
PhD értekezés tézisei

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

Visegrády András

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézete**

2002.

PhD értekezés tézisei

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

Visegrády András

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

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézete

2002.

1. Bevezetés

A magasabbrendű élőlényeknek életbenmaradásukhoz az egymástól fizikailag elkülönült sejteik működését össze kell hangolnunk. 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, ami 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. Ahhoz, hogy a kalcium önmagában több folyamatot tudjon egymástól függetlenül szabályozni, az szükséges, hogy az egyes specifikus jelek információját ne pusztán a kalciumszint amplitúdója, hanem egyéb tulajdonsága is kódolja. Ezt rendkívül finoman szabályozott jelátviteli út és transzportmechanizmus teszi lehetővé, amelynek a felderítése az elmúlt évtizedekben kezdődött, és az egyre bonyolultabb molekuláris folyamatok feltárása alapján feltételezhetően még sokáig eltart.

A kalcium jelátvitel legerdekesebb jelenségei közé tartoznak a kémiai inger hatására fellépő periodikus kalciumszint-változások, az intracelluláris kalciumoszillációk. Noha számos sejtben megfigyeltek ilyen jelenséget, molekuláris hátterük és biológiai szerepük még nem teljesen tisztázott.

Légúti epitélisejtekben citoplazmatikus kalcium szabályozza a csilló aktivitást és ionszekréciót. A szabályozásban szerepet játszhatnak a

sejten kívüli térben megjelenő nukleotidok is. Kimutatták, hogy a csilló aktivizást nem pusztán a sejten belüli kalciumszint, hanem annak periodikus változása szabályozza. A humán légúti epitelsejteken nukleotidok hatására kialakuló kalciumváltasz kineitikája eddig nem volt megfelelően jellemzett és szintén hiányosak az ismeretek az ezt szabályzó biokémiai folyamatokról.

A csilló aktivitás mellett még számos sejtolyamatot szabályoznak sejten belüli kalciumoszillációk, s számos esetben a sejt számára az információt nem a válasz amplitúdója, hanem annak frekvenciája hordozza. Még nem ismertek teljes mértékben az elektromosan nem ingerelhető sejteken fellépő kalciumoszillációk periódusidejét meghatározó folyamatok. Ebből a szempontból rendkívül érdekesek azok a vizsgálatok, amelyek során az endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz aktivitásának a hatását vizsgálták az oszcillációk frekvenciájára. Érdekes módon azonban a kísérletek ellentmondó eredményekre vezettek: egyes sejteken a Ca^{2+} -pumpa gátlása, másokban túlexpresszállása okozott frekvencianövekedést. Az ellentmondás oka egyelőre nem tisztázott, s az várhatóan az oszcillációk frekvenciáját szabályozó folyamatokra is információt adhat.

2. Célkitűzés

Munkám során a kémiai inger kiváltotta kalciumfelszabadulás szabályozásáról és az intracelluláris kalciumoszillációk mechanizmusáról szerettem volna újabb részleteket kideríteni.

- Jellemezni kívántam a HEP-2 humán légúti epitél sejtvonalban extracelluláris nukleotidok által kiváltott kalciumfelszabadulás időbeli lefutását.

- Tisztázni kívántam a kalciumfelszabadulás molekuláris hátterét, így a kalciumionok forrását és kalciumfelszabadulást szabályozó folyamatokat.

- Már jellemzett sejtípusokban kísérletek és matematikai modellezés alkalmazásával magyarázatot kerestem a SERCA aktivitásának a kalciumoszillációk frekvenciájára kifejtett hatására, s ezáltal információt kívántam szerezni a kalciumoszillációk frekvenciáját meghatározó folyamatokról.

3. Vizsgálati módszerek

3.1. Fluoreszcens kalciumszint-meghatározás humán karcinóma sejtekben

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.

Az intracelluláris kalciumszint változását Fluo-3 kalciumindikátorral követtük. A jelölés előtt a tenyésztőmédiumot a következő összetételű oldatra cseréltük (összetétel mM-ban): NaCl 145; KCl 5; Na_2HPO_4 1; MgSO_4 0,5; CaCl_2 1; glükóz 5; HEPES 10 (pH=7,2), s a további lépéseket 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 vizsgáltuk.

A mérést Bio-Rad MRC 1024ES lézer pásztázó konfokális feltétellel (Bio-Rad, Hertfordshire, Nagy-Britannia) ellátott Nikon TE 300 invertált mikroszkópon végeztük. A mintát argon-ion lézer 488 nm hullámhosszú fényével gerjesztettük, a fluoreszcenciát pedig 515 nm felett detektáltuk. A digitális képen kijelölt, egyes sejteket tartalmazó területekről az átlagos fluoreszcencia intenzitást Time Course szoftverrel (Bio-Rad, Hertfordshire, Nagy-Britannia)

határoztuk meg. A kalciumtranziensek nagy időfelbontású egy dimenziós vizsgálatát vonalpásztázással végeztük el.

3.2. Kalciumoszillációk matematikai modellezése

A SERCA aktivitás és a frekvencia összefüggését öt matematikai modellben vizsgáltuk meg numerikus számítással. Az egyenletek közelítő megoldását MATLAB matematikai szoftvercsomag segítségével számítottuk ki. A De Young-Keizer modell esetében a leegyszerűsített háromváltozós formát használtuk.

4. Eredmények és következtetések

4.1. Nukleotid-aktivált kalcium jelátvitel HEP-2 sejtekben

Húmán 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.

Periodikus 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. Megállapítható továbbá, hogy HEP-2 sejtekben nem az ionszatornaként működő P2X, hanem feltehetően a foszfoinozitol jelátvitelhez kapcsolódó P2Y purinoceptorok aktiválódnak.

PMA forbol észter gátló hatása alapján úgy tűnik, hogy a folyamat szabályozásában a protein kináz C-nek is szerepe lehet (bár folytonos farmakológiai aktiválásának eredménye eltérhet az átmeneti fiziológiai aktiváció hatásától). Eredményeink szerint a protein kináz C nem a kalciumraktárak kiürítésével, hanem feltételezhetően a jelátviteli út gátlásával fejthet ki hatást.

A nukleotidokkal ingerelt sejtekben állandó sebességgel és profillal terjedő intracelluláris kalciumhullámokat figyeltünk meg, ami 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.

4.2. A SERCA aktivitásának hatása az oszcillációk frekvenciájára

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

A modellen és annak leegyszerűsített reakciósémáján végzett számításaink alapján erre a következő magyarázatot javasoljuk: a Ca^{2+} -ATPáz különböző, az oszcillációkban fontos kalciumfüggő folyamatok időtartamát ellentétesen befolyásolja. Jelentősen eltérő stimulus, és így frekvenciátartományban ezen folyamatok közül más és más válhat dominánssá a periódusidő meghatározásában, így a SERCA aktivitás megváltoztatása a periódusidőre a stimulustól függő hatással bírhat. Gyenge ingerek, és így ritka oszcillációk esetében a SERCA részleges gátlása az aktiváció felgyorsításával frekvencianövekedést okoz, gyors oszcillációk esetében viszont az inaktiváció időtartamát elnyújtó hatása dominál, ami frekvenciacsökkenéshez vezet.

Hisztaminnal illetve ATP-vel ingerelt HeLa és HEP-2 sejtvonalakon thapsigargin kezeléssel végzett kísérleteink igazolták várakozásainkat. Ritka oszcillációk esetében a SERCA részleges gátlásával frekvencianövekedést értünk el, gyakori, oszcillációk esetében pedig frekvenciacsökkenést tapasztaltunk. Köztes, 25 s körüli periódusidejű oszcillációknál thapsigargin hatására a periódusidőben nem tapasztaltunk szignifikáns változást. Elképzelésünk jól leírja az irodalomban közölt látszólag ellentmondó adatokat is.

Végül megfigyeléseinknek egy további lehetséges vonzatát érdemes megjegyezni. Számításaink szerint a pumpa aktivitás (és mennyiség) növelésével tágul a fellépő oszcillációk frekvenciatartományra, 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 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 jelzőrendszerre olyan optimum környéken működik, amelyben a leggazdaságosabb az információátalakítás.

5. Az eredmények jelentősége

Eredményeink tudományos jelentőségét a következőkben látom:

1. Humán légúti epitél sejtekben először írtunk le nukleotid-indukált kalciumoszcillációkat 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 kalciumoszcillációkkal válaszoló légúti epitélsejtekben lokális erősítési folyamatnak is szerepe van a kalciumfelszabadulásban.

3. Sikertült 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 – elérő erősségű inger érte.

4. A fenti jelenségnek az lehet a molekuláris háttere, hogy az oszcillációk periódusidejét magas, illetve alacsony frekvenciánál elérő folyamatos időtartama szabja meg. Ez a feltételezés a távoli jövőben olyan esetekben nyújthat segítséget gyógyszeres kezeléshez, amelyekben a kalciumoszcillációk frekvenciájának sérült

szabályozása okoz abnormális sejtműködést.

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

Az értékezés 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

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

Alternative Reaction Channels és Carbene Intermediates in the Ce^{4+} -Malonic Acid és Ce^{4+} -Bromomalonic Acid Reactions. 1. CO_2 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 Ca^{2+} oscillation frequency by the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -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 Ca^{2+} -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)