalciumcsatorna, a rianodin receptor gyakran hiányzik, illetve gátlása nem akadályozza meg az oszcillációkat (Thomas és mtsai., 1996; Bennett és mtsai., 1996).

4.3.3. A foszfolipáz C periódikus aktiválásán alapuló modell

Ennek a mechanizmusjavaslatnak az alapja az a megfigyelés, hogy a foszfolipáz C aktivitása jelentősen függ a kalcium koncentrációtól (Eberhard

és Holz, 1988). A modell szerint az oszcillációkhoz szükséges erősítést az jelenti, hogy a receptoraktivációt követően képződő inozitol 1,4,5-triszfoszfát által felszabadított kalcium a környezetében fokozza a foszfolipáz C aktivitását, ami további IP_3 termelődést és kalciumfelszabadulást eredményez (Meyer és Stryer, 1988). Negatív visszacsatolásként – az irodalmi adatoknak megfelelően – az IP_3 receptor kalcium általi gátlása szerepel (Meyer és Stryer, 1991).

A modellnek ellentmond, hogy kalciuminjektálás önmagában általában nem elegendő regeneratív kalciumtranziensek kiváltásához (Yao és Parker, 1992), a mérési eredmények azonban egyes sejtekben alátámasztják a mechanizmust (Harootunian és mtsai., 1991; Hirose és mtsai., 1999; Codazzi és mtsai., 2001).

4.3.4. A protein kináz C szerepén alapuló modell

Ez az elképzelés protein kináz C általi periódikus receptordeszenzitizációval és így periódikus IP_3 termeléssel magyarázza az oszcilláló kalciumválaszt (Bird és mtsai., 1993). A modell szerint a protein kináz C enzim, amit az IP_3 -tal párhuzamosan képződő diacilglicerin aktivál, foszforilálja a receptorfehérjét vagy a G-fehérjét, és így leállítja a foszfoinozitol 4,5-biszfoszfát bomlását. A kezdeti kalciumfelszabadulást így az IP_3 -szint majd a kalciumszint csökkenése követi, s az újabb ciklus a diacilglicerin elfogyását és az inaktiváció elmúlását követően kezdődhet el.

A modellt rövid periódusidejű szimmetrikus oszcillációkra írták fel, és ez összhangban van azzal, hogy az IP_3 életideje *in vivo* valóban megfelel a 10-20 s-os oszcillációknak (Wang és mtsai., 1995), azonban önmagában nem érvényes olyan sejtekben amelyekben a G-fehérjék állandó aktiválása is kivált periódikus kalciumjeleket (Wakui és mtsai., 1989). Emellett kérdéses, hogy a protein kináz C milyen kinetikával aktiválódik a periódikus kalciumjelek során, és hogy ez az aktivitás hatásában mennyire hasonlít az állandó, farmakológiai aktiváláshoz (Nishizuka, 1995).

4.3.5. Az IP₃-függő kalcium-indukált kalcium felszabadulás modellje

Az intracelluláris kalciumoszillációknak ez a ma leginkább elfogadott modellje, ami az IP₃ receptor kalcium általi szabályozásán alapul (Finch és mtsai., 1991; De Young és Keizer, 1992). A modell alapjául szolgáló megfigyelés az, hogy az IP₃ receptort a kalciumion aktiválni és inaktiválni is képes. Még ha egyes sejtekben – elsősorban hosszú periódusidejű oszcillációk esetében – nem csak ez a mechanizmus felelős is az oszcillációkért, az IP₃ receptor szabályozása feltételezhetően minden sejttypusban nagyon fontos eleme a kalcium jelzőrendszernek.

A modell szerint az oszcillációk lefutása a következő. Kémiai inger hatására megemelkedik a citoplazma IP₃ koncentrációja. Az IP₃ kötődése a receptorához viszonylag gyors (Marchant és mtsai., 1999), így az IP₃-at kötött receptorok száma – ami köztes ingerek esetén feltehetően növekvő függvénye az IP₃ szintnek és így az inger erősségnek – hamar beáll egyensúlyi értékére. Az ily módon aktiválhatóvá tett receptorok egy kis hányadához már a nyugalmi helyzetben kis koncentrációban jelen levő kalcium is kötődik. Ekkor az endoplazmatikus retikulumból lassan kalciumkiáramlás indul meg. A szabad kalciumszint kezdetben – a kalciumpufferek és pumpák hatására – lassú emelkedése újabb receptorok nyitását eredményezi, így önerősítő felszabadulás indul el. Ez a szakasz akkor ér véget, amikor a kalcium a gátló helyekre is bekötődik, ami a csatornák záródását okozza. Mivel a Ca²⁺-ATPázok folyamatosan távolítják el a citoplazmából a kalciumot, annak szintje csökkenni kezd, és az inaktiválódott receptorokról a kalcium disszociál. A gátlóhelyről történő lassabb disszociáció következtében a kalciumszint az egyensúlyi érték alá süllyed. Az újabb ciklus akkor indulhat el, amikor a kalcium a gátló helyről is disszociált, ezáltal a receptor újra aktiválhatóvá vált (Finch és mtsai., 1991).

Ezt a mechanizmust először De Young és Keizer írta fel matematikai formában (De Young és Keizer, 1992), amit más szerzők is követtek (Atri és mtsai., 1993; Li és mtsai., 1994; Tang és Othmer, 1995). Az utóbbi modellek a De Young-Keizer modell leegyszerűsítéseinek tekinthetők, amelyekben

kinetikai okokból vagy kísérleti megfigyelések alapján hanyagolnak el bizonyos folyamatokat. Közös jellemzőjük, hogy – szemben az eredeti modellel – pillantszerűnek tekintik a kalcium aktiváló hatását az IP₃ receptorra.

A fenti mechanizmusban lényegesnek tartott szabályozó hatások számos kérdése még mindig nem tisztázott. Az egyik legfontosabb ilyen kérdés az IP₃ receptor inaktivációjának mechanizmusa (Taylor, 1998). Noha az eredeti megfigyeléseknek megfelelően igazolták a kalcium gátló hatását (Carter és Ogden, 1997), eltérő magyarázatok is léteznek a lassuló kalciumfelszabadulásra. Egyesek szerint az inaktiváció egy, a kalciumszinttől független időfüggő folyamat eredménye (Hajnóczky és Thomas, 1997; Ilyin és Parker, 1994), mások pedig deszenzitizációval magyarázzák a csatornazáródást (Oancea és Meyer, 1996). A különböző feltételezések tehát elsősorban a citoplazmatikus kalciumnak tulajdonított hatásuk alapján különböznek.

4.4. Kalciumoszillációk szerepe

Felfedezésük óta kérdéses, hogy az intracelluláris kalciumoszillációknak van-e igazi élettani szerepe, és ha igen, akkor a sejtek miért és hogyan alkalmazzák ezt a periódikus jelet.

A számos sejtben, sokféle körülmény között megfigyelt oszcillációk alapján úgy tűnik, ez a jelenség valóban része a sejt kalciumhoz kötődő jelátvitelének. Jellemző például, hogy az oszcillációk köztes, szubmaximális kémiai ingerek esetében jelentkeznek, míg állandósult kalciumválasz általában csak szupramaximális ingerekre figyelhető meg, ahol a sejt már nem érzékeli a ingererősség változását. Ezért úgy tűnik, legalábbis néhány sejtben intracelluláris kalciumoszillációk kódolják a fizioiógias, nagyon alacsony agonistaszintek által hordozott információt.

Az első közlemények, amelyek kimutatták, hogy egyes sejt-folyamatok – a mitochondrium anyagcsereje és az egyik legáltalánosabb kalcium-szenzor, a Ca²⁺/kalmodulin-függő kináz II. (CaM kináz II) működése – nem a

kalciumszint abszolút értékétől, hanem annak változási gyorsaságától függenek, az 1990-es évek közepén jelentek meg (Hanson és mtsai., 1994; Hajnóczky és mtsai., 1995). A mitochondrium átlagos NAD(H) koncentrációja például változó frekvenciával ismétlődő citoplazmatikus kalciumtranziensekkel hangolható volt, míg egyszeri kalciumcsúcsok vagy az állandósult magas citoplazmatikus kalciumszint mindössze átmeneti NAD(H) koncentráció-változást eredményezett (Hajnóczky és mtsai., 1995).

Az elmúlt években újabb kísérleti eredmények igazolták, hogy a kalciumoszillációk frekvenciája számos életfolyamatot szabályozó információt hordoz. Így például átlagos enzimaktivitás (De Koninck és Schulman, 1998), csilló mozgás (Evans és Sanderson, 1999b) vagy gén expresszió esetében (Li és mtsai., 1998) mutattak ki függést az ismétlődő kalciumtranziensek gyakoriságától. A CaM kináz II esetében ez a “memória” az oligomer enzim autofoszforilációjával magyarázható (De Koninck és Schulman, 1998). Transzkripció aktiválásakor pedig érdekes módon a kalciumtranziensek frekvenciája nem pusztán az átírás mértékét szabta meg, hanem annak specificitását is. Ezt feltételezhetően a különböző transzkripciós faktorok eltérő aktiválódási és inaktiválódási kinetikája okozza (Dolmetsch és mtsai., 1998). A már ismert folyamatokon kívül más esetekben is elképzelhető, hogy a kalciumoszillációk kinetikája hordozza a sejt számára az információt (Gall és mtsai., 2000).

A kalcium jelátvitel kutatásának újabb eredményei alapján azonban még érdekesebb perspektíva nyílt meg. Mint láttuk, kezdetben a sejtpopulációkon kimutatható, állandósult kalciumszint-emelkedést tartották élettanilag fontos válasznak, a kísérleti módszerek fejlődésével azonban kiderült, hogy a sejt átlagos kalciumszintjének periódikus változása is szerepet játszhat a jelátvitelben. Nem szükséges hozzá nagy vakmerőség, hogy feltételezzük, a legújabb technikákkal is éppen csak detektálható elemi kalciumjelek (Berridge, 1997), azaz korlátolt térbeli és időbeli kiterjedésű “kalciumfelhők”, anélkül is betölthetnek jelátvivő szerepet, hogy a sejtben globális kalciumválasz keletkezne. Néhány kísérleti adat éppen ezt valószínűsíti (Porter és mtsai., 1998; Gordienko és mtsai., 1999; Lau és mtsai., 1999).

5. Kérdésfelvetés

5.1. Intercelluláris kalciumhullámok légúti epitelsejtekben

Összefüggő légúti epitelsejtekben mechanikai inger hatására érdekes jelenség játszódik le: az ingerelt sejtben, majd koncentrikusan az azt körülvevő sejtekben hullámszerűen megemelkedik a kalciumszint (Boitano és mtsai., 1992). Ezt a jelenséget *intercelluláris kalciumhullámnak* nevezik. Bár jelentős szerepe lehet a légúti epitélia működésében, molekuláris háttere még nem teljesen felderített.

A hullám terjedésében az egyik feltételezés szerint az ingerelt sejtben képződő IP_3 vesz részt. Úgy gondolják, hogy ez a molekula réskapcsolatokon (ang.: gap junction) keresztül a szomszéd sejtekbe jut, s így kelt terjedő kalciumválaszt (Boitano és mtsai., 1992). A másik feltételezett mechanizmus szerint az ingerelt sejt hírvivő anyagokat juttat a külső térbe, amelyek a szomszédos sejteket parakrin módon kémiaiilag aktiválják és így okoznak kalciumszint-emelkedést (Osipchuk és Cahalan, 1992). Ilyen hatású anyagok lehetnek a különböző nukleozidszármazékok (ATP, UTP, UDP), amelyek mechanikai inger hatására számos esetben megjelennek az extracelluláris térben (Enomoto és mtsai., 1994).

Mivel különböző technikai nehézségek miatt a két modell közti különbségtétel igen nehéz, a nukleotid-indukált jelátvitel jellemzése epitelsejtekben hozzájárulhat a kalciumjel terjedésének felderítéséhez. A receptoraktivációhoz kötődő jelátvitel szelektív gátlása módot adhat a két mechanizmus elkülönítésére.

Légúti epitelsejtek nukleotid-aktivált jelátviteli útjáról kiderült, hogy az elsősorban a foszfolipáz C-n keresztül hat, és hogy a kalcium főként IP_3 receptorokon át szabadul fel (Hansen és mtsai., 1995; Sienaert és mtsai., 1998). Ezeken kívül azonban még nem minden részlet felderített. Így nem egyértelműen tisztázott a különböző transzporterekkel rendelkező kalciumraktárak szerepe a kalciumtranziensekben (Boitano és mtsai., 1992;

Kim és mtsai., 1997), akár csak a protein kináz C (Woodruff és mtsai., 1999), vagy az IP₃ receptor szabályozásának a szerepe a kalciumválaszban (Sienaert és mtsai., 1998).

5.2. A SERCA aktivitásának hatása a kalciumoszillációk frekvenciájára

A kalcium jelzőrendszer összehangolt szabályozási folyamatai a szupramolekuláris elrendeződés megbontásakor könnyen károsodhatnak. Működésükről így a jelenlegi ismereteink mellett korlátozott az izolált molekulákon végzett kísérletekkel megszerezhető információ, ezért az intracelluláris kalciumoszillációk vizsgálata is elsősorban élő sejteken folyik. Ez leggyakrabban kvalitatívan történik: a kalcium szintjét befolyásoló valamely paraméter megváltoztatásának a hatását tanulmányozzák az oszcillációk stabilitására. Ilyen vizsgálatok azonban csak közvetett információkkal szolgálhatnak a jelenség alapjául szolgáló folyamatokról, s gyakran csupán az élettani körülmények között tapasztaltaktól jelentősen eltérő mértékű vagy kinetikájú beavatkozások hatását tükrözik.

A sejtben lejátszódó reakcióhálózatok mechanizmusát tehát élő sejtekben, lehetőség szerint számszerűsíthető módon célszerű tanulmányozni. Az oszcillációk tulajdonságainak viszonylag ritka kvantitatív vizsgálatára példa az endoplazmatikus retikulum kalciumpumpájának hatása az oszcilláció frekvenciájára. Több kutatócsoport végzett olyan kísérletet, amelyben a SERCA aktivitást olyan mértékben módosították, amely továbbra is lehetővé tette az oszcillációkat, majd ebben a megváltozott rendszerben vizsgálták meg a kialakult oszcillációk periódusidejét. A megfigyelések azonban ellentmondásra vezettek.

Camacho és Lechleiter az egyik leginkább vizsgált sejttypusban, *Xenopus laevis* oocitákban a SERCA1 fehérjét (a már eredetileg jelen levő SERCA2b mellett) tranziensen expresszáva a periódusidő jelentős csökkenését figyelte meg (Camacho és Lechleiter, 1993).

Petersen és munkatársai pankreász acinus sejtekben a SERCA gátlószerének, thapsigarginnak a hatására tapasztaltak periódusidő-

csökkenést (Petersen és mtsai., 1993). Endotélsejtekben Morgan és Jacob egy másik SERCA gátlószer, a ciklopiazonsav (CPA) hatására tett hasonló megfigyelést (Morgan és Jacob, 1998).

Rossi és Kao viszont fibroblasztokban a SERCA gátlásával kismértékű periódusidő-növekedést tapasztalt (Rossi és Kao, 1997).

Az ellentmondó kísérleti adatoknak máig nincs érvényes magyarázata. Korábban a *Xenopus* oocitákban expresszált idegen fehérje eltérő kinetikai tulajdonságával magyarázták az eltérést (Jafri és Keizer, 1995), azonban ezt újabb kísérletek megcáfolták (Camacho és Lechleiter, 1995; Lechleiter és mtsai., 1998).

A SERCA hatásának felderítése az ellentmondás feloldása mellett azért is érdekes, mert ez a molekula mai tudásunk szerint sokkal egyszerűbben szabályozott, mint például az IP₃ receptora vagy az extracelluláris kalcium beáramlását szabályozó rendszer. A SERCA aktivitásának módosításával elért eredmények ezért könnyebben értelmezhető eredményeket szolgáltathatnak az oszcillációk mechanizmusáról, s a SERCA frekvenciára kifejtett hatásán keresztül remélhetőleg jobban sikerül felfedni a periódusidőt meghatározó folyamatokat.

5.3. Célkitűzés

Munkám során a kémiai inger kiváltotta kalciumfelszabadulás szabályozásáról és az intracelluláris kalciumoszcillációk mechanizmusáról szerettem volna újabb részleteket kideríteni. Első lépésben jellemezni kívántam a HEp-2 humán légúti epitél sejtvonalban fellépő kalciumfelszabadulás molekuláris hátterét, majd már jellemzett humán sejtvonalakon kísérletek és matematikai modellezés alkalmazásával a SERCA aktivitásának a kalciumoszcillációk frekvenciájára kifejtett hatását próbáltam megmagyarázni.

6. Vizsgálati módszerek

6.1. A módszerekről

Az intracelluláris kalciumoszillációk molekuláris részletei tisztázásának egyik legcélravezetőbb módja a kísérleti eredmények összehasonlítása az oszcillációk leírására felállított modellek predikcióival. Feltételezhetően az a modell írja le legjobban az oszcillációkat, amelyik a sejtekben megfigyelt viselkedést a leghűbben előrejelzi. A továbbiakban ennek a modellnek a finomítása, újabb kísérleti adatokhoz idomítása vezethet a jelenség pontosabb leírásához.

Megfigyeléseket egyrészt általunk elvégzett kísérletekkel, másrészt a szakirodalomban megjelent megfigyelések kritikus feldolgozásával gyűjtöttünk. A kísérleteket HEP-2 és HeLa humán epitél sejtvonalakon végeztük. Szakmai körökben általánosan elfogadott, hogy az eltérő sejtek kémiai ingerlésére vagy annak mimikálására aktiválódó jelátviteli folyamatok tulajdonságai más sejt típusokra is általánosíthatók. Számunkra tehát nem az azonos kémiai inger volt feltétele annak, hogy a különböző sejtek válaszait összevethessük, hanem az azonosnak tekinthető jelátviteli mechanizmus léte.

A HEP-2 sejtek gége eredetű humán karcinóma sejtek. Ezen, a primer kultúránál homogénebb és reprodukálhatóbban viselkedő sejt populáción, mint a légúti epitélia modelljén kívántuk vizsgálni az extracelluláris nukleotidok hatását a citoplazmatikus kalciumszintre. A HeLa sejtek méhnyakrák eredetű humán karcinóma sejtek, amelyeket azért választottunk a SERCA hatásának vizsgálatára, mert az IP_3 -keltette és kalcium-szabályozta kalcium-felszabadulás mechanizmusa bennük az egyik legalaposabban tisztázott (Bootman és mtsai., 1997; Barrero és mtsai., 1997), s mert kísérleteinkhez mások megfigyeléseit is közvetlenül fel tudtuk használni.

Nem vizsgáltuk a sejtvonalakban a kalcium szerepét, és azt sem, hogy a

kalcium jelzőrendszer ezekben a transzformált sejtekben normálisan működik-e. Ez utóbbi tekintetben számos kutatócsoporthoz hasonlóan feltételeztük, hogy eredményeink egészséges sejtekre is kiterjeszthetők.

A kísérletekkel nyert eredményeket a javasolt biokémiai reakciókat leíró modellek predikcióival vetettük össze. Egyszerűbb reakciók lefutása általános esetben kvalitatív gondolatmenettel, logikai úton kikövetkeztethető. Oszcillációk esetében azonban a bonyolult kinetikájú visszacsatolások kölcsönhatása nehezen megjósolható eredményhez vezet, ezért az ilyen folyamatokat kvantitatív modellek matematikai elemzésével a legcélszerűbb vizsgálni. Ez is az oka lehet annak, hogy például oszcilláló intracelluláris kalciumválaszok leírására sokkal több matematikai modell született, mint egyszeri tranziensek leírására (Wiesner és mtsai., 1996).

A sejtben lejátszódó biokémiai reakciókat leggyakrabban determinisztikus, folytonos, autonóm differenciálegyenletekkel írják le. Ez azt jelenti, hogy az egyes komponensek koncentrációját (vagy mennyiségét) egy olyan folytonos függvénnyel közelítik, amelynek a megváltozása minden időpillanatban egyértelmű módon csak az egyes változóktól és a különböző paramétereiktől függ. Ennek az egyenletnek – vagy több komponens esetén az egyenletekből álló egyenletrendszernek – a megoldása végül megadja a keresett függvényeket: az egyes komponensek koncentrációinak időbeli és akár térbeli alakulását.

Az ilyen jellegű matematikai modellezés hátránya, hogy csak viszonylag kis számú változó vizsgálható, és kevés paraméter hatása vehető figyelembe, ezért használatukhoz a valóság nagymértékű leegyszerűsítése szükséges. Az egyenlet megoldása továbbá gyakran nemcsak a modell feltételezéseitől (azaz a komponensek változását leíró egyenletek alakjától), hanem paramétereitől is függ. Mivel a legtöbb egyenlet biokémiai ismeretek hiányában tartalmaz többé-kevésbé önkényesen megválasztott állandókat, ezek befolyásolhatják a végeredményt. Másrészt a differenciálegyenletek megoldása csak az adott modellre érvényes, a biokémiai ismeretek bővülése folyamatosan új modellek felállítását és megoldását teszi szükségessé. Ezen kívül kétséges a folytonos és determinisztikus egyenletek érvényessége akkor, amikor a komponensek

anyagmennyisége olyan csekély, hogy az már nem tekinthető végtelenül apró lépésekben szinte folytonosan változó sokaságnak. Végül nem elhanyagolható technikai probléma, hogy a bonyolult biokémiai folyamatok, így a számos nemlineáris tagot tartalmazó oszcillációs modellek megoldása általában nem adható meg analitikus alakban, azaz hagyományos függvények vagy függvénysorok formájában, ezért azt szinte kivétel nélkül közelítő módszerek segítségével, numerikusan kell meghatározni.

6.2. Fluoreszcens kalciumszint-meghatározás humán karcinóma sejtekben

6.2.1. Sejttenyésztés

A sejteket tripszines szélesztés után standard laboratóriumi körülmények között 20-28 órán keresztül műanyag Petri csészékben tenyésztettük 10 % fetális borjúsavóval, 50 U/ml penicillinnel és 50 µg/ml streptomocinnel kiegészített RPMI 1640 médiumban. A 35 mm átmérőjű Petri csészékben 10^5 sejtet tenyésztettünk.

6.2.2. Fluoreszcens jelölés és mérés

Az intracelluláris kalciumszint változását fluo-3 kalciumindikátorral követtük. Ez a jelölő Ca^{2+} kötésére megváltoztatja a szerkezetét és így megváltozik fluoreszcencia intenzitása (Minta és mtsai., 1989). Az intracelluláris kalciumszint tehát a jelölt sejtek citoplazmájának fluoreszcencia intenzitásának mérésével követhető. Ehhez a sejteket az indikátor acetoxi-metilészter (AM) származékával inkubáltuk. Ez a lipofil és alig fluoreszkáló forma beoldódik a sejthártyába, majd onnan kismértékben a citoplazmába. Az itt jelen levő észterázok azonban elhasítják az észterkötéseket, ezáltal a citoplazmában lassan felgyűlik a fluoreszkáló és hidrofil, tehát a sejtben maradó termék. A fluo-3 az ultraibolya fényvel gerjeszhető indikátorokkal szemben kalcium hatására nem mutat színképződést, ezért a mérést viszonyítási alap nélkül, egy hullámhossz-

tartományban kellett elvégeznünk. Az intenzitás viszont nem csak a kalciumkoncentrációtól, hanem a jelölő koncentrációjától, a minta rétegvastagságától és elnyelésétől, a megvilágítás intenzitásától, az optika áteresztőképességétől és a detektálási hatékonyságtól is függ (Takahashi és mtsai., 1999). Mivel számunkra elegendő volt a kalciumszint változásának követése, az amúgy igen nagy bizonytalansággal járó *in situ* kalibráció helyett (Harkins és mtsai., 1993) egy közelítő módszert használtunk (Cheng és mtsai., 1993): feltételeztük, hogy az indikátor fluoreszcenciája és a kalciumkoncentráció között ugyanaz az összefüggés érvényes a nyugvó és az ingerelt sejtben is. Ha ismerjük a kalciumszintet a nyugvó sejtben, akkor az ingerlést követő (F) és azt megelőző fluoreszcencia intenzitás (F_0) hányadosa jellemzi a kalciumszintet. Bár ebből a paraméterből a szabad kalciumion-koncentráció is becsülhető, számunkra elegendő volt az adatok F/F_0 hányadosként való kifejezése. A nyugvó kalciumszintnek megfelelő fluoreszcencia értéket (F_0) a kísérletek kezdeti lefutásából extrapolációval becsültük. HeLa sejtekben F_0 értékében általában nem tapasztaltunk jelentős változást, ezért állandónak tekintettük, HEp-2 sejtekben viszont lassú csökkenést figyeltünk meg, ezért F_0 alakulását monoexponenciális lecsengéssel közelítettük.

A jelölés előtt a tenyésztőmédiumot a következő összetételű oldatra cseréltük (összetétel mM-ban): NaCl 145; KCl 5; Na₂HPO₄ 1; MgSO₄ 0,5; CaCl₂ 1; glükóz 5; HEPES 10 (pH=7,2). A további lépéseket, amennyiben az eltérést nem jelzem, ebben a szintetikus oldatban végeztük. Kétszeri mosást követően a sejteket fluo-3/AM fluoreszcens kalciumindikátor 3 μM-os oldatában – ami 0,1 % (m/V) Pluronic F-127 nemionos detergenst is tartalmazott – sötétben inkubáltuk 30 percig. Az inkubálás után a sejteket kétszer mostuk, s végül 3 ml oldatban mértük. A mérés során a reagenseket pipettával adtuk a médiumhoz, majd az oldatot egy másik pipettával felkevertük. Az előkészítést és a kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük.

A mérést Bio-Rad MRC 1024ES lézer pásztázó konfokális feltétellel (Bio-Rad, Hertfordshire, Nagy-Britannia) ellátott Nikon TE 300 invertált mikroszkópon végeztük. A mintát 20× nagyítású Plan Fluor objektíven keresztül argon-ion

lézer 488 nm hullámhosszú fényével gerjesztettük, a fluoreszcenciát pedig 515 nm felett (OG515 szűrő) detektáltuk. Az általában 1-2 Hz gyakorisággal felvett digitális képen kijelölt, egyes sejteket tartalmazó területekről az átlagos fluoreszcencia intenzitást Time Course szoftverrel (Bio-Rad, Hertfordshire, Nagy-Britannia) határoztuk meg.

Kalciumtranziensek nagy időfelbontású egy dimenziós vizsgálatát vonalpásztázással (ang.: linescan) végeztük el. Ekkor a minta egyetlen voxelsorát pásztáztuk le 500 Hz frekvenciával, a képen pedig az egymás után felvett pontsorokat egymás alá helyezve jelenítettük meg a kalciumszint-változást. Ekkor tehát a képen a vízszintes pozíció a helyet, a függőleges az időpontot jelöli ki.

6.3. Kalciumoszillációk numerikus szimulációja

A SERCA aktivitás és a frekvencia összefüggését öt matematikai modellben vizsgáltuk meg numerikus számítással (Goldbeter és mtsai., 1990; Meyer és Stryer, 1991; De Young és Keizer, 1992; Atri és mtsai., 1993; Li és mtsai., 1994). Az egyenletek közelítő megoldását MATLAB matematikai szoftvercsomag beépített algoritmusával számoltuk ki. A relatív hiba tolerancia 10^{-6} volt. Számításainkhoz a modellek eredeti paramétereit használtuk, de ellenőrzésül számításokat végeztünk $\pm 15\text{-}20\%$ -kal megváltoztatott paraméterekkel is. Ezek a számítások az eredetihez hasonló eredményekkel jártak.

A De Young-Keizer modell esetében a leegyszerűsített háromváltozós formát használtuk, a c_2 paramétert $0,25 \mu\text{Ms}^{-1}$ -nek vettük (Keizer és De Young, 1994).

7. Eredmények

7.1. Extracelluláris nukleotidok-kiváltotta kalciumjelek HEp-2 sejtekben

Extracelluláris nukleotidok fluoreszcens indikátorral jelölt HEp-2 sejtekben kalciumtranzienseket váltottak ki. ATP, UTP és UDP néhány tized $\mu\text{mol/l}$ koncentráció felett, ADP pedig ennél három nagyságrenddel magasabb koncentrációban okozott kalciumválaszt. Az 1. táblázat a válaszoló sejtek arányát tünteti fel különböző nukleotid koncentrációk esetén.

Mivel a nukleotidok hozzáadását a Petri csésze tartalmának felkeverése követte, ellenőriznünk kellett, hogy nem az ezzel együttjáró mechanikai igénybevétel ingerelte a sejteket. A Petri csésze tartalmának a felkeverése önmagában azonban nem eredményezett detektálható kalciumszint-változást a sejtekben. Emellett igazolnunk kellett, hogy a kalciumválaszt az általunk alkalmazott nukleotid, és nem annak valamilyen bomlásterméke okozza. Ehhez az 1-100 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjú ATP-vel ingerelt sejtekhez – 5 mmol/l glükózt tartalmazó médiumban – 10 U/ml koncentrációban hexokinázt adtunk, ami a kalciumválasz gyors megszűnését okozta.

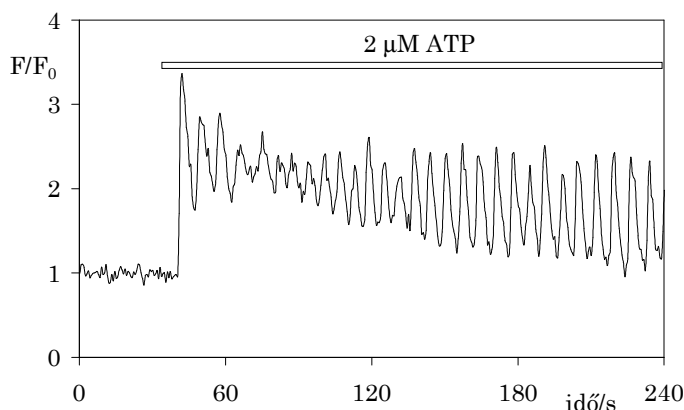
nukleotid	0.5 μM	2 μM	5 μM	20 μM	100 μM
ATP	46 % (n=59)	83 % (n=230)	95 % (n=136)	94 % (n=164)	95 % (n=131)
UTP	61 % (n=135)	73 % (n=95)	91 % (n=111)	88 % (n=113)	89 % (n=94)

1. táblázat

Az adott nukleotidkoncentrációra kalciumválaszt adó HEp-2 sejtek aránya az összes sejthez viszonyítva (zárójelben)

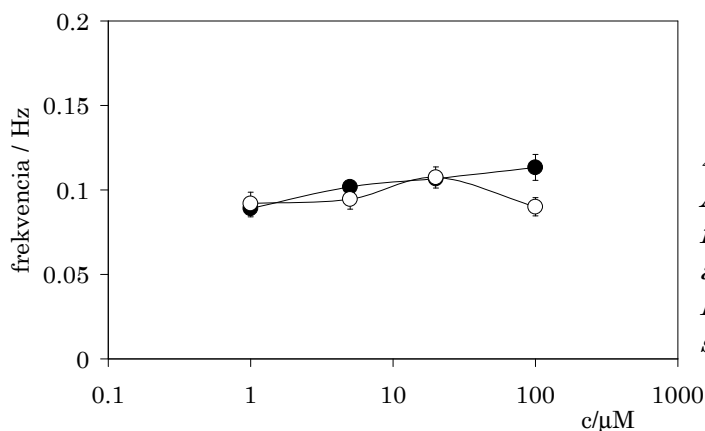
A kalciumtranziensek időbeli lefutása az egyes sejtekben nagymértékben különbözött. Az eltérő választ adó sejtek közt nem észleltünk egyértelmű morfológiai különbséget, és a viselkedésben tapasztalt eltérések akkor is fennmaradtak, ha a sejteket előzőleg 24 órás szérummegvonással szinkronizáltuk (Whitfield és Youdale, 1965). Hasonló heterogenitást figyeltek meg ATP-vel ingerelt 16HBE14o- sejtvonalon is (Sienaert és mtsai., 1998).

Igen széles koncentrációtartományban – ATP esetében például 0,2-2000 μM között – a nukleotidokkal ingerelt sejtek többségében a kalciumszint periódikusan megemelkedett majd lecsökkent, kalciumoszillációk léptek fel



3. ábra
ATP-vel keltett
kalciumoszilláció HEp-2
sejtben

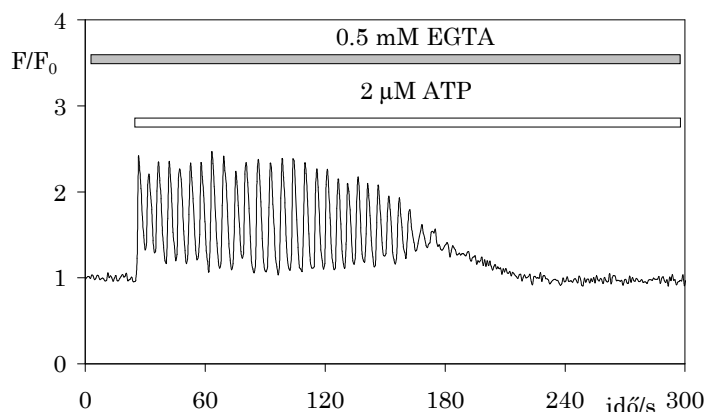
(3. ábra). Leggyakrabban szimmetrikus oszcillációkat figyeltünk meg, ahol a kalciumtranziens időtartama összemérhető volt az átlagosan 10-15 s körüli periódusidővel. Az oszcillációk periódusideje időben nem nagyon változott, az egyes sejtek között meglepően kis eltérést mutatott (1 μM ATP esetében például 4 mérés 34 sejtjében $12,1 \pm 0,5$ s volt az átlagos periódusidő \pm átlag szórása), és csak kis mértékben függött az alkalmazott nukleotid



4. ábra
Az oszcillációk
frekvenciájának függése
az ATP (●) illetve UTP (○)
koncentrációtól HEp-2
sejtben

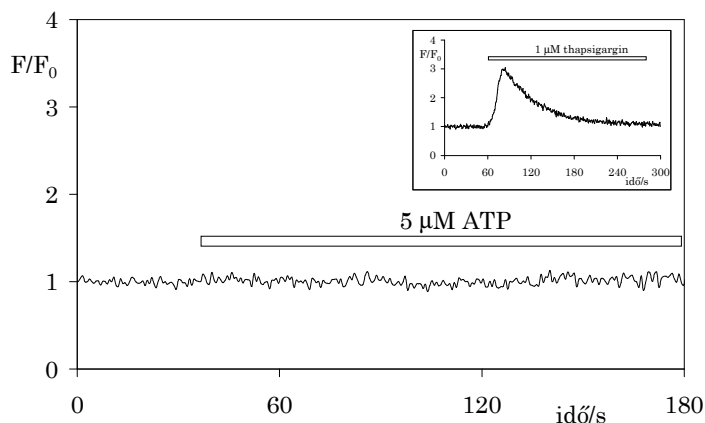
koncentrációtól. Bár az 1 és 100 μM ATP esetén számított átlagos frekvencia szignifikánsan eltért egymástól ($p < 0,1\%$), ez a függés jóval gyengébb (4. ábra), mint például a májsejtek esetében megfigyelt többszörös frekvenciaváltozás (Rooney és mtsai., 1989).

Következő kísérleteinkkel azt kívántuk tisztázni, hogy a sejtekben lezajló periódikus folyamatban mi a szerepe a különböző kalciumforrásoknak, így az extracelluláris térnek, illetve a sejt belső kalciumraktárainak. Oszcillációk



5. ábra
Kalciumoszilláció
kalciummentes, 0,5 mM
EGTA-t tartalmazó
közegben

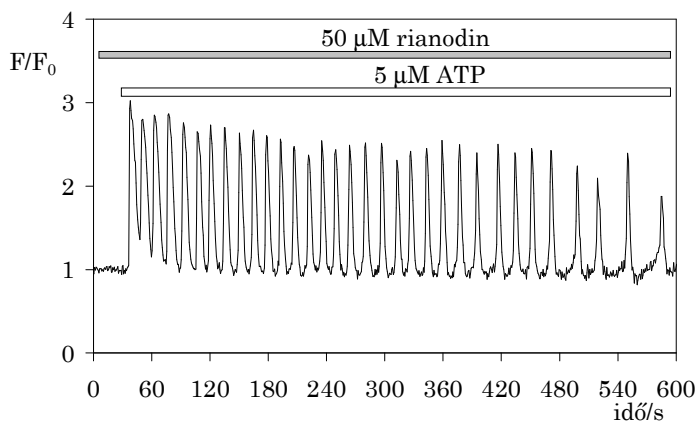
akkor is felléptek, amikor az extracelluláris médium kalcium nélkül készült és 0,5 mM EGTA-t tartalmazott, de később állandó frekvenciával és egyre csökkenő amplitúdóval elhaltak (5. ábra). Ezzel ellentétben olyan sejtekben, amelyeket előzőleg kalciummentes közegben 1 μM thapsigarginnal, a SERCA



6. ábra
1 μM thapsigargin hatása
extracelluláris kalcium
hiányában (betétábra),
majd az így előkezelt sejt
ingerlése ATP-vel
kalciumtartalmú
közegben

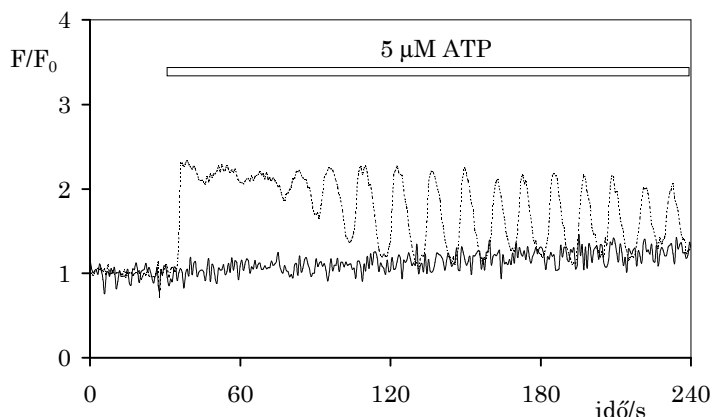
specifikus gátlószereivel kezeltünk, majd kalciumot tartalmazó közegbe helyeztünk, nukleotidok hatására még kismértékű tranziens választ sem tapasztaltunk (6. ábra). A nukleotidok által kiváltott jelet nem befolyásolta, ha a sejteket előzőleg 15 percig 50 μM rianodinnal inkubáltuk, ami ebben a

koncentrációban gátolja a szarkoplazmatikus retikulum kalciumcsatornáját (7. ábra). Ezzel ellentétben a foszfolipáz C feltételezett specifikus gátlószere,



7. ábra
Kalciumoszilláció 15
percig 50 μM rianodinnal
előkezelt sejtben

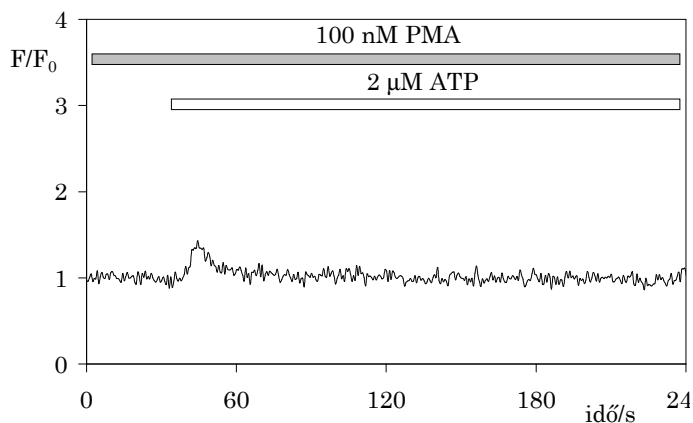
az U73122, 10 μM koncentrációban teljesen megakadályozta a kalciumjel kialakulását, míg a vegyület U73343 nevű inaktív szerkezeti analógja hatástalan volt (8. ábra).



8. ábra
ATP hatása 5 percig
10 μM U73122-vel (—)
vagy annak inaktív
analógjával, U73343-mal
(- -) előkezelt sejt
kalciumszintjére

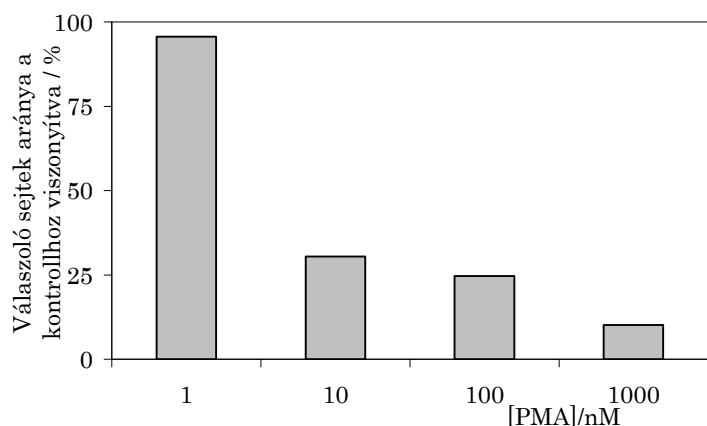
A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy milyen folyamatok szolgálhatnak az oszcillációkhoz elengedhetetlen visszacsatolásként. Szimmetrikus oszcillációk esetében az egyik feltételezett mechanizmus alapja a protein kináz C gátló hatása az IP_3 termelésére. Megvizsgáltuk egy protein kináz C-t aktiváló forbol észter, a 4 β -forbol 12-mirisztát 13-acetát (PMA) hatását a nukleotid-indukált kalciumválaszra. 10 perc előkezelés 100 nM PMA-val kioltotta a kalciumoszillációkat. Kezelés után egyes sejtekben kis amplitúdójú tranzienseket tapasztaltunk (9. ábra), a többiben pedig semmilyen válasz nem jelentkezett. A válaszoló sejtek aránya a PMA koncentrációjának növelésével csökkent (10. ábra). A protein kináz C egyik

feltételezett hatása a kalciumraktárak tartalmának csökkentése (Ribeiro és



9. ábra
ATP hatása 10 percig
100 nM PMA forbol
észterrel előkezelt sejtre

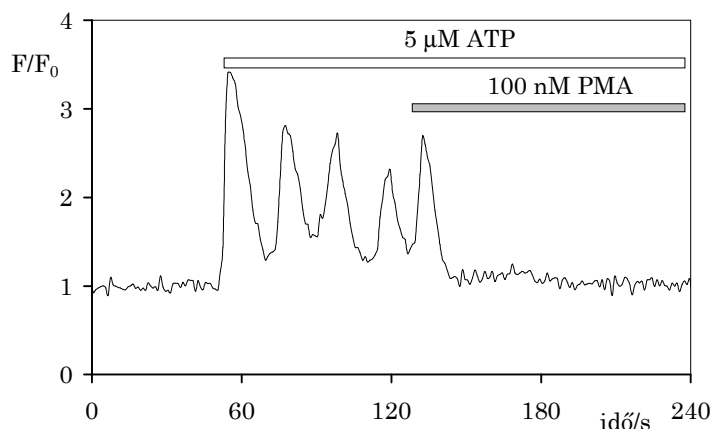
Putney, 1996), ezért megvizsgáltuk, lehetséges-e, hogy a mi esetünkben is ez a gátlás mechanizmusa. PMA hozzáadása oszcilláló sejtekhez sokkal



10. ábra
A kalciumválaszt adó
sejtek aránya a
kontroll sejtekhez
viszonyítva a PMA
koncentráció
függvényében

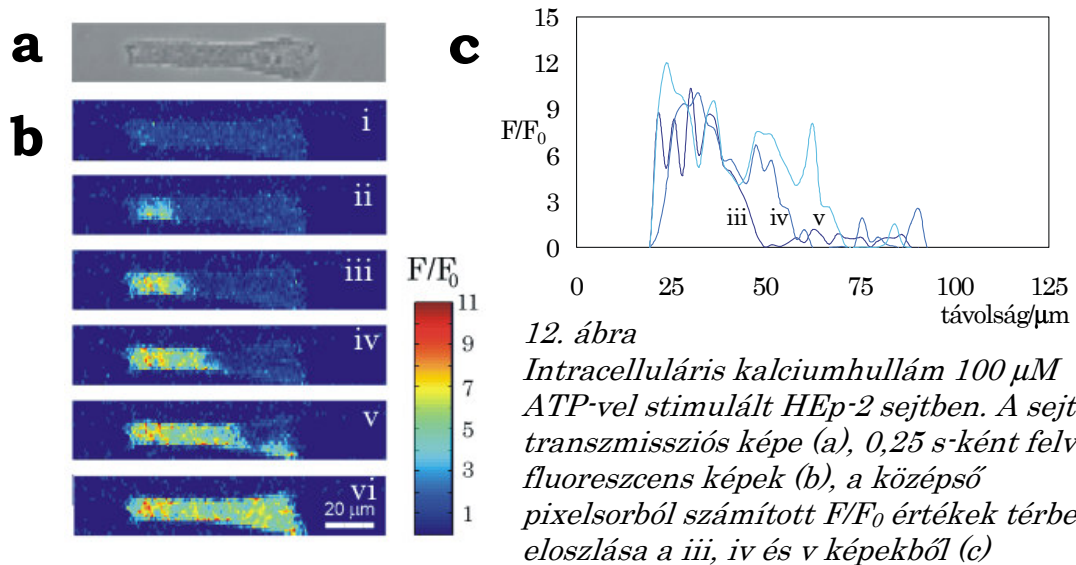
gyorsabban (egy-két perióduson belül) kioltotta az oszcillációkat (11. ábra), mint ahogy a kalciumraktárak kimerülése érzékelhető volt (5. ábra).

Szinuszos kalciumoszcillációk esetében tisztázatlan kérdés a pozitív



11. ábra
100 nM PMA hatása
ATP-vel kiváltott
oszcillációra

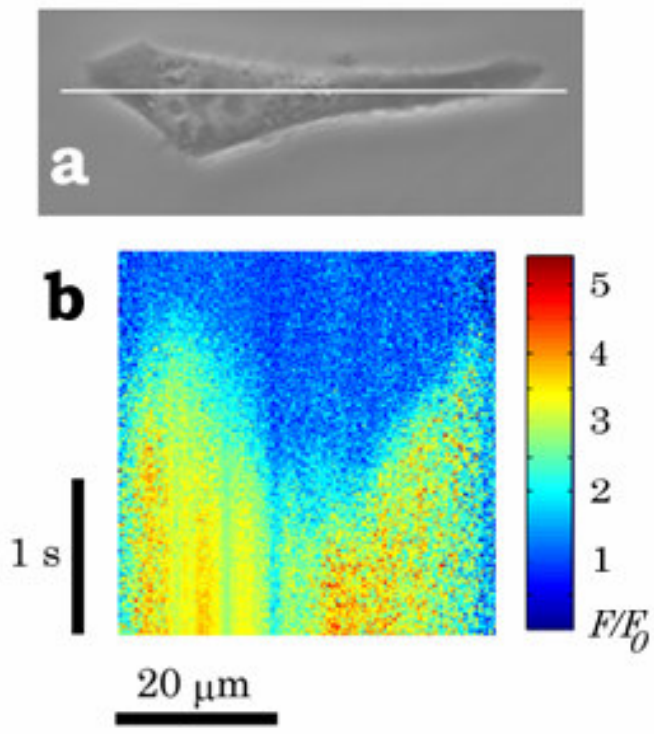
visszacsatolás mibenléte. A protein kináz C szerepén alapuló modellben ezt a hatást a sejthártyán lezajló folyamatoknak tulajdonítják (Cuthbertson és



*12. ábra
Intracelluláris kalciumhullám 100 μM
ATP-vel stimulált HEp-2 sejtben. A sejt
transzmissziós képe (a), 0,25 s-ként felvett
fluoreszcens képek (b), a középső
pixelsorból számított F/F_0 értékek térbeli
eloszlása a iii, iv és v képekből (c)*

Chay, 1991; Thomas és mtsai., 1996), ám eközben nem kellően felderített a kalciumfelszabadulás lokális szabályozásának a szerepe. A kalciumválasz sejtben belüli dinamikájának tanulmányozására ezért nagyobb térbeli és időbeli felbontással is végeztünk méréseket. Megállapítottuk, hogy a kalciumszint-emelkedés a sejtek többségében nem egyszerre játszódott le, hanem éles reakciófrontként, intracelluláris kalciumhullámként terjedt végig a sejtben (12. ábra), s ezt később lassabb, homogén koncentrációcsökkenés követte.

A kalciumhullámok egy sejtben belül több pontból is kiindulhattak, és a hullám lefutásának iránya ismétlődő tranziensek esetében sem változott. A hullám időben állandó, 25-35 μm/s körüli sebességgel (13. ábra) és állandó profillal (12.c ábra) haladt végig a sejteken.

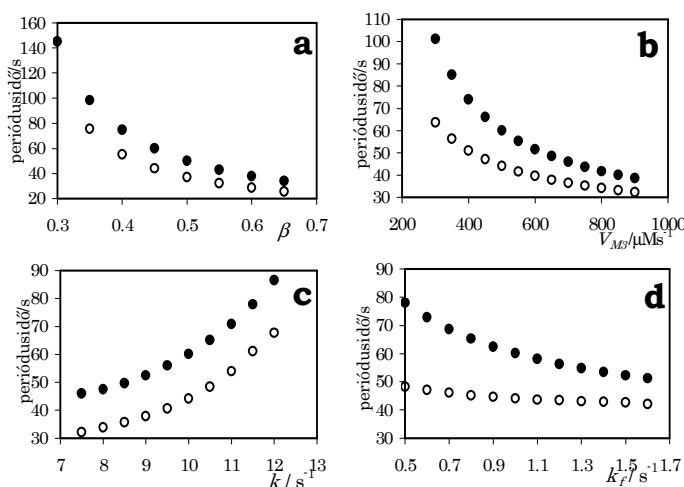


13. ábra
 100 μM ATP-vel stimulált
 sejtről vonalpásztázással
 készült felvétel. A sejt
 transzmissziós képe (a), és
 egy pixelsorának (az a, ábrán
 fehér vonallal jelölve)
 különböző időpontokban mért
 képei egymás alatt ábrázolva
 (b)

7.2. Az endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz aktivitásának hatása az oszcillációk frekvenciájára

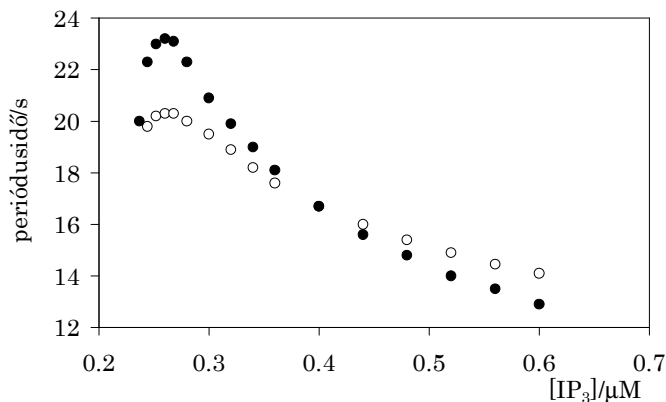
A SERCA aktivitás változtatása a szakirodalom alapján ellentmondásos hatást fejt ki a kalciumoszcillációk frekvenciájára. Mi abból a feltételezésből indultunk ki, hogy az eltérő választ adó sejtípusok legalább egy részében ugyanaz vagy nagyon hasonló mechanizmus okozza az oszcillációkat, a kísérletekben megfigyelt ellentétes hatást pedig az okozta, hogy valamely, a frekvenciát meghatározó paraméter a különböző esetekben eltérő volt. Olyan modellt kerestünk tehát, amelyben a SERCA aktivitás változtatásának a periódusidőre kifejtett hatása függ a modell egy másik paraméterétől.

Első lépésben az oszcillációkat leíró legfontosabb matematikai modellekben numerikusan vizsgáltuk meg, hogy a SERCA V_{max} értéknek változtatása milyen hatással bír a periódusidőre. A számolások során olyan tényezők hatását vizsgáltuk meg, amelyek hasonló molekulákat expresszáló, de egyéb szempontból különböző sejtek közt változhatnak. Ilyenek például az egyes membránokon lejátszódó transzportfolyamatok sebességi állandói, az extracelluláris kalciumbeáramlás mértéke vagy a kémiai inger erőssége, míg az egyes molekulák kinetikai jellegét vagy affinitását változatlanak tekintettük.



14. ábra
A Goldbeter-Dupont-Berridge modellel kiszámított oszcillációk periódusidejének függése a kémiai inger erősségétől (a), az IP_3 -független kalciumfelszabadulás maximális sebességétől (b), a plazmamembránon keresztüli kipumpálás (c) illetve az endoplazmatikus retikulumból történő szivárgás sebességi állandójától (d) $80 \mu\text{M s}^{-1}$ (●) és $50 \mu\text{M s}^{-1}$ (○) SERCA aktivitás esetén

Négy modell, Goldbeter és munkatársai (Goldbeter és mtsai., 1990), Meyer és Stryer (Meyer és Stryer, 1991), Atri és munkatársai (Atri és mtsai., 1993) és Li és munkatársai modellje (Li és mtsai., 1994) ugyanazt a viselkedést jósolta: ezek szerint a pumpa részleges gátlása bármilyen körülmények között a periódusidő csökkenését okozza. Jellegzetes példaként a Goldbeter és munkatársai modelljével nyert eredmények láthatók (14. ábra). Ezzel



15. ábra
A háromváltozós De Young-Keizer modellel kiszámított oszcillációk periódusidejének függése az IP_3 koncentrációtól $0,85 \mu Ms^{-1}$ (●) és $0,55 \mu Ms^{-1}$ (○) SERCA aktivitásnál

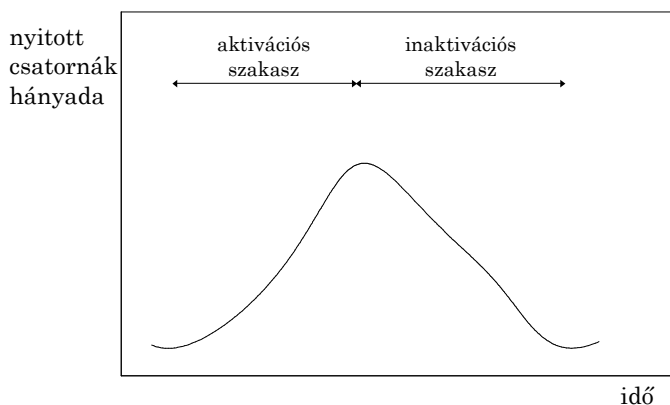
szemben a De Young-Keizer modell különleges viselkedést mutatott: a SERCA aktivitás megváltoztatásának hatása a frekvenciára függött a modell legfontosabb paraméterétől, az IP_3 -szinttől (15. ábra). A SERCA aktivitás csökkentése alacsony IP_3 koncentrációnál frekvencianövekedést, magas IP_3 szintnél frekvenciacsökkenést okozott (2. táblázat). A modell egyéb paraméterei nem voltak ilyen hatással a frekvenciaváltozásra.

$V_{max}/\mu Ms^{-1}$	$[IP_3]/\mu M$									
	0,26	0,28	0,32	0,36	0,40	0,44	0,48	0,52	0,56	0,60
0,40	20,4 s	20,3 s	19,5 s	18,8 s	18,1 s	17,4 s	17,0 s	-	-	-
0,55	20,3 s	20,0 s	18,9 s	17,6 s	16,7 s	16,0 s	15,4 s	14,9 s	14,5 s	14,1 s
0,70	21,5 s	21,3 s	19,0 s	17,9 s	16,6 s	15,6 s	14,9 s	14,3 s	13,8 s	13,4 s
0,85	23,2 s	22,3 s	19,9 s	18,1 s	16,7 s	15,6 s	14,8 s	14,0 s	13,5 s	12,9 s
1,00	25,0 s	23,5 s	20,6 s	18,5 s	16,9 s	15,7 s	14,7 s	14,0 s	13,4 s	12,8 s

2. táblázat

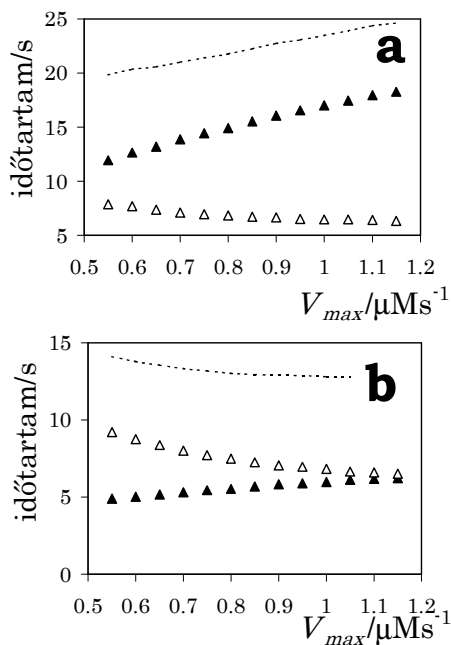
A háromváltozós De Young-Keizer modellel számított kalciumoszcillációk periódusideje az IP_3 koncentráció függvényében különböző SERCA aktivitás értékeknél. - : nem alakult ki stabil oszcilláció

A továbbiakban megpróbáltuk kideríteni, mivel magyarázható De Young és Keizer modelljének rendkívüli viselkedése. A modell az IP₃ receptor Ca²⁺- általi periódikus aktiválódásán és inaktiválódásán alapul, változó a citoplazma kalciumszintje, az aktivált és az aktiválható receptorok hányada.



16. ábra
A numerikusan számolt oszcillációs ciklus felosztása aktivációs és inaktivációs szakaszra

Megvizsgáltuk, hogy a SERCA aktivitás, ami közvetlenül a citoplazma kalciumszintjének alakulását befolyásolja, milyen hatással van a felszabadulás kalciumfüggő folyamatainak – csatornaaktiváció és



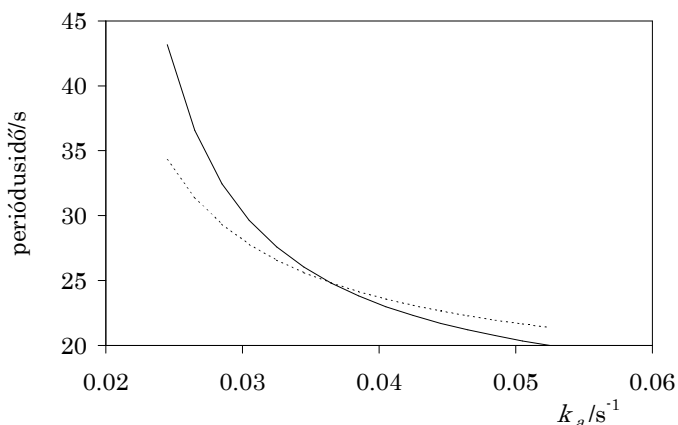
17. ábra
A De Young-Keizer modellel számított oszcilláció aktivációs (▲) és inaktivációs szakasz (Δ) időtartamának, és a periódusidőnek (- -) a függése a SERCA aktivitástól 0,28 μM (a) és 0,6 μM IP₃ koncentráció esetén (b)

-inaktiváció – időtartamára. Ehhez a numerikusan kiszámított oszcillációs ciklust két szakaszra osztottuk (16. ábra). Azt a szakaszt, amely során a

nyitott csatornák hányada növekedett, s így összességében több csatorna nyílt ki, mint ahány bezárult, aktivációs szakasznak, azt pedig, amely során hányaduk csökkent, inaktivációs szakasznak neveztük el. A SERCA aktivitás csökkentése mind alacsony, mind magas IP_3 -szintnél csökkentette az aktivációs, és növelte az inaktivációs szakasz időtartamát (17. ábra). Érdekes módon azonban a két folyamat súlya a periódusidőn belül függött az IP_3 szintjétől.

A SERCA aktivitás IP_3 -szinttől függő hatása eszerint tehát azzal magyarázható, hogy a stimulus függvényében más folyamatok szabják meg az oszcilláció periódusidejét, s a SERCA ezen folyamatok időtartamát ellentétesen befolyásolja.

Ellenőrzésül számításokat végeztünk egy, a fenti modelltől származtatott, a periódusidőt analitikusan becsülő reakciósémán is. Ebben a reakciómechanizmusban a SERCA-nak két szerepet tulajdonítottunk: a csatornák lassú aktivációja során a SERCA párhuzamos reakcióban verseng a kalciumért az IP_3 receptor aktiválóhelyével, a kalciumfelszabadulás leállása után viszont konzekutív reakcióban távolítja el a citoplazmából a gátlóhelyről disszociált ionokat. A modell részletes ismertetése a Függelékben található. Ebből a leegyszerűsített reakcióból nyert analitikus eredményeink



18. ábra
Az analitikusan becsült periódusidő függése a stimulus szintjét jelző k_a paramétertől a SERCA aktivitást jellemző k_p paraméter $0,225 s^{-1}$ (—) és $0,185 s^{-1}$ (- -) értékénél

megegyeztek a De Young-Keizer modell numerikus előrejelzésével: a frekvenciaváltozás előjele és mértéke függött a stimulust jellemző paramétertől (18. ábra).

A következőkben kísérletekkel kívántuk igazolni, hogy a stimulus eltérő mértéke lehetett az oka a szakirodalomban leírt ellentmondásos

megfigyeléseknek. Ehhez hisztaminnal stimulált HeLa sejtekben kezdtünk vizsgálatokat, mert ezekben a kalciumoszillációk mechanizmusa viszonylag jól felderített, és feltételezhetően az IP₃ receptorok periódikus aktiválásán és inaktiválásán alapul (Sauvé és mtsai., 1991; Bootman és mtsai., 1994). A sejtekben a SERCA-t thapsigarginnal kívántuk részlegesen gátolni, és ennek a hisztaminnal kiváltott oszcillációkra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A thapsigargin használatát az indokolta, hogy ez az irreverzibilis gátlószer a modellezésben használt feltételezésnek megfelelően valóban a V_{max} értéket csökkenti (Lytton és mtsai., 1991).

4 nM thapsigarginnal történt 5-10 perces kezelés alatt – összhangban Missiaen és munkatársai megfigyelésével (Missiaen és mtsai., 1994) – nem tapasztaltunk változást a HeLa sejtek kalciumszintjében, és a kezelés után 6 órával nem emelkedett meg a tripánkéket kizáró sejtek aránya. A következőkben megvizsgáltuk, hogy ilyen mértékű kezelés ennek ellenére befolyásolja-e a sejtek kalciumraktározó képességét. Mivel a thapsigargin irreverzibilis gátlószer, az a mennyisége, amely a kezelés alatt a sejtbe jutott, biztosan inaktiválja a SERCA fehérjék egy részét, így azok nem képesek kompenzálni a raktárakból a kalcium kiszivárgását. Hosszan tartó kalcium nélküli inkubáció hatására ezért a raktárakból felszabadítható kalciummennyiség mérhető csökkenését vártuk. A sejteket ezért 5 percig kalciummentes közegben thapsigarginnal inkubáltuk, majd a gátlószer lemosása után újabb 30 percig kalcium nélküli médiumban tartottuk őket. Ezután a sejtekben 100 μ M hisztamin hatására átlagosan $2,9 \pm 0,3$ amplitúdójú kalciumjelek alakultak ki (F/F_0 arányban kifejezve), míg a kontrollként a thapsigargin oldószerével, etanollal (0,13% V/V) kezelt sejtek fluoreszcencia-változása $7,1 \pm 0,2$ volt. Ebből arra következtettünk, hogy a thapsigargin már ebben a mennyiségben is kimutathatóan lecsökkenti a SERCA aktivitását.

A thapsigargin hatását hisztaminnal előidézett oszcillációkra a következő kísérletekben vizsgáltuk. A sejtekhez először 4 nM thapsigargin, majd 70-80 s elteltével hisztamint adtunk. Az oszcillációk periódusidejét az első 2-6 ciklusból határoztuk meg olyan sejtekben, amelyek nem mutattak túlzottan

szabálytalan viselkedést. Az ezen idő alatt bejutó gátlószer tehát elegendő a pumpa aktivitás mérhető csökkentéséhez, míg a kalciumraktár tartalmának csökkenése, és annak esetleges hatása a kalciumfelszabadulásra elhanyagolható.

A kontroll és a thapsigarginnal kezelt sejtekben – a legmagasabb hisztamin dózist kivéve – hasonló volt a oszcilláló sejtek aránya. Ez arra utal, hogy a sejtek azonos populációinak válaszát hasonlítottuk össze. 1 ill. 2,5 μM hisztamin koncentrációnál az egyes sejtek közti jelentős periódusidőbeli eltérés ellenére szignifikáns eltérést tapasztaltunk a thapsigarginnal kezelt és a kontroll sejtek periódusideje között (3. táblázat): thapsigargin hatására az átlagos periódusidő lecsökkent. Ezzel szemben a thapsigargin kezelés hatástalan volt szupramaximális dózis esetén (100 és 500 μM hisztamin), noha a sejtek közti periódusidő-ingadozás jelentősen lecsökkent (3. táblázat).

sejt	HeLa				Hep-2
agonista	hisztamin				ATP
koncentráció	1 μM	2,5 μM	100 μM	500 μM	20 μM
kontroll	106,2 \pm 9,0 s (29/171)	51,8 \pm 3,9 s (42/101)	30,4 \pm 1,8 s (66/83)	29,3 \pm 2,6 s (14/21)	15,4 \pm 0,4 s (40/58)
thapsigargin nal kezelt	87,0 \pm 4,9 s* (44/144)	40,9 \pm 3,1 s* (39/74)	26,7 \pm 1,0 s (48/84)	27,4 \pm 2,8 s (7/61)	17,2 \pm 0,4 s* (45/97)

3. táblázat

Kalciumoszcillációk átlagos periódusideje 4 illetve 2 nM thapsigarginnal kezelt és kezeletlen HeLa illetve Hep-2 sejtekben hisztaminnal illetve ATP-vel történt ingerlés után.

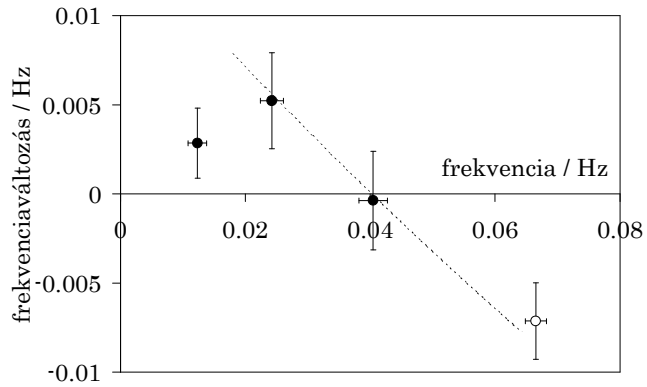
*Az értékek az átlagot és az átlag standard hibáját jelentik. Zárójelben az oszcillációkkal válaszoló sejtek és az összes ingerelt sejt száma. *:p<0,05 esetén szignifikánsan különbözik a kontroll értéktől.*

Azt, hogy az alacsony periódusidőnél jelentkező frekvencianövekedés nem a kalciumraktárak esetleges kimerülésére fellépő kapacitív kalcium-beáramlás következménye (Girard és Clapham, 1993; Missiaen és mtsai., 1994), kalciummentes közegben ellenőriztük. 1 μM hisztaminnal stimulált kontroll sejtekben ekkor – Thornhoz hasonlóan (Thorn, 1996) – gyakran csak egyszeri tranzienszt figyeltünk meg, s csupán kb. minden tizedik sejtben jelentkeztek nagyon ritka oszcillációk, míg thapsigargin jelenlétében a sejtek mintegy egynegyedében alakultak ki oszcillációk. Ezek átlagos periódusideje, $72,5 \pm 9,5$ s ($n=10$), a kontroll sejtek kalciumtartalmú közegben mért értékénél is rövidebb volt. Gyenge ingerek esetében tehát a periódusidő nem az extracelluláris kalciumbeáramlás hatására csökkent le.

Véleményünk szerint az IP_3 receptor periódikus aktiválódása által kialakuló oszcillációkban a SERCA aktivitásának csökkentése akkor okozza az oszcillációk lelassulását, ha a periódusidő elegendően rövid. HeLa sejtekben szupramaximális hisztamindózisnál a thapsigargin nem fejtett ki hatást a periódusidőre. Ezt azzal magyaráztuk, hogy az oszcillációk 25-30 s-os periódusideje nem volt megfelelően alacsony, s itt a SERCA hatása a két folyamatra közel azonos mértékű lehetett. Azt vártuk tehát, hogy a kísérletet olyan sejteken elvégezve, amelyekben a kalciumszint 25 s-nél rövidebb periódusidővel változik, thapsigargin hatására frekvenciacsökkenést tapasztalunk. Ilyen sejt típus a HEP-2, amelyben, mint azt kimutattuk, extracelluláris nukleotidokkal 10-15 s periódusidejű oszcillációk válthatók ki.

Az előzőknek megfelelő kísérletek a következő eredményekkel jártak. A sejtek egy részében 4 nM thapsigargin kalciumszint-emelkedést okozott, ezért a gátlószerből 2 nM-t alkalmaztunk. 5 perces előkezelés 2 nM thapsigarginnal, majd 30 perces kalciummentes közegben történt inkubáció a sejtekben $10,5 \pm 0,4$ -ról $6,2 \pm 0,2$ -re csökkentette a 100 μM ATP hatására kiváltott kalciumválasz amplitúdóját (F/F_0 értékben kifejezve). Mivel HEP-2 sejtekben az ATP koncentrációtól kevésbé függ az oszcillációk frekvenciája, nem volt szükséges a hatás dóziszfüggését felvenni, ezért csak egy szupramaximális ATP koncentrációnál, 20 μM -nál vizsgáltuk meg a thapsigargin hatását. A thapsigargin kezelés hatására a periódusidő

szignifikáns növekedését tapasztaltuk (3. táblázat).



19. ábra
A thapsigargin hatása HeLa (●) és HEp-2 (○) sejtekben kiváltott oszcillációk frekvenciájára, és a 18. ábrán bemutatott analitikus becslés eredménye (- -)

A HeLa és HEp-2 sejtekben mért eredményeinket összevetve az analitikus számítás előrejelzésével jó kvalitatív egyezést kaptunk (19. ábra).

8. Következtetések

8.1. Nukleotid-aktivált kalcium jelátvitel HEp-2 sejtekben

Humán légúti epitél sejtekben extracelluláris nukleotidok hatására intracelluláris kalciumoszillációkat figyeltünk meg. Az oszcillációk leggyakrabban közel szinuszos lefutásúak voltak, és frekvenciájukat kevésbé befolyásolta az alkalmazott nukleotid koncentrációja.

Periódikus kalciumtranziensek extracelluláris kalcium hiányában, illetve rianodin jelenlétében is létrejöttek, a belső kalciumraktárak kiürítése és a foszfolipáz C gátlása azonban megakadályozta a válasz kialakulását. Az IP_3 - és thapsigargin-érzékeny raktárból származó oszcillációkért tehát intracelluláris mechanizmus felelős (Thomas és mtsai., 1996). Hasonló megfigyeléseket tettek ATP-vel ingerelt nyúl légúti epitél (Evans és Sanderson, 1999a) és 16HBE14o- sejtekben (Sienaert és mtsai., 1998). Megállapítható továbbá, hogy HEp-2 sejtekben nem az ionszatórnaként működő P2X, hanem feltehetően a foszfoinozitol jelátvitelhez kapcsolódó P2Y purinoceptorok aktiválódnak (King és mtsai., 1998).

Forbol észter hatása alapján úgy tűnik, hogy a folyamat szabályozásában a protein kináz C-nek is szerepe lehet (bár folytonos farmakológiai aktiválásának eredménye eltérhet az átmeneti fiziológiás aktiváció hatásától (Nishizuka, 1995)), ami nem a kalciumraktárak kiürítésével (Ribeiro és Putney, 1996; Woodruff és mtsai., 1999), hanem feltételezhetően a jelátviteli út gátlásával fejthet ki hatást (Sugita és mtsai., 1999).

Az állandó sebességgel és profillal terjedő intracelluláris kalciumhullámok megjelenése arra utal, hogy az ingerelt sejtben a jel terjedése nem egyszerű diffúzióval, hanem ún. reakciódiffúziós folyamat segítségével zajlik le, s a koncentrációfront terjedésében helyi erősítési folyamat is részt vesz. Ennek a megfigyelésnek azért van jelentősége, mert a protein kináz C szerepén alapuló modellben ezidáig nem tételeztek fel helyi pozitív visszacsatolást (Cuthbertson és Chay, 1991; Thomas és mtsai., 1996).

8.2. Az SERCA aktivitásának hatása az oszcillációk frekvenciájára

Megállapítottuk, hogy az IP_3 receptor periódikus aktiválásán és inaktiválásán alapuló De Young-Keizer modell képes leírni a SERCA aktivitásának kísérletekben megfigyelt ellentmondásos hatását az oszcillációk frekvenciájára.

A modellen és egy leegyszerűsített reakciósémán végzett számítások alapján erre a következő magyarázatot javasoljuk: a Ca^{2+} -ATPáz ellentétesen befolyásol különböző, az oszcillációkban fontos kalciumfüggő folyamatokat. Jelentősen eltérő stimulus-, és így frekvenciatartományban ezen folyamatok közül más és más válhat dominánssá a periódusidő meghatározásában, így a SERCA aktivitás megváltoztatása a periódusidőre a stimulustól függő hatással bírhat.

Az elképzelésünk alapjául szolgáló mechanizmusban az endoplazmatikus retikulum kalciumpumpája a kalciumfelszabadulás kezdeti fázisában a szabad kalcium eltávolításával lassítja az IP_3 -at kötött receptorok aktivációját, az oszcillációs ciklus későbbi, refrakter szakaszában viszont eltolja az egyensúlyt a gátló helyről történő disszociáció irányába, s ezért gyorsítja a gátlás megszűnését. Gyenge ingerek, és így ritka oszcillációk esetében a lassú aktiváció a sebességmeghatározó, gyakori oszcillációk esetében viszont az aktiváció – a sok IP_3 -at kötött receptor révén – olyan gyors, hogy ez esetben az inaktiváció időtartama szabja meg a periódusidőt. Ritka oszcillációk esetében a SERCA részleges gátlása az aktiváció felgyorsításával frekvencianövekedést okoz, gyors oszcillációk esetében viszont az inaktiváció időtartamára kifejtett hatása dominál, ami frekvenciacsökkenéshez vezet. A SERCA aktivitásának növelése akár aktiválással, akár a fehérje túlexpresszállásával szerintünk éppen fordított hatású. Magyarázatunk lényeges eleme tehát az, hogy az aktiváció kialakulásának és a refrakter fázisnak a relatív súlya az oszcillációs perióduson belül függ a periódusidőtől, amit alátámasztanak Marchant és Parker kísérletes adatai (Marchant és Parker, 2001).

Humán sejtvonalakon végzett kísérleteink igazolták várakozásainkat. Ritka oszcillációk esetében thapsigargin kezeléssel frekvencianövekedést értünk el, gyakori, 15-20 s periódusidejű oszcillációk esetében pedig a SERCA részleges gátlásával frekvenciacsökkenést tapasztaltunk. 25 s körüli periódusidejű oszcillációknál thapsigargin hatására a periódusidőben nem tapasztaltunk szignifikáns változást. Noha a kísérleteket két sejt típuson végeztük, a szakirodalomból vett (Bootman és mtsai., 1994; Barrero és mtsai., 1997), illetve saját megfigyelések (Visegrády és mtsai., 2000) alapján az eltérésért feltételezhetően nem különböző mechanizmus a felelős.

Elképzelésünk jól leírja az irodalomban közölt látszólag ellentmondó adatokat is. Petersen és munkatársai, és Morgan és Jacob a SERCA gátlása után gyengén ingerelt pankreász acinus illetve endotélsejteket vizsgálva tapasztaltak frekvencianövekedést (Petersen és mtsai., 1993; Morgan és Jacob, 1998), Lechleiter és munkatársai pedig gyakori oszcillációkat mutató *Xenopus laevis* oocitákban érték el ugyanezt a SERCA túlexpresszáásával (Camacho és Lechleiter, 1993; Lechleiter és mtsai., 1998). A már megjelent adatok magyarázatán kívül azonban kísérleti eredményeket is sikerült előrejeleznünk. Munkánk közben nem állt rendelkezésre olyan irodalmi megfigyelés, amely gyengén ingerelt sejtekben vizsgálta volna a SERCA aktivitás növelésének hatását. Mi erre a beavatkozásra frekvenciacsökkenést jósoltunk, és Thomas és munkatársai a közleményünkkel (Visegrády és mtsai., 2001) egyidőben megjelent munkájukban májsejtekben éppen erről a jelenségről számoltak be (Smaili és mtsai., 2001).

A fenti, az IP_3 receptor szabályozásán alapuló gondolatmenetünk nyilvánvalóan nem érvényes Rossi és Kao megfigyelésére, akik a SERCA gátlásával ritkán ($T > 1,5$ perc) oszcilláló sejtekben okoztak frekvenciacsökkenést (Rossi és Kao, 1997). Ez viszont teljesen összhangban van azzal, hogy fibroblasztokban az oszcillációk során a foszfolipáz C periódikus aktiválása játszik fontos szerepet (Harootunian és mtsai., 1991).

Érdemes megjegyezni, hogy két, a De Young-Keizer modellhez hasonló matematikai modell (Atri és mtsai., 1993; Li és mtsai., 1994) nem reprodukálta a kísérleti eredményeket. Mivel ezek a De Young-Keizer

modelltől eltérően pillanatszerű kötést feltételeznek az IP_3 receptor aktiváló helyére, úgy tűnik, hogy az oszcillációk leírásának lényeges eleme a kalcium általi aktiváció kinetikájának figyelembevétele.

Végül megfigyeléseinknek egy további lehetséges vonzatát érdemes megjegyezni. A 15. illetve a 18. ábrán látható görbe a frekvencia stimulustól való függését adja meg adott SERCA aktivitásnál. Látható, hogy a pumpa aktivitás (és mennyiség) növelésével tágul a fellépő oszcillációk frekvenciatartománya, tehát növekszik a kimenet érzékenysége a bemenettől. Mivel egyes sejtek elsősorban a periódusidőben kódolják a külső inger információját, a SERCA mennyiség növelésével nő a jelátvitel érzékenysége. Több SERCA fehérje szintézise és működése (hasonló amplitúdójú kalciumtranziensek esetében) azonban több energiát igényel, ezért a sejt számára energetikailag a lehető legalacsonyabb SERCA aktivitás biztosítása az előnyösebb. E két ellentétes szempont esetén könnyen lehetséges, hogy az egyes sejtek kalcium jelzőrendszere olyan optimum környékén működik, amelyben a leggazdaságosabb az információátalakítás.

9. Az eredmények jelentősége

Eredményeink tudományos jelentőségét a következőkben látom:

1. Humán légúti epitél sejtekben először írtunk le nukleotid-indukált kalciumoszillációkat a szakirodalomban. Az általunk szerzett ismeretek – elsősorban a kalciumfelszabadulás forrásának és a protein kináz C lehetséges szerepének tisztázása – segíthetnek olyan terápiás eljárások kifejlesztésében, amelyek a légúti epitélia működési rendellenességeit próbálják orvosolni.

2. Állandó sebességgel terjedő intracelluláris kalciumhullámok kimutatásával bebizonyosodott, hogy szinuszos kalciumoszillációkkal válaszoló légúti epitélsejtekben lokális erősítési folyamatnak is szerepe van a kalciumfelszabadulásban.

3. Sikerült megmagyaráznunk a szakirodalom egyik ellentmondásos kérdését, az endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPázának hatását az oszcillációk periódusidejére. Megállapítottuk, hogy az ellentmondó kísérleti eredményeknek az lehetett az oka, hogy az egyes esetekben a sejteket – bár azokban az oszcillációk mechanizmusa hasonló – eltérő erősségű inger érte.

4. A fenti jelenségnek az lehet a molekuláris háttere, hogy az oszcillációk periódusidejét magas, illetve alacsony frekvenciánál eltérő folyamatok időtartama szabja meg. Ez a feltételezés, amennyiben igaznak bizonyul, a távoli jövőben olyan esetekben nyújthat segítséget gyógyszeres kezeléshez, amelyekben a kalciumoszillációk frekvenciájának sérült szabályozása okoz abnormális sejtműködést.

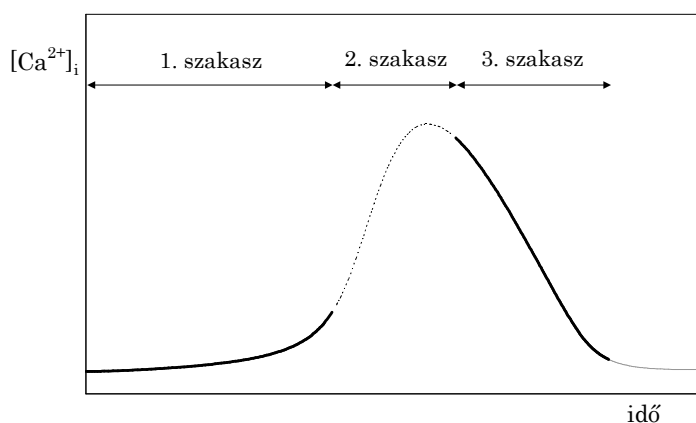
5. Eredményeink alapján felmerült annak a lehetősége, hogy a sejtek úgy optimalizálják kalcium-jelzőrendszerüket, hogy az a leggazdaságosabban keltsen minél szélesebb frekvenciatartományban oszcillációkat.

Függelék

Kalciumoszillációk periódusidejének analitikus meghatározása

A kalciumoszillációkat leíró, numerikusan megoldható realizstikus modellek kiegészítésére egy olyan modellt alkottunk, amellyel az oszcillációk periódusideje analitikusan is meghatározható. Mivel a csupán lineáris tagokból álló egyenletek, bár analitikusan megoldhatók, nem mutatnak oszcillációkat, a következő módon jártunk el.

Az oszcillációs ciklust három részre osztottuk (20. ábra), az egyes



*20. ábra
Az oszcillációs ciklus
felosztása a periódusidő
analitikus becsléséhez*

szakaszokat pedig analitikusan megoldható egyenletekkel írtuk le. Az így kapott folyamatok időtartamának az összege az oszcillációs ciklus teljes hosszát, azaz a periódusidőt adja meg. Modellünk tehát nem magyarázza az oszcillációkat, hanem egy, bizonyítottan oszcillációkat eredményező biokémiai modellt a szakirodalomból vett ismeretek segítségével, igen erős megkötések mellett analitikusan kezelhető formában ír le. Az oszcillációs ciklust az alábbi három szakaszra bontottuk.

1. Indukciós szakasz

Ez az autokatalitikus felfutást megelőző lassú aktiváció szakasza. A következő folyamatokat vettük figyelembe:

a) A citoplazma szabad kalciumszintjét növeli a nyitott IP₃ receptorokon keresztüli felszabadulás és csökkenti az endoplazmatikus retikulum Ca²⁺-ATPáza. A plazmamembránon és az egyéb organellumok membránján keresztül lejátszódó transzportot elhanyagoltuk. A SERCA kinetikáját az analitikus kezelés érdekében egyszerű Michaelis-Menten kinetikának tekintettük. Mivel az IP₃ receptorok száma a kalciumionokhoz képest nagyon alacsony, elhanyagoltuk a receptorokhoz való kötődés és disszociáció befolyását a kalciumszintre, akár csak a kalciumkötő molekulák hatását. Ez utóbbiakról azt feltételeztük, hogy gyorsak és kis affinitásúak, ezért a kalciummennyiség állandó hányadát pillanatszerűen megkötik.

b) A citoplazmába jutott kalcium kötődik az aktiválható IP₃ receptorokhoz és disszociál a nyitott receptorokról. Az előbbi folyamat csatornanyitást, az utóbbi -zárást okoz.

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{Ca}^{2+}]_i}{dt} &= J_{cs} - J_p \\ \frac{dRC}{dt} &= k_+ \cdot R \cdot [\text{Ca}^{2+}]_i - k_d \cdot RC \end{aligned} \quad (1)$$

ahol

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ a citoplazmatikus szabad kalciumion-koncentráció,

RC a nyitott IP₃ receptorok száma egységnyi térfogatú citoplazmára vonatkoztatva,

J_{cs} a kalciumfelszabadulás reakciósebessége,

J_p a kalciumkipumpálás sebessége

k_+ a kalcium és az IP₃ receptor asszociációs sebességi állandója,

R az csak IP₃-at kötött receptorok száma egységnyi térfogatú citoplazmára vonatkoztatva és

k_d a Ca²⁺ disszociáció sebességi állandója az IP₃ receptorról.

$$J_{cs} = P \cdot ([\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}} - [\text{Ca}^{2+}]_i) \cdot RC \approx P \cdot [\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}} \cdot RC = k_{cs} \cdot RC$$

ahol

P a csatorna permeabilitása,

$[Ca^{2+}]_{ER}$ a luminális kalciumkoncentráció, és feltételeztük, hogy $[Ca^{2+}]_{ER} \gg [Ca^{2+}]_i$ és hogy a kezdeti szakasz alatt állandó (Barrero és mtsai., 1997).

Mivel a citoplazma Ca^{2+} koncentrációja az indukciós szakaszban keveset változik és értéke K_M körül van, a SERCA sebességét lineáris taggal közelítettük:

$$J_p = V_{\max} \cdot \frac{[Ca^{2+}]_i}{[Ca^{2+}]_i + K_M} \approx \frac{V_{\max}}{2 \cdot K_M} \cdot [Ca^{2+}]_i = k_p \cdot [Ca^{2+}]_i \quad (2)$$

A receptoraktivációnál azt feltételeztük, hogy az indukciós periódusban az aktiválható csatornák száma nem változik jelentősen, tehát

$$k_+ \cdot R \approx \text{állandó} = k_a$$

Mint látható, k_a egyenesen arányos a kezdetben IP_3 -at kötött receptorok számával, így függvénye a citoplazma IP_3 szintjének. Modellünkben tehát ez a paraméter függ a kémiai inger erősségétől.

Az (1) egyenletrendszer megoldása

$$\begin{aligned} [Ca^{2+}]_i(t) &= C_1 \cdot e^{k_1 t} + C_2 \cdot e^{k_2 t} \\ RC(t) &= RC_1 \cdot e^{k_1 t} + RC_2 \cdot e^{k_2 t} \end{aligned}$$

ahol

$$k_{1,2} = \left(-k_p - k_d \pm \sqrt{(k_d - k_p)^2 + 4 \cdot k_a \cdot k_{cs}} \right) / 2$$

és

$$C_1 = \frac{k_1 + k_d}{\sqrt{(k_d - k_p)^2 + 4 \cdot k_a \cdot k_{cs}}} [\text{Ca}^{2+}]_i(0) + \frac{(k_1 + k_d) \left(k_1 + k_d - \sqrt{(k_d - k_p)^2 + 4 \cdot k_a \cdot k_{cs}} \right)}{k_a \cdot \sqrt{(k_d - k_p)^2 + 4 \cdot k_a \cdot k_{cs}}} RC(0)$$

$[\text{Ca}^{2+}]_i(0)$ és $RC(0)$ a két komponens kezdeti koncentrációja illetve gyakorisága.

Mivel $k_2 < 0$ és $|k_2| > k_1$, ha $t > |k_2^{-1}|$ és $k_1 > 0$, akkor

$$[\text{Ca}^{2+}]_i(t) \approx C_1 \cdot e^{k_1 t}$$

exponenciálisan növekvő függvénnyel írható le. Ennek az időállandója az a τ_1 , amelyre $[\text{Ca}^{2+}]_i(\tau_1) = e \cdot [\text{Ca}^{2+}]_i(0)$. Innen

$$\tau_1 = \frac{1}{k_1} \cdot \ln \left(\frac{e \cdot [\text{Ca}^{2+}]_i(0)}{C_1} \right)$$

2. Autokatalitikus gyors kalciumfelszabadulás majd inaktiváció

Azt feltételeztük, hogy ennek a gyors folyamatnak az időtartamát, τ_2 -t, nem befolyásolják jelentősen a fenti paraméterek, s hogy a hirtelen megemelkedett kalciumszint rövid idő alatt telíti mind az aktiváló, mind az inaktiváló kötőhelyeket, és a kalciumfelszabadulást egy kalcium-függő gátlás állítja le.

3. Az inaktiváció lecsengése

A csatornák bezáródása miatt ebben a szakaszban a kalciumkoncentráció csak a SERCA aktivitás hatására változik. Ebben a szakaszban a Ca^{2+} szint csökkenése miatt mind az aktiváló, mind az inaktiváló helyről disszociál a kalcium. Azt feltételeztük, hogy az utóbbi lassabb folyamat is az

egyensúlyhoz közel van, és hogy az újabb ciklus indukciós periódusa akkor kezdődhet el, amikor a gátlás szinte teljesen elmúlik, azaz a kalciumkoncentráció a nyugalmi szintre ér vissza.

Mivel itt már jelentős a kalciumszint-változás, a Ca^{2+} -ATPáz kinetikájára nem alkalmazhattunk lineáris közelítést.

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_i}{dt} = -V_{\max} \frac{[\text{Ca}^{2+}]_i}{[\text{Ca}^{2+}]_i + K_M}$$

Ennek a megoldása:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i(t) + K_M \cdot \ln([\text{Ca}^{2+}]_i(t)) = [\text{Ca}^{2+}]_i(t^*) + K_M \cdot \ln([\text{Ca}^{2+}]_i(t^*)) - V_{\max} \cdot (t - t^*)$$

t^* a kezdeti időpontot jelöli.

Mivel ez a lecsengés két olyan fázist követ, amelyben kalciumfelszabadulás játszódtott le, itt az időállandót, τ_3 -t úgy definiáljuk, hogy $[\text{Ca}^{2+}]_i(t^* + \tau_3) = [\text{Ca}^{2+}]_i(t^*)/e^2$. Mivel (2) alapján $V_{\max} = 2 \cdot K_M \cdot k_p$,

$$\tau_3 = \frac{1}{k_p} + \frac{1}{2 \cdot K_M \cdot k_p} \cdot \frac{e^2 - 1}{e^2} \cdot [\text{Ca}^{2+}]_i(t^*)$$

A teljes oszcillációs periódus becsült időtartama a három fázis időtartamának összege:

$$T = \tau_1 + \tau_2 + \tau_3$$

A számolások során használt paramétereket a 4. táblázatban tüntettem fel.

paraméter	értéke	jelentése
k_p	változtatva	kalciumvisszavétel látszólagos elsőrendű sebességi állandója
k_{cs}	5 s^{-1}	kalciumfelszabadulás látszólagos elsőrendű sebességi állandója
k_a	változtatva	a kalcium látszólagos kötődési állandója az IP_3 receptorra
k_d	$0,4 \text{ s}^{-1}$	a Ca^{2+} disszociáció sebességi állandója az IP_3 receptorról
K_M	250 nM	SERCA Michaelis állandója
$[\text{Ca}^{2+}]_i(0)$	100 nM	nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$
$[\text{Ca}^{2+}]_i(t^*)$	800 nM	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ az utolsó szakasz kezdetén
$RC(0)$	0,05 nM	IP_3 -at kötött receptorok száma kezdetben egységnyi térfogatú citoplazmához viszonyítva
τ_2	2 s	gyors kalciumfelszabadulás szakaszának időtartama

4. táblázat

Az oszcilláció periódusidejének analitikus becsléséhez használt paraméterek

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Visegrády, A., L. Grama, B. Somogyi, Gy. Lustyik:

Characterization of Intracellular Calcium Oscillations Induced by Extracellular Nucleotides in HEp-2 Cells

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **58**(2-3), 80-86 (2000)

Visegrády, A., Zs. Lakos, L. Czimbalek, B. Somogyi:

Stimulus-dependent control of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} oscillation frequency by the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase.

Biophysical Journal **81**(3), 1398-1405 (2001)

Az eddig megjelent közlemények

Visegrády A.:

Kalciumhullámok az élő sejtben.

Élet és tudomány **53**, 1324-1325 (1998)

Nagygyóry, Sz., M. Wittmann, Sz. Pintér, A. Visegrády, A. Dancsó, N. B. Thuy, Z. Noszticzius, L. Hegedűs, H.-D. Försterling:

Alternative Reaction Channels és Carbene Intermediates in the Ce⁴⁺-Malonic Acid és Ce⁴⁺-Bromomalonic Acid Reactions. 1. CO₂ Measurements

Journal of Physical Chemistry A **103**(25), 4885-4892 (1999)

Visegrády, A., L. Grama, B. Somogyi, Gy. Lustyik:

Characterization of Intracellular Calcium Oscillations Induced by Extracellular Nucleotides in HEp-2 Cells

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **58**(2-3), 80-86 (2000)

Visegrády, A., Zs. Lakos, L. Czimbalek, B. Somogyi:

Stimulus-dependent control of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ oscillation frequency by the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase.

Biophysical Journal **81**(3), 1398-1405 (2001)

Referált folyóiratban megjelent poszterkivonatok

Visegrády, A., Zs. Lakos, L. Czimbalek, B. Somogyi:

Stimulus-dependent modulation of the frequency of intracellular calcium oscillations by changing the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity

Biophysical Journal **80** (1), 2 Part 2 B439 (2001)

Lakos, Zs., A. Visegrády, L. Czimbalek, B. Somogyi:

The effect of thapsigargin treatment on the frequency of intracellular calcium oscillations induced by histamine in HeLa cells.

Biophysical Journal **80** (1), 2 Part 2 B440 (2001)

Irodalomjegyzék

- Atri, A., J. Amundson, D. Clapham, és J. Sneyd. 1993. A single-pool model for intracellular calcium oscillations and waves in the *Xenopus laevis* oocyte. *Biophys. J.* 65:1727-39.
- Barrero, M. J., M. Montero, és J. Alvarez. 1997. Dynamics of $[Ca^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum and cytoplasm of intact HeLa cells. A comparative study. *J. Biol. Chem.* 272:27694-9.
- Bennett, D. L., T. R. Cheek, M. J. Berridge, H. De Smedt, J. B. Parys, L. Missiaen, és M. D. Bootman. 1996. Expression és function of ryanodine receptors in nonexcitable cells. *J. Biol. Chem.* 271:6356-62.
- Berridge, M. J. 1990. Calcium oscillations. *J. Biol. Chem.* 265:9583-6.
- Berridge, M. J. 1991. Cytoplasmic calcium oscillations: a two pool model. *Cell Calcium.* 12:63-72.
- Berridge, M. J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature.* 361:315-25.
- Berridge, M. J. 1995a. Capacitative calcium entry. *Biochem. J.* 312:1-11.
- Berridge, M. J. 1995b. Introduction. *In* Calcium waves, gradients and oscillations. CIBA Found. Symp. Wiley, Chichester. 1-3.
- Berridge, M. J. 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J. Physiol. (Lond.)* 499:291-306.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, és P. Lipp. 1998. Calcium—a life and death signal. *Nature.* 395:645-8.
- Bezprozvanny, I., J. Watras, és B. E. Ehrlich. 1991. Bell-shaped calcium-response curves of $Ins(1,4,5)P_3$ and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature.* 351:751-4.
- Bird, G. S., M. F. Rossier, J. F. Obie, és J. W. Putney, Jr. 1993. Sinusoidal oscillations in intracellular calcium requiring negative feedback by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 268:8425-8.
- Boitano, S., E. R. Dirksen, és M. J. Sanderson. 1992. Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science.* 258:292-5.
- Bollen, M., S. Keppens, és W. Stalmans. 1998. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem. J.* 336:19-31.

- Bootman, M., E. Niggli, M. Berridge, és P. Lipp. 1997. Imaging the hierarchical Ca^{2+} signalling system in HeLa cells. *J. Physiol. (Lond)*. 499:307-14.
- Bootman, M. D., T. R. Cheek, R. B. Moreton, D. L. Bennett, és M. J. Berridge. 1994. Smoothly graded Ca^{2+} release from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} stores. *J. Biol. Chem.* 269:24783-91.
- Bootman, M. D., L. Missiaen, J. B. Parys, H. De Smedt, és R. Casteels. 1995. Control of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release by cytosolic Ca^{2+} . *Biochem. J.* 306:445-51.
- Camacho, P., és J. D. Lechleiter. 1993. Increased frequency of calcium waves in *Xenopus laevis* oocytes that express a calcium-ATPase. *Science*. 260:226-9
- Camacho, P., és J. D. Lechleiter. 1995. Calreticulin inhibits repetitive intracellular Ca^{2+} waves. *Cell*. 82:765-71.
- Camello, P., J. Gardner, O. H. Petersen, és A. V. Tepikin. 1996. Calcium dependence of calcium extrusion and calcium uptake in mouse pancreatic acinar cells. *J. Physiol.* 490:585-93.
- Carafoli, E. 1987. Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 56:395-433.
- Carter, T. D., és D. Ogden. 1997. Kinetics of Ca^{2+} release by InsP_3 in pig single aortic endothelial cells: evidence for an inhibitory role of cytosolic Ca^{2+} in regulating hormonally evoked Ca^{2+} spikes. *J. Physiol. (Lond)* 504:17-33.
- Cheng, H., W. J. Lederer, és M. B. Cannell. 1993. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*. 262:740-744.
- Clapham, D. E. 1995. Calcium signaling. *Cell*. 80:259-68.
- Cobbold, P. H., K. S. Cuthbertson, M. H. Goyns, és V. Rice. 1983. Aequorin measurements of free calcium in single mammalian cells. *J. Cell. Sci.* 61:123-36.
- Codazzi, F., M. N. Teruel, és T. Meyer. 2001. Control of astrocyte Ca^{2+} oscillations és waves by oscillating translocation and activation of protein kinase C. *Curr. Biol.* 11:1089-97.
- Conigrave, A. D., és L. Jiang. 1995. Review: Ca^{2+} -mobilizing receptors for ATP és UTP. *Cell Calcium*. 17:111-9.
- Cruzalegui, F. H., és H. Bading. 2000. Calcium-regulated protein kinase

- cascades and their transcription factor targets. *Cell. Mol. Life. Sci.* 57:402-10.
- Cuthbertson, K. S., és T. R. Chay. 1991. Modelling receptor-controlled intracellular calcium oscillators. *Cell Calcium.* 12:97-109.
- Cuthbertson, K. S., és P. H. Cobbold. 1985. Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca^{2+} . *Nature.* 316:541-542.
- De Koninck, P., és H. Schulman. 1998. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca^{2+} oscillations. *Science.* 279:227-30.
- De Young, G. W., és J. Keizer. 1992. A single-pool inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in Ca^{2+} concentration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:9895-9.
- Devidas, S., és W. B. Guggino. 1997. CFTR: domains, structure, and function. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29:443-451.
- Dolmetsch, R. E., K. Xu, és R. S. Lewis. 1998. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature.* 392:933-6.
- Dupont, G., M. J. Berridge, és A. Goldbeter. 1991. Signal-induced Ca^{2+} oscillations: properties of a model based on Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *Cell Calcium.* 12:73-85.
- Eberhard, D. A., és R. W. Holz. 1988. Intracellular Ca^{2+} activates phospholipase C. *Trends Neurosci.* 11:517-20.
- Enomoto, K., K. Furuya, S. Yamagishi, T. Oka, és T. Maeno. 1994. The increase in the intracellular Ca^{2+} concentration induced by mechanical stimulation is propagated via release of pyrophosphorylated nucleotides in mammary epithelial cells. *Pflügers Arch.* 427:533-42.
- Enslin, H., és T. R. Soderling. 1994. Roles of calmodulin-dependent protein kinases and phosphatase in calcium-dependent transcription of immediate early genes. *J. Biol. Chem.* 269:20872-7.
- Evans, J. H., és M. J. Sanderson. 1999a. Intracellular calcium oscillations induced by ATP in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 277:L30-41.
- Evans, J. H., és M. J. Sanderson. 1999b. Intracellular calcium oscillations regulate ciliary beat frequency of airway epithelial cells. *Cell Calcium.* 26:103-110.
- Fewtrell, C. 1993. Ca^{2+} oscillations in non-excitabile cells. *Annu. Rev.*

Physiol. 55:427-54.

Finch, E. A., T. J. Turner, és S. M. Goldin. 1991. Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science*. 252:443-6.

Gall, D., E. Baus, és G. Dupont. 2000. Activation of the liver glycogen phosphorylase by Ca^{2+} oscillations: a theoretical study. *J. theor. Biol.* 207: 445-54.

Girard, S., és D. Clapham. 1993. Acceleration of intracellular calcium waves in *Xenopus* oocytes by calcium influx. *Science*. 260:229-32.

Godin, P. J., és T. G. Buchman. 1996. Uncoupling of biological oscillators: a complementary hypothesis concerning the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit. Care. Med.* 24:1107-16.

Goldbeter, A. 1996. Biochemical oscillations and cellular rhythms. Cambridge University Press.

Goldbeter, A., G. Dupont, és M. J. Berridge. 1990. Minimal model for signal-induced Ca^{2+} oscillations and for their frequency encoding through protein phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87:1461-5.

Gomez, A. M., H. H. Valdivia, H. Cheng, M. R. Lederer, L. F. Santana, M. B. Cannell, S. A. McCune, R. A. Altschuld, és W. J. Lederer. 1997. Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science*. 276:800-6.

Gordienko, D. V., A. V. Zholos, és T. B. Bolton. 1999. Membrane ion channels as physiological targets for local Ca^{2+} signalling. *J. Microsc.* 196:305-16.

Gray, P., és S. K. Scott. 1994. Chemical oscillations and instabilities. Clarendon, Oxford.

Grynkiewicz, G., M. Poenie, és R. Y. Tsien. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260:3440-50.

Hajnóczky, Gy., Gy. Csordás, M. Madesh, és P. Pacher. 2000. Control of apoptosis by IP_3 and ryanodine receptor driven calcium signals. *Cell Calcium*. 28:349-63.

Hajnóczky, Gy., L. D. Robb-Gaspers, M. B. Seitz, és A. P. Thomas. 1995. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell*. 82:415-24.

Hajnóczky, Gy., és A. P. Thomas. 1994. The inositol trisphosphate calcium

- channel is inactivated by inositol trisphosphate. *Nature*. 370:474-7.
- Hajnóczky, Gy., és A. P. Thomas. 1997. Minimal requirements for calcium oscillations driven by the IP₃ receptor. *EMBO J*. 16:3533-43.
- Hansen, M., S. Boitano, E. R. Dirksen, és M. J. Sanderson. 1995. A role for phospholipase C activity but not ryanodine receptors in the initiation and propagation of intercellular calcium waves. *J. Cell Sci*. 108:2583-90.
- Hanson, P. I., T. Meyer, L. Stryer, és H. Schulman. 1994. Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals. *Neuron*. 12:943-56.
- Harkins, A. B., N. Kurebayashi, és S. M. Baylor. 1993. Resting myoplasmic free calcium in frog skeletal muscle fibers estimated with fluo-3. *Biophys. J*. 65:865-81.
- Harootunian, A. T., J. P. Kao, S. Paranjape, és R. Y. Tsien. 1991. Generation of calcium oscillations in fibroblasts by positive feedback between calcium and IP₃. *Science*. 251:75-8.
- Hartmann, J. 1998. Calcium és exocytosis. *In* Integrative aspects of calcium signalling. A. Verkhratsky és E. C. Toescu, szerk. Plenum Press, New York London.
- Hirose, K., S. Kadowaki, M. Tanabe, H. Takeshima, és M. Iino. 1999. Spatiotemporal dynamics of inositol 1,4,5-trisphosphate that underlies complex Ca²⁺ mobilization patterns. *Science*. 284:1527-30.
- Iino, M. 1990. Biphasic Ca²⁺ dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in smooth muscle cells of the guinea pig *taenia caeci*. *J. Gen. Physiol*. 95:1103-22.
- Ilyin, V., és I. Parker. 1994. Role of cytosolic Ca²⁺ in inhibition of InsP₃-evoked Ca²⁺ release in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 477:503-9.
- Jaconi, M., J. Pyle, R. Bortolon, J. Ou, és D. Clapham. 1997. Calcium release and influx colocalize to the endoplasmic reticulum. *Curr. Biol*. 7:599-602.
- Jafri, M. S., és J. Keizer. 1995. On the roles of Ca²⁺ diffusion, Ca²⁺ buffers, and the endoplasmic reticulum in IP₃-induced Ca²⁺ waves. *Biophys. J*. 69:2139-53.
- Jouaville, L. S., F. Ichas, E. L. Holmuhamedov, P. Camacho, és J. D. Lechleiter. 1995. Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature*. 377:438-441.

- Kasai, H., és O. H. Petersen. 1994. Spatial dynamics of second messengers: IP₃ and cAMP as long-range and associative messengers. *Trends Neurosci.* 17:95-101.
- Kass, G. E., és S. Orrenius. 1999. Calcium signaling and cytotoxicity. *Environ. Health. Perspect.* 107 Suppl 1:25-35.
- Keizer, J., és G. W. De Young. 1994. Simplification of a realistic model of IP₃-induced Ca²⁺ oscillations. *J. theor. Biol.* 166:431-442.
- Kim, Y. K., H. J. Cho, W. T. Kim, és K. S. Cho. 1997. Caffeine- and inositol 1,4,5-trisphosphate-induced ⁴⁵Ca²⁺ releases in the microsomes of tracheal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230:247-250.
- King, B. F., A. Townsend-Nicholson, és G. Burnstock. 1998. Metabotropic receptors for ATP and UTP: exploring the correspondence between native and recombinant nucleotide receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 19:506-14.
- Koslowsky, T., T. Hug, D. Ecke, P. Klein, R. Greger, D. C. Gruenert, és K. Kunzelmann. 1994. Ca²⁺- és swelling-induced activation of ion conductances in bronchial epithelial cells. *Pflügers Arch.* 428:597-603.
- Lau, P. M., R. S. Zucker, és D. Bentley. 1999. Induction of filopodia by direct local elevation of intracellular calcium ion concentration. *J. Cell Biol.* 145:1265-75.
- Lechleiter, J. D., L. M. John, és P. Camacho. 1998. Ca²⁺ wave dispersion and spiral wave entrainment in *Xenopus laevis* oocytes overexpressing Ca²⁺ ATPases. *Biophys. Chem.* 72:123-9.
- Li, W., J. Llopis, M. Whitney, G. Zlokarnik, és R. Y. Tsien. 1998. Cell-permeant caged InsP₃ ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimize gene expression. *Nature.* 392:936-41.
- Li, Y. X., J. Rinzel, J. Keizer, és S. S. Stojilkovic. 1994. Calcium oscillations in pituitary gonadotrophs: comparison of experiment and theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:58-62.
- Lloyd, D., és E. L. Rossi. 1993. Biological rhythms as organization and information. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 68:563-77.
- Lytton, J., M. Westlin, és M. R. Hanley. 1991. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* 266:17067-71.
- Marchant, J., N. Callamaras, és I. Parker. 1999. Initiation of IP₃-mediated Ca²⁺ waves in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 18:5285-99.
- Marchant, J. S., és I. Parker. 2001. Role of elementary Ca²⁺ puffs in

- generating repetitive Ca^{2+} oscillations. *EMBO J.* 20:65-76.
- Marchant, J. S., és C. W. Taylor. 1997. Cooperative activation of IP_3 receptors by sequential binding of IP_3 and Ca^{2+} safeguards against spontaneous activity. *Curr. Biol.* 7:510-8.
- Meldolesi, J., és T. Pozzan. 1998. The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem. Sci.* 23:10-4.
- Meyer, T., és L. Stryer. 1988. Molecular model for receptor-stimulated calcium spiking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 85:5051-5.
- Meyer, T., és L. Stryer. 1991. Calcium spiking. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20:153-74.
- Minta, A., J. P. Kao, és R. Y. Tsien. 1989. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* 264:8171-8.
- Misquitta, C. M., D. P. Mack, és A. K. Grover. 1999. Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} (SERCA)-pumps: link to heart beats és calcium waves. *Cell Calcium.* 25:277-90.
- Missiaen, L., H. De Smedt, J. B. Pary, M. Oike, és R. Casteels. 1994. Kinetics of empty store-activated Ca^{2+} influx in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 269:5817-23.
- Mogami, H., A. V. Tepikin, és O. H. Petersen. 1998. Termination of cytosolic Ca^{2+} signals: Ca^{2+} reuptake into intracellular stores is regulated by the free Ca^{2+} concentration in the store lumen. *EMBO J.* 17:435-42.
- Morgan, A. J., és R. Jacob. 1998. Differential modulation of the phases of a Ca^{2+} spike by the store Ca^{2+} -ATPase in human umbilical vein endothelial cells. *J. Physiol. (Lond.)* 513:83-101.
- Morley, P., B. R. Chakravarthy, G. A. Mealing, B. K. Tsang, és J. F. Whitfield. 1996. Role of protein kinase C in the regulation of ATP-triggered intracellular Ca^{2+} oscillations in chicken granulosa cells. *Eur. J. Endocrinol.* 134:743-50.
- Mouillac, B., M. N. Balestre, és G. Guillon. 1990. Positive feedback regulation of phospholipase C by vasopressin-induced calcium mobilization in WRK1 cells. *Cell. Signal.* 2:497-507.
- Murray, J. D. 1989. *Mathematical Biology.* Springer.
- Nicotera, P., és S. Orrenius. 1998. The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium.* 23:173-80.

- Nishizuka, Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9:484-96.
- Oancea, E., és T. Meyer. 1996. Reversible desensitization of inositol trisphosphate-induced calcium release provides a mechanism for repetitive calcium spikes. *J. Biol. Chem.* 271:17253-60.
- Oancea, E., és T. Meyer. 1998. Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell.* 95:307-18.
- O'Doherty, J., S. J. Youmans, W. M. Armstrong, és R. J. Stark. 1980. Calcium regulation during stimulus-secretion coupling: continuous measurement of intracellular calcium activities. *Science.* 209:510-3.
- Osipchuk, Y., és M. Cahalan. 1992. Cell-to-cell spread of calcium signals mediated by ATP receptors in mast cells. *Nature.* 359:241-4.
- Parys, J. B., L. Missiaen, H. D. Smedt, I. Sienaert, és R. Casteels. 1996. Mechanisms responsible for quantal Ca^{2+} release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores. *Pflügers Arch.* 432:359-67.
- Patel, S., G. C. Churchill, és A. Galione. 2001. Coordination of Ca^{2+} signalling by NAADP. *Trends Biochem. Sci.* 26:482-9.
- Petersen, C. C., O. H. Petersen, és M. J. Berridge. 1993. The role of endoplasmic reticulum calcium pumps during cytosolic calcium spiking in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 268:22262-4.
- Porter, V. A., A. D. Bonev, H. J. Knot, T. J. Heppner, A. S. Stevenson, T. Kleppisch, W. J. Lederer, és M. T. Nelson. 1998. Frequency modulation of Ca^{2+} sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides. *Am. J. Physiol.* 274:C1346-55.
- Pozzan, T., R. Rizzuto, P. Volpe, és J. Meldolesi. 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.* 74:595-636.
- Rapp, P. E. 1987. Why are so many biological systems periodic? *Prog. Neurobiol.* 29: 261-73.
- Rapp, P. E., A. I. Mees, és C. T. Sparrow. 1981. Frequency encoded biochemical regulation is more accurate than amplitude dependent control. *J. theor. Biol.* 90:531-44.
- Rasmussen, H. 1970. Cell communication, calcium ion, and cyclic adenosine monophosphate. *Science.* 170:404-12.
- Rebecchi, M. J., és S. N. Pentylala. 2000. Structure, function, and control of

- phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* 80:1291-1335.
- Ribeiro, C. M. P., és J. W. Putney. 1996. Differential effects of protein kinase C activation on calcium storage és capacitative calcium entry in NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 271:21522-8.
- Rizzuto, R., M. Brini, M. Murgia, és T. Pozzan. 1993. Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science.* 262:744-7.
- Roberts, W. M. 1993. Spatial calcium buffering in saccular hair cells. *Nature.* 363:74-6.
- Rooney, T. A., E. J. Sass, és A. P. Thomas. 1989. Characterization of cytosolic calcium oscillations induced by phenylephrine és vasopressin in single fura-2-loaded hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 264:17131-41.
- Rossi, F. M., és J. P. Y. Kao. 1997. Nmoc-DBHQ, a new caged molecule for modulating sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase activity with light flashes. *J. Biol. Chem.* 272:3266-71.
- Sagi-Eisenberg, R. 1989. GTP-binding proteins as possible targets for protein kinase C action. *Trends Biochem. Sci.* 14:355-7.
- Sauvé, R., A. Diarra, M. Chahine, C. Simoneau, N. Morier, és G. Roy. 1991. Ca^{2+} oscillations induced by histamine H1 receptor stimulation in HeLa cells: Fura-2 and patch clamp analysis. *Cell Calcium.* 12:165-76.
- Shuttleworth, T. J. 1997. Intracellular Ca^{2+} signalling in secretory cells. *J. Exp. Biol.* 200:303-14.
- Sienaert, I., S. Huyghe, J. B. Parys, M. Malfait, K. Kunzelmann, H. De Smedt, G. M. Verleden, és L. Missiaen. 1998. ATP-induced Ca^{2+} signals in bronchial epithelial cells. *Pflügers Arch.* 436:40-8.
- Smaili, S. S., K. A. Stellato, P. Burnett, A. P. Thomas, és L. D. Gaspers. 2001. Cyclosporin A inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca^{2+} signals by enhancing Ca^{2+} uptake into the endoplasmic reticulum and mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276:23329-40.
- Stricker, S. A. 1999. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev. Biol.* 211:157-76.
- Sugita, K., A. C. Mork, G. H. Zhang, és J. R. Martinez. 1999. Modulation of Ca^{2+} mobilization by protein kinase C in the submandibular duct cell line A253. *Mol. Cell. Biochem.* 198:39-46.
- Swanson, C. A., A. P. Arkin, és J. Ross. 1997. An endogenous calcium

oscillator may control early embryonic division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94:1194-9.

Takahashi, A., P. Camacho, J. D. Lechleiter, és B. Herman. 1999. Measurement of intracellular calcium. *Physiol. Rev.* 79:1089-125.

Tang, Y., és H. G. Othmer. 1995. Frequency encoding in excitable systems with applications to calcium oscillations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92:7869-73.

Taylor, C. W. 1998. Inositol trisphosphate receptors: Ca^{2+} -modulated intracellular Ca^{2+} channels. *Biochim. Biophys. Acta.* 1436:19-33.

Taylor, C. W., és D. Traynor. 1995. Calcium and inositol trisphosphate receptors. *J. Membr. Biol.* 145:109-18.

Thomas, A. P., G. S. Bird, Gy. Hajnóczky, L. D. Robb-Gaspers, és J. W. Putney, Jr. 1996. Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J.* 10:1505-17.

Thorn, P. 1996. Spatial domains of Ca^{2+} signaling in secretory epithelial cells. *Cell Calcium.* 20:203-14.

Toescu, E. C. 1995. Temporal és spatial heterogeneities of Ca^{2+} signaling: mechanisms and physiological roles. *Am. J. Physiol.* 269:G173-85.

Tsien, R. W., és R. Y. Tsien. 1990. Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6:715-60.

Tsien, R. Y. 1980. New calcium indicators és buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry.* 19:2396-404.

Tsien, R. Y., T. Pozzan, és T. J. Rink. 1982. T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca^{2+} and membrane potential in lymphocytes. *Nature.* 295:68-71.

Tyson, J. J., B. Novák, G. M. Odell, K. Chen, és C. D. Thron. 1996. Chemical kinetic theory: understanding cell-cycle regulation. *Trends Biochem. Sci.* 21:89-96.

Ueda, S., S. Oiki, és Y. Okada. 1983. Cyclic changes in cytoplasmic free Ca^{2+} during membrane potential oscillations in fibroblasts. *Biomed. Res.* 4:231-234.

Valant, P. A., P. N. Adjei, és D. H. Haynes. 1992. Rapid Ca^{2+} extrusion via the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger of the human platelet. *J. Membr. Biol.* 130:63-82.

Visegrády, A., L. Grama, B. Somogyi, és Gy. Lustyik. 2000. Characterization

of intracellular calcium oscillations induced by extracellular nucleotides in HEp-2 cells. *J. Photochem. Photobiol B: Biol.* 58:80-6.

Visegrády, A., Zs. Lakos, L. Czimbalek, B. Somogyi. 2001 Stimulus-dependent control of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} oscillation frequency by the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Biophys. J.* 81:1398-405.

Wakui, M., Y. V. Osipchuk, és O. H. Petersen. 1990. Receptor-activated cytoplasmic Ca^{2+} spiking mediated by inositol trisphosphate is due to Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *Cell.* 63:1025-32.

Wakui, M., B. V. Potter, és O. H. Petersen. 1989. Pulsatile intracellular calcium release does not depend on fluctuations in inositol trisphosphate concentration. *Nature.* 339:317-20.

Wang, S. S., A. A. Alousi, és S. H. Thompson. 1995. The lifetime of inositol 1,4,5-trisphosphate in single cells. *J. Gen. Physiol.* 105:149-71.

Whitfield, J. F., és T. Youdale. 1965. Synchronisation of cell division in suspension cultures of L strain mouse cells. *Exp. Cell. Res.* 38:208-210.

Wiesner, T. F., B. C. Berk, és R. M. Nerem. 1996. A mathematical model of cytosolic calcium dynamics in human umbilical vein endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 270:C1556-69.

Williamson, J. R., R. H. Cooper, és J. B. Hoek. 1981. Role of calcium in the hormonal regulation of liver metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 639:243-95.

Witkowski, F. X., L. J. Leon, P. A. Penkoske, W. R. Giles, M. L. Spano, W. L. Ditto, és A. T. Winfree. 1998. Spatiotemporal evolution of ventricular fibrillation. *Nature.* 392:78-82.

Woodruff, M. L., V. V. Chaban, C. M. Worley, és E. R. Dirksen. 1999. PKC role in mechanically induced Ca^{2+} waves and ATP-induced Ca^{2+} oscillations in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 276:L669-78.

Woods, N. M., K. S. Cuthbertson, és P. H. Cobbold. 1986. Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature.* 319:600-2.

Yamamoto-Hino, M., A. Miyawaki, A. Segawa, E. Adachi, S. Yamashina, T. Fujimoto, T. Sugiyama, T. Furuichi, M. Hasegawa, és K. Mikoshiba. 1998. Apical vesicles bearing inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the Ca^{2+} initiation site of ductal epithelium of submandibular gland. *J. Cell Biol.* 141:135-42.

Yao, Y., és I. Parker. 1992. Potentiation of inositol trisphosphate-induced Ca^{2+} mobilization in *Xenopus oocytes* by cytosolic Ca^{2+} . *J. Physiol. (Lond.)* 458:319-38.

Zhou, Z., és E. Neher. 1993. Mobile és immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Physiol. (Lond.)* 469:245-73.

Zsabotyinszkij, A. M. 1964. Periodic processes of the oxidation of malonic acid in solution (Study of the kinetics of Belousov's reaction). *Biofizika.* 9:306-311.