Instytut Podstawowych Problemów Techniki
Polskiej Akademii Nauk
Pracownia Modelowania w Biologii i Medycynie

Michał Dyzma

Modelowanie oscylacji stężeń jonów wapniowych w komórkach eukariotycznych z uwzględnieniem obszarów bezpośredniego kontaktu pomiędzy mitochondriami a retikulum endoplazmatycznym.

Pod opieką: dr hab. Bogdana Kaźmierczaka

Grudzień 2014

W pierwszej kolejności pragnę podziękować **dr. hab. Bogdanowi Kaźmierczakowi** za wszystkie lata współpracy, które okazały się być dla mnie czasem wielu wyzwań i rozwoju osobistego. Dziękuję, że zawsze mogłem liczyć na zrozumienie, rady i wsparcie mimo licznych zakrętów, które pojawiały się w trakcie realizacji powierzonych mi zadań. Dziękuję za wprowadzenie mnie w tajniki biomatematyki.

Szczególne podziękowania kieruję do **dra Piotra Szopy**, bez którego pomocy niniejsza praca nigdy by nie powstała. Jego zaangażowanie i poświęcony czas pozwoliły mi ukończyć doktorat.

Bardzo dziękuję mojemu koledze **mgr. Sławomirowi Białeckiemu** i mojej żonie **Alicji** za przeczytanie pracy, wszystkie uwagi i nieustanną pomoc przy realizacji projektu doktorskiego.

Dziękuję również **prof. dr. hab. Tomaszowi Lipniackiemu** za wiarę w moje możliwości i przyjęcie do grupy „zwykłego biologa".

Dziękuję koleżankom i kolegom z **Pracowni Modelowania w Biologii i Medycynie IPPT PAN** za cztery lata wspólnej pracy i dyskusji przy śniadaniu. Byliście dla mnie wsparciem, zawsze służyliście dobrą radą i pomocą.

Pracę dedykuję mojej żonie Alicji w podziękowaniu za bycie zawsze obok mnie, za pomoc w realizacji moich marzeń i ambicji, za wsparcie i miłość w najcięższych chwilach.

Spis treści

Podziękowania i

Dedykacja ii

Spis treści iii

Spis rysunków v

Spis tablic vii

Lista symboli ix

Streszczenie xi

1 Biologia jonów wapnia 1
- 1.1 Mechanizmy transportu drobnych cząsteczek w komórce . . . 1
- 1.2 Sygnałosom wapniowy . . . 2
- 1.3 Rola jonów wapnia w komórce . . . 5
  - 1.3.1 Sprzężenie mechano-chemiczne (skurcz mięśni) . . . 5
  - 1.3.2 Regulacja procesów biochemicznych . . . 7
  - 1.3.3 Regulacja sygnałów elektrycznych . . . 9
- 1.4 Rola Ca^{2+} w procesie apoptozy . . . 9
- 1.5 Rola Ca^{2+} w zapłodnieniu . . . 20
- 1.6 Homeostaza wapniowa w komórce . . . 22
  - 1.6.1 Bufory i sensory wapniowe . . . 26
    - Motywy EF . . . 26
    - Motywy C2 . . . 30
  - 1.6.2 Przepływy wapnia z i do komórki . . . 30
    - Kanały bramkowane napięciem (VGCC) . . . 32
    - Kanały bramkowane ligandem (LGCC) . . . 35
    - Pompa plazmatyczna (PMCA) . . . 38
    - Wymiennik Na^+/Ca^{2+} (NCX) . . . 38
  - 1.6.3 Przepływy wapnia w magazynach ER . . . 40
    - Receptor rianodynowy (RyR) . . . 41
    - Receptor IP_3 (IP_3R) . . . 43
    - Pompa sarko-endoplazmatyczna (SERCA) . . . 44
  - 1.6.4 Przepływy wapnia w magazynach mitochondrialnych . . . 45
    - Mitochondrialny uniporter . . . 46
    - Mitochondrialny wymiennik Na^+/Ca^{2+} (mNCX) . . . 51
    - Megakanał (PTP) . . . 51
- 1.7 Kompleksy błonowe . . . 52
  - 1.7.1 MAM . . . 53
  - 1.7.2 PAM . . . 61

2 Modelowanie deterministyczne 65
- 2.1 Modelowanie przepływów przez pompy . . . 65

2.2 Modelowanie przepływów przez kanały i wymienniki . . . 66
2.3 Szczegółowy model uniportera mitochondrialnego . . . 68
2.4 Bufory wapniowe . . . 69
2.4.1 Modelowanie kompleksów błonowych . . . 70
2.5 Oscylacje wapniowe . . . 71

3 Modelowanie przestrzenne 77
3.1 Równania reakcji-dyfuzji w modelach ciągłych . . . 77
3.2 Fale biegnące stężenia wapnia. Sprzężenia mechanochemiczne . . . 83
Analiza równania mechanicznego . . . 87
Fale biegnące . . . 88
Lokalne przemieszczenia ośrodka . . . 91
Mechanochemiczne fale biegnące z więzami mechanicznymi . . . 93

4 Modele 95
4.1 Opis modeli całokomórkowych . . . 95
4.1.1 Model #1 . . . 98
4.1.2 Model #2 . . . 102
4.2 Parametry i skalowanie . . . 104

5 Wyniki i ich analiza 107
5.1 Istnienie rozwiązań . . . 107
5.2 Analiza Modelu #1 . . . 109
5.2.1 Analiza przebiegów czasowych . . . 110
5.2.2 Wpływ k_{MAM} na charakter oscylacji stężenia jonów wapnia . . . 115
5.2.3 Wpływ k_{MAM} na poziom stężeń jonów wapnia . . . 120
5.2.4 Punkty stacjonarne . . . 121
5.2.5 Podsumowanie dotyczące Modelu #1 . . . 124
5.3 Analiza Modelu #2 . . . 125
5.3.1 Analiza przebiegów czasowych . . . 126
Przepływy domitochondrialne . . . 128
5.3.2 Wpływ k_{MAM} na stężenia jonów wapniowych, cykle graniczne i stany stacjonarne . . . 130
5.3.3 Wpływ współczynnika k_{MAM} na okres oscylacji . . . 132
5.3.4 Podsumowanie dotyczące Modelu #2 . . . 133
5.4 Scenariusz apoptozy . . . 134

6 Podsumowanie 137

Bibliografia 141

Dodatek A Białka zaangażowane w transport wapnia 169

Dodatek B Procentowy udział błon biologicznych w komórce 173

Spis rysunków

1.1 Różne rodzaje transportu w komórce. 1
1.2 Udział jonów Ca^{2+} w integracji szlaków sygnałowych 5
1.3 Transdukcja sygnału wapniowego 8
1.4 Kaskada aktywacji kaspaz 12
1.5 Struktura domeny BH4 13
1.6 Transport jonów Ca^{2+} pomiędzy ER i mitochondriami podczas apoptozy . 14
1.7 Mitochondrialna ścieżka apoptozy 15
1.8 Uproszczony schemat szlaków apoptotycznych 19
1.9 Fale wapniowe - zapłodnienie 21
1.10 Mechanizmy komórkowe zaangażowane w transport Ca^{2+} 25
1.11 Struktura motywu EF-hand 27
1.12 Struktura kalmoduliny 28
1.13 Drzewo filogenetyczne białek z rodziny EF-hand 28
1.14 Motyw C2 30
1.15 Struktura kanału VGCC 33
1.16 Struktura kanału P2X 37
1.17 Struktura kanału nAChR 37
1.18 Wymiennik NCX 39
1.19 Receptor rianodynowy - struktura 42
1.20 Mapa gęstości elektronowej receptora RyR1 42
1.21 Mapa gęstości elektronowej receptora IP_3R 43
1.22 Pompa wapniowa SERCA 44
1.23 Mitochondrium i ER - mikrografia 46
1.24 Mitochondrium i ER - mikrografia 47
1.25 Proponowany model kontroli uniportera 49
1.26 Oddziaływanie pomiędzy MICU1 i MICU2 50
1.27 Megakanał PTP 52
1.28 MAM - kompleks mitochondrialno-retikularny, schemat 54
1.29 Miejsca kontaktu mito-ER w blastomerach człowieka 55
1.30 Miejsca kontaktu mito-ER w komórce 56
1.31 MAM - mikrografia z tomografii elektronowej 59
1.32 MAM - kompleks mitochondrialno-retikularny, białka spinające 60
1.33 Struktury spinające kompleksy mitochondrialno-retikularne 61
1.34 PAM - kompleks białkowy 62

2.1 Rodzaje oscylacji wapniowych 72
2.2 Diagram prostych oscylacji 73
2.3 Oscylacje wapniowe w modelu Sneyda 74

3.1 Wykres autokatalitycznej funkcji źródłowej 84
3.2 Struktury geometryczne rozważane w pracy 87
3.3 Przykładowy profil fali biegnącej stężenia wapnia 89
3.4 Postaci funkcji $\tau(c)$ 90
3.5 Przemieszczenia w kierunku x 92
3.6 Przemieszczenia w kierunku z 93

4.1 Schematyczna reprezentacja modelu 99

5.1 Oscylacje wapniowe typu bursting w Modelu #1 110
5.2 Portret fazowy 3-D w Modelu #1- oscylacje bursting 111
5.3 Regularne oscylacje wapniowe w Modelu #1 112
5.4 Portret fazowy w Modelu #1 - oscylacje regularne 113
5.5 Analiza pojedynczego okresu w modelu #1 114
5.6 Oscylacje chaotyczne w Modelu #1 - portret fazowy 115
5.7 Rzut trajektorii rozwiązania periodycznego 115
5.8 Przekroje Poincarégo w Modelu #1 117
5.9 Jakościowa analiza rozwiązań Modelu #1 119
5.10 Zależność okresu oscylacji od parametrów k_{MAM} i K_4 120
5.11 Minimalne i maksymalne wartości Ca_{Mit} i Ca_{Cyt} 121
5.12 Zachowanie punktów stacjonarnych w Modelu #1 122
5.13 Punkty stacjonarne systemu w Modelu #1 123
5.14 Baseny przyciągania punktu P_1 w Modelu #1 124
5.15 Oscylacje wapniowe typu „bursting” w Modelu #2 127
5.16 Portret fazowy 3-D - oscylacje „bursting” w Modelu #2 127
5.17 Przebiegi czasowe, jeden okres w Modelu #2 129
5.18 Przepływy mitochondrialne w Modelu #2 130
5.19 Diagram bifurkacyjny dla Modelu #2 131
5.20 Portret fazowy 3-D oscylacji typu „bursting”w Modelu #2 132
5.21 Stabilne oscylacje jako funkcja parametrów k_{MAM} i $K_{4,8}$ 133

Spis tablic

1.1 Przykładowy sygnałosom . . . 3
1.2 Białka rodziny Bcl-2 . . . 17
1.3 Stężenie jonów w komórce . . . 22
1.4 Stężenie jonów wapnia w kompartmentach . . . 23
1.5 Bufory i sensory wapniowe . . . 29
1.6 Kanały bramkowane napięciem . . . 32
1.7 Podsumowanie właściwości VGCC . . . 34
1.8 Podział i struktura receptorów bramkowanych ligandem . . . 36
1.9 Najważniejsze białka tworzące kompleksy MAM. . . . 57

2.1 Uproszczona klasyfikacja modeli oscylacji wapniowych . . . 74

3.1 Współczynniki K, μ oraz τ . . . 87

4.1 Parametry użyte w Modelu #1 . . . 104
4.2 Parametry użyte w Modelu #2 . . . 105

5.1 Korelacja wymiaru atraktorów . . . 117

A.1 Białka sygnałosomu wapniowego w komórce . . . 169

B.1 Pole powierzchni organelli komórkowych . . . 173

Lista symboli

5-HT_3R	receptory serotoninowe (ang. ***5**-**h**ydroxy**t**ryptamine **r**eceptors*)
ADP	adenozyno-5'-difosforan
AIF	ang. ***a**poptosis **i**nducing **f**actor*
AKAP1	ang. ***A**-**k**inase **a**nchor **p**rotein **1***
AMPAR	ang. *α-**a**mino-3-hydroxy-5-**m**ethyl-4-isoxazole**p**ropionic **a**cid **r**eceptor*
Apaf1	czynnik aktywujący proteazy apoptotyczne (ang. ***a**poptotic **p**rotease **a**ctivating **f**actor 1*)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
Bad	ang. ***B**cl-2-**a**ssociated **d**eath promoter*
Bak	ang. ***B**cl-2 homologous **a**ntagonist **k**iller*
Bax	białka powiązane z Bcl-2 (ang. ***B**cl-2-**a**ssociated **X** protein*)
Bcl-X_L	ang. ***B**-**c**ell **l**ymphoma-e**x**tra **l**arge*
Bcl-2	ang. ***B**-**c**ell **l**eukemia/lymphoma-**2***
Bcl-2-L2	ang. *Bcl-2-like protein 2-**l**ike protein **2***
Bcl-X_S	ang. ***B**-**c**ell **l**ymphoma-e**x**tra **s**mall*
Bcl2A1	***Bcl2**-related protein **A1***
Bfl-1	ang. ***B**cl related **f**etal **l**iver homolog-**1***
BH	ang. ***B**cl-2 **h**omology region*
Bid	ang. ***B**cl2 **i**nteracting **p**rotein*
Bik	ang. ***B**cl-2-**i**nteracting **k**iller*
Bim	ang. ***B**cl-2-**i**nteracting **m**ediator of cell death*
BPR	obwodowy receptor benzodiazepiny (ang. ***b**enzodiazepine **p**eripheral **r**eceptor*)
CaBP	białka wiążące wapń *ang. **ca**lcium **b**inding **p**roteins*
CAD	deoksyrybonukleaza aktywowana przez kaspazę (ang. ***c**aspase **a**ctivated **d**eoxiribonuclease*)
CaM	kalmodulina
CCh	karbachol
CED-9	ang. ***ce**ll **d**eath protein 9*
CFP	niebieskie białko fluorescencyjne (ang. ***c**yan **f**luorescent **p**rotein*)
CICR	wypływ wapnia aktywowany wapniem (ang. ***c**alcium **i**nduced **c**alcium **r**elease*
DAG	diacyloglicerol
DFF40	czynnik fragmentacji DNA (ang. ***D**NA **f**ragmentation **f**actor 40*)
DISC	ang. ***d**eath **i**nducing **s**ignaling **c**omplex*
Diva	ang. ***D**eath **i**nducer binding to **v**Bcl-2 and **A**paf-1*
DR	receptory śmierci (ang. ***d**eath **r**eceptors*)
Egl-1	ang. ***Eg**g **l**aying abnormal-1*
GnRH	gonadoliberyna
IMM	wewnętrzna błona mitochondrium (ang. ***i**nner **m**itochondrial **m**embrane*)
IP_3	inozytolo 1,4,5-trifosforan
IP_3R	receptor inozytolo-1,4,5-trifosforanu

LGCC kanały wapniowe bramkowane ligandem (ang. ***l**igand **g**ated **c**alcium **c**hannels*)

LTP długotrwałe wzmocnie synaptyczne (ang. ***l**ong **t**erm **p**otentiation*)

MAM błony związane z mitochondriami (ang. ***m**itochondria **a**ssociated **m**embranes*)

Mcl-1 ***m**yeloid **c**ell **l**eukemia sequence **1***

MCU mitochondrialny uniporter wapniowy (ang. ***m**itochondrial **c**alcium **u**niporter*)

mRFP1 czerwone białko fluorescencyjne (ang. ***m**itochondrial **r**ed **f**luorescent **p**rotein 1*)

nAChR receptory niktotynowe typu N (ang. ***n**icotinic **a**cetyl**ch**oline **r**eceptors*)

NADP fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego

NCX wymiennik sodowo/wapniowy (ang. ***Na**/**Ca** e**x**changer*)

NKCX wymiennik sodowo/wapniowo-/potasowy (ang. ***Na**/**K**/**Ca** e**x**changer*)

NMDAR ang. ***N**-**m**ethyl-**D**-**a**spartate **r**eceptor*

NOS syntaza tlenku azotu (ang. ***n**itric **o**xide **s**ynthase*)

OMM zewnętrzna błona mitochondrium (ang. ***o**uter **m**itochondrial **m**embrane*)

PACS ang. ***p**hosphofurin **a**cidic **c**luster **s**orting protein*

PIP_2 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu

PKA kinaza białkowa typu A

PKC kinaza białkowa typu C

PLC fosfolipaza C

PMCA plazmatyczna Ca^{2+}-ATPaza (ang. ***p**lasma **m**embrane **c**alcium **A**TPaze*)

PTP ang. ***p**ermeability **t**ransition **p**ore*

RaM szybki mechanizm pobierani jonów wapnia (ang. **ra**pid **m**ode of Ca^{2+} uptake)

RER szorstka siateczka śródplazmatyczna (ang. **r**ough **e**ndoplazmic **r**eticulum)

ROCC kanały wapniowe aktywowane poprzez receptor (ang. ***r**eceptor **o**perated **c**alcium **c**hannels*)

ROS reaktywne formy tlenu (ang. ***r**eactive **o**xygene **s**pecies)*

RyR receptor rianodynowy

SERCA sarko(endo)plazmatyczna Ca^{2+}-ATPaza (ang. ***s**arco(**e**ndo)-**p**lasmatic **c**alcium **A**TPaze*)

SOCEC kanały pojemnościowego napływu jonów wapniowych (ang. ***s**tore-**o**perated **c**alcium **e**ntry **c**hannels*)

TNF czynnik martwicy nowotworu ang. ***t**umor **n**ecrosis **f**actor*

TRPC ang. ***t**ransient **r**eceptor **p**otential **c**hannel*

VDAC ang. ***v**oltage **d**ependent **a**nion **c**hannel*

VGCC kanały wapniowe bramkowane napięciem (ang. ***v**oltage **g**ated **c**alcium **c**hannels*)

Streszczenie

Modelowanie oscylacji stężeń jonów wapniowych w komórkach eukariotycznych z uwzględnieniem obszarów bezpośredniego kontaktu pomiędzy mitochondriami a retikulum endoplazmatycznym.

Przedmiotem pracy jest analiza wpływu obszarów bliskiego kontaktu pomiędzy retikulum endoplazmatycznym (ER) a mitochondriami na homeostazę wapniową w komórce. Obszary te odkryto już w latach 70-tych, jednak dopiero niedawno zostały intensywnie zbadane. Ponieważ znajdują się one na granicy mitochondria-retikulum, określa się je jako „mitochondria-associated ER membrane complexes", a w literaturze naukowej stosowana jest w stosunku do nich skrótowa nazwa MAM. Badania za pomocą mikroskopii elektronowej, FRET i metod genetycznych pozwoliły na dokładne określenie struktury fizycznej oraz zidentyfikowanie komponent tworzących MAM. Odległość między błonami odgraniczającymi w powyższym kompleksie waha się od 10 - 25 nm tworząc fizyczne połączenia przypominające synapsy, umożliwiające szybsze przekazywanie jonów wapnia z ER do mitochondriów i odwrotnie. Interfejs mitochondrialno-retikularny stabilizowany jest przez szereg protein, które w większości powiązane są z głównymi elementami przewodzącymi sygnał wapniowy w tych kompartmentach, tj. receptorem IP_3R, pompą wapniową SERCA oraz kanałem VDAC. Szacuje się, że w 80% przepływu jonów wapniowych pomiędzy mitochondrium a retikulum, odbywający się pośrednio przez cytozol, zachodzi poprzez obszary typu MAM. W Polsce badania nad strukturami MAM prowadzone są w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN przez Prof. Mariusza Więckowskiego z Pracowni Bioenergetyki i Błon Biologicznych.

Ze względu na wspomniana powyżej bezpośrednią bliskość retikulum endoplazmatycznego i mitochondriów, kompleksy MAM spełniają niezwykle ważną rolę w homeostazie i dynamice wapnia w komórce. Ułatwiony przepływ wapnia pomiędzy powyższymi kompartmentami komórkowymi może wpływać istotnie np. na oscylacje stężenia wolnych jonów wapnia w poszczególnych częściach komórki. Oscylacje takie są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórki. Odpowiedzialne są m.in. za szereg istotnych procesów fizjologicznych takich jak kontrola cyklu komórkowego, skurcz mięśni szkieletowych, wzmocnienie synaptyczne. Stabilne oscylacje wapniowe stanowią istotny czynnik będący częścią sieci sygnałowej, który sprawdza czy komórka jest w dobrej kondycji i utrzymujący ją przy życiu. Cykliczne wahanie poziomu wapnia w mitochondriach (stabilny cykl graniczny) powoduje aktywację dehydrogenaz poprzez allosteryczne związanie jonów Ca^{2+} i wzrost produkcji ATP. Zatem z jednej strony lokalne w czasie i przestrzeni zmiany stężenia wolnego wapnia cytozolicznego są jednym ze sposobów przenoszenia informacji w komórce i inicjacji szeregu ścieżek sygnałowych będących odpowiedzią na zmieniające się warunki zewnętrzne, z drugiej zaś zbyt wysokie stężenie wolnych jonów wapnia w cytozolu jest bardzo szkodliwe i może doprowadzić do śmierci komórki. (Wiadomo np., że wapń jest jednym z kilku czynników zapoczątkowujących apoptopzę – kontrolowaną śmierć komórki). W istocie, badanie wpływu kompleksów MAM na dynamikę wapnia w komórce należałoby przeprowadzić na gruncie

modelu przestrzennego opisywanego układem równań różniczkowych cząstkowych przy uwzględnieniu informacji dotyczących rozmieszczenia i rozmiarów zbiorników retikularnych i mitochondrialnych w komórce. Zadanie takie jest jednak bardzo skomplikowane, zarówno z teoretycznego, jak i numerycznego punktu widzenia. Co więcej, dla tego typu układów, ze skomplikowaną geometrią i olbrzymia ilością podobszarów i nieliniowymi przepływami miedzy nimi, bardzo rzadko daje się znaleźć (numerycznie) rozwiązanie opisujące oscylacje w czasie (i przestrzeni). W swoich rozważaniach zdecydowałem się zatem na pozostaniu w ramach tzw. modeli całokomórkowych („whole cell models"), które abstrahują od przestrzennego rozkładu retikulum i mitochondriów wewnątrz komórki i analizują jedynie zależność od czasu stężenia wolnego wapnia uśrednionych przestrzennie po odpowiedniej składowej kompartmentalnej (cytozolicznej, retikularnej i mitochondrialnej) przy założeniu dostatecznie szybkiej dyfuzji wapnia. W tym podejściu opis zmienności czasowej wapnia dany jest układem nieliniowych równań różniczkowych zwyczajnych. Ponieważ dokonujemy przestrzennego uśrednienia stężenia, uwzględnienia istnienia kompleksów MAM dokonujemy poprzez wprowadzenie dodatkowego bezpośredniego przepływu wapnia pomiędzy retikulum a mitochondriami. (W modelach całokomórkowych nie biorących pod uwagę istnienia obszarów MAM, przepływ pomiędzy tymi kompartymentami „odbywa się" pośrednio przez cytozol.).

Punktem wyjścia do budowy „nowego" modelu był model zaproponowanym przez Marhla i współpracowników z roku 2001. Jest to jeden z nielicznych modeli, który uwzględnia aktywny wpływ mitochondriów na dynamikę sygnału wapniowego w komórce i nie traktował ich jedynie jak „olbrzymich" cząsteczek buforujących (tzn. przyłączających jony wapnia). W „nowym" modelu uwzględniono również właściwości białka transportującego wapń do wnętrza mitochondrium – uniportera mitochondrialnego - który w warunkach ekspozycji na submilimolowe stężenie wapnia aktywuje tzw. szybki mechanizm pobierania jonów wapniowych RaM (ang. ***ra****pid uptake* ***m****ode*). Doświadczenia przeprowadzone przez Guntera i współpracowników oraz Vinogradova sugerują, że w tych warunkach mitochondria pobierają wapń znacznie wydajniej. Przepływ do mitochondriom składa się zatem z dwóch części. Pierwsza z nich uwzględnia wspomniany powyżej szybki mod RaMowy, druga opisuje prace uniportera mitochondrialnego w trybie standardowym.

Zaproponowany układ równań różniczkowych zwyczajnych przy dowolnych nieujemnych dodatnich danych początkowych posiada globalne w czasie rozwiązanie różniczkowalne o nieujemnych składowych. Ilościowa analiza układu układu mogła być jednak przeprowadzona tylko za pomocą symulacji numerycznych, w oparciu o procedury platformy MATLAB oraz programu MATCONT. Dla szerokiego zestawu parametrów charakteryzujących przepływy miedzykompartmentowe, rozwiązania układu maja charakter oscylacyjny. W ramach przedstawionego powyżej modelu zbadano wpływ parametru kMAM regulującego przepływ w kompleksach MAM na okres oscylacji, istnienie rozwiązań chaotycznych oraz baseny przyciągania rozwiązania okresowego (cyklu granicznego). Wyznaczono zestawy parametrów, dla których istnieją różne typy oscylacji wapniowych: regularne, seryjne („bursting") i chaotyczne. Okazało się, że wprowadzenie dodatkowego przepływu w kompleksach MAM sprawia, że system zachowuje się jak układ bistabilny, w którym współwystępują dwa atraktory: stabilny cykl graniczny oraz stabilny punkt stacjonarny. Dla dostatecznie dużych wartości kMAM, większość trajektorii układu znajduje się w basenie przyciągania wspomnianego stabilnego punktu stacjonarnego. Takie zachowanie się rozpatrywanego układu równań, może mieć ciekawą interpretację biologiczną. Stabilny punkt stacjonarny układu charakteryzuje się wysokim poziomem wapnia w mitochondriach. Jeśli zatem trajektoria układu znalazła się w basenie przyciągania tego punktu, może to oznaczać, że komórka weszła na ścieżkę

apoptotyczną. Akumulacja wapnia w mitochondriach i pęcznienie mitochondriów występuje bowiem w początkowej fazie apoptozy.

Słowa kluczowe: sygnalizacja wapniowa, retikulum endoplazmatyczne, mitochondria, transport Ca^{2+}, mikrodomeny, model trój-kompartmentowy, apoptoza

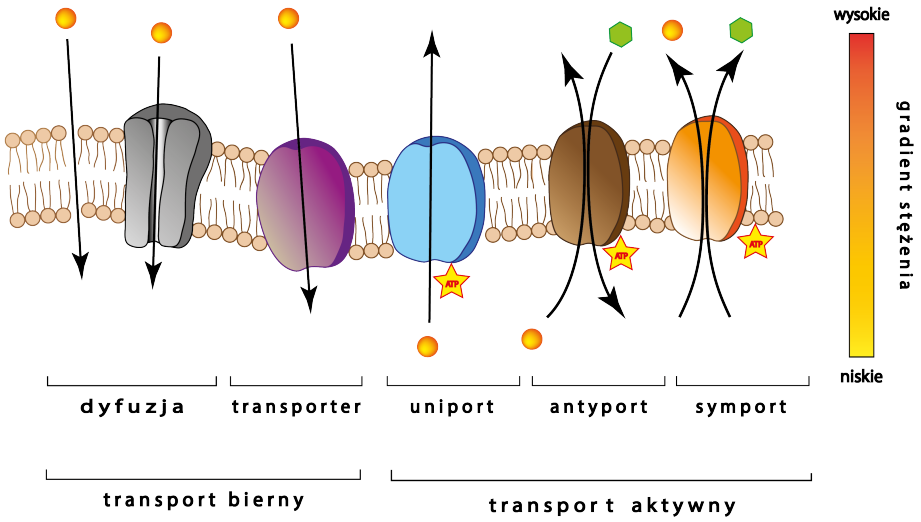
Rozdział 1

Biologia jonów wapnia

1.1 Mechanizmy transportu drobnych cząsteczek w komórce

Komórka przez całe życie wymienia ze środowiskiem wiele rodzajów związków odżywczych, jonów i substancji sygnałowych. Duże cząsteczki pochłaniane są przez komórkę na drodze endocytozy, czyli wpuklania się błon do wnętrza. Transport drobnych cząsteczek (do 10 kDa) opiera się natomiast na przenoszeniu ich przez błony białkowo-lipidowe na zasadzie **dyfuzji** lub z udziałem specyficznych transporterów. Prosta dyfuzja cząsteczek hydrofilowych przez błonę biologiczną jest procesem mało efektywnym i zależy od polarności danego związku. Dlatego transport przez błony biologiczne prawie zawsze wspomagany jest przez specyficzne białka, które mają zwiększyć efektywność i/lub kontrolować ściśle przepływ substancji z- i do- komórki (Ryc. 1.1).

Jeśli dwie substancje są przenoszone w tym samym kierunku, mówimy o **symporcie**, a jeśli w przeciwnych kierunkach — o **antyporcie**. Jeżeli transport cząsteczki w poprzek błony wymaga nakładu energii, mówimy o transporcie aktywnym (czynnym). Transport czynny odbywa się w kierunku wyższego stężenia i napięcia istniejącego w poprzek błony i w związku z tym białka realizujące ten rodzaj transportu



Rycina 1.1: Różne rodzaje transportu w komórce.

często nazywane są „pompami" - Ryc. 1.1. (W polskiej literaturze biologicznej termin „w kierunku wyższego stężenia" zastępowany jest zwrotem „wbrew gradientowi stężeń" [276].). Energia użyta do pracy pochodzi z rozkładu związków wysokoenergetycznych np. adenozyno-5'-trifosforanu (ATP). Białka przenoszące jedną substancję określa się jako uniporty lub **uniportery**. Szczególnymi przypadkami transportu aktywnego są kotransportery, które przenoszą jednocześnie dwie różne substancje (przez ten sam nośnik). Kotransportery wykorzystują różnicę gradientu jednej z transportowanych cząsteczek do przeniesienia innej. Gradient budowany jest z kolei przez inne białka przenoszące, tj. specyficzne pompy. Jeżeli substancje przenoszone są w tym samym kierunku mówimy o symporcie, natomiast w antyporcie każda z nich przenoszona jest w przeciwną stronę. Systemy antyportu nazywane są także mechanizmami wymiany. Wszystkie opisane powyżej mechanizmy wykorzystywane są do utrzymania homeostazy wapniowej w komórce [276].

W procesach transportu jonów wapnia między komórką a otaczającym środowiskiem uczestniczą trzy systemy przenoszenia jonów:

- kanały jonowe pracujące zgodnie z gradientem stężeń
- aktywne pompy jonowe Ca^{2+} ATP-aza i pompy protonowe (tzw. pierwszorzędowy system aktywnego transportu) przenoszące jony w kierunku wyższego stężenia jonów
- układ kotransporterów (tzw. drugorzędowy system transportu wykorzystujący różnicę gradientów jonów sodowych i protonów wytworzoną przez aktywne pompy jonowe) działający ze znacznie mniejszą wydajnością.

1.2 Sygnałosom wapniowy

Wapń jest jednym z 21 niezbędnych do życia pierwiastków. Całkowita ilość wapnia w organizmie człowieka wynosi około 1.5% masy ciała. Jest składnikiem kości (jako hydroksyapatyt) i stanowi istotny element wielu szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej [127]. Sygnalizacja wapniowa jest jedną z najważniejszych w komórce. Kontroluje moment zapłodnienia oraz szereg procesów związanych z różnicowaniem i morfogenezą. Z kolei w dojrzałych komórkach sygnalizacja wapniowa ma wpływ na aktywność metaboliczną, sekrecję, ruch, przekaźnictwo sygnałów elektrycznych oraz plastyczność synaptyczną (p. rozdz. 1.3). Ostatecznie, podwyższona ilość wapnia w komórce może doprowadzić do jej śmierci w wyniku aktywacji szlaku programowanej śmierci (apoptozy - podrozdział 1.4) lub bardziej chaotycznego procesu nekrotycznego (występującego podczas zawału lub niedotlenienia). Podstawowe grupy białek, które pełnią odrębne funkcje i wchodzące w skład typowego sygnałosomu wapniowego to:

- białka transportujące wapń (kanały i pompy)
- bufory wapniowe: białkowe (CaBP) i nieorganiczne PO_4^{3-}
- sensory wapniowe (np. białka z rodziny kalmodulin)
- białka efektorowe (kinazy białkowe)

Element Sygnałosomu	**Mięśnie Szkieletowe**	**Kardio-miocyty**	**Neurony CA1**	**Limfocyty T**
Receptory	–	ET-1R/α1R AngIIR	mGluR1 M1	TCR
PLC	–	PLCβ	PLCβ	PLCγ1
EC	Ca_V1.1	Ca_V1.2	Ca_V1.2/Ca_V2.1 Ca_V2.2/NMDAR	Orai1
RC	RyR1	RyR2 $InsP_3$R2	RyR2 $InsP_3$R2	$InsP_3$R1
PMCA's	PMCA1a, 1c, 1d	PMCA1c, 1d, 2a	PMCA1a, 2a, 3a	PMCA4b
SERCA's	SERCA1a, 1b	SERCA2a	SERCA2b, 3	SERCA2b, 3
Wymienniki	NCX	NCX1	NCX1, 3	–
Bufory	Parwalbumina	–	Parwalbumina Kalbindyna 28K	–
Sensory	Troponina C Kalmodulina	Troponina C Kalmodulina	Kalmodulina	Kalmodulina

Tablica 1.1: Przykładowy układ elementów sygnałosomu wapniowego, specyficznego dla danego typu komórki. **EC** - kanały wpuszczające wapń do komórki; **RC** - kanały uwalniające wapń z magazynów; **PMCA's** - pompy wapniowe na błonie komórkowej; **SERCA's** - pompy wapniowe siateczki sródplazmatycznej [22].

Tak jak większość szlaków sygnalizacyjnych, szlak wapniowy rozpoczyna się w momencie aktywacji receptorów zewnątrzkomórkowych w postaci specyficznego bodźca chemicznego lub elektrycznego. Receptory przekazują informacje do różnego rodzaju przekaźników i wzmacniaczy (białko G, kinazy, fosfolipaza C), które wytwarzają substancje przekaźnikowe drugiego rzędu. Substancje te mają za zadanie przekazać sygnał z powierzchni komórki do rezydujących w cytozolu sensorów i efektorów. Substancje przekaźnikowe drugiego rzędu charakterystyczne dla wapniowej ścieżki sygnalizacyjnej to:

- inozytolo 1,4,5-trifosforan (IP_3) i diacyloglicerol (DAG) , łączące aktywację receptora powiązanego z białkiem G z resztą wapniowej ścieżki sygnalizacyjnej i uwalnianie wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych
- cykliczna ADP-ryboza (cADPR), uwalnia Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych

- fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADP)
- jony wapnia

Sensory i **efektory**, podobnie jak **receptory** na powierzchni komórki, służą do detekcji przekaźników drugiego rzędu. Typowymi przykładami dla ścieżki wapniowej są białka wiążące wapń (np. kalmodulina), które wykrywają zwiększenie stężenia wapnia w cytozolu i przekazują tę informację do różnych efektorów kontrolujących takie procesy jak skurcz włókienek aktynowo-miozynowych, czy sekrecja. Niekiedy sensory są równocześnie efektorami, np. enzymy wrażliwe na cykliczne nukleotydy (np. cAMP/cGMP). Efektory mogą tworzyć również skomplikowany system złożony z wielu komponentów, np. system sterujący procesami egzocytozy, fagocytozy, czy transkrypcji genów, odpowiedzialne za aktywację specyficznej odpowiedzi komórkowej.

Różnorodność sygnalizacji wapniowej osiągana jest za pomocą dużej ilości białek efektorowych wrażliwych na wapń. Wszystkie białka zaangażowane w przekazywanie sygnału wapniowego tworzą tzw. „**sygnałosom wapniowy**". Poszczególne rodzaje komórek zawierają różne elementy sygnałosomu, który dostosowany jest do typu komórki i funkcji, jakie pełni (Tab. 1.1). W taki sposób każda komórka generuje specyficzny sobie sygnał wapniowy. Istotną właściwością każdego sygnałosomu jest fakt, iż wraz rozwojem i różnicowaniem komórek ulega on przebudowie, co może wpłynąć na charakter odpowiedzi komórkowej na sygnał wapniowy.

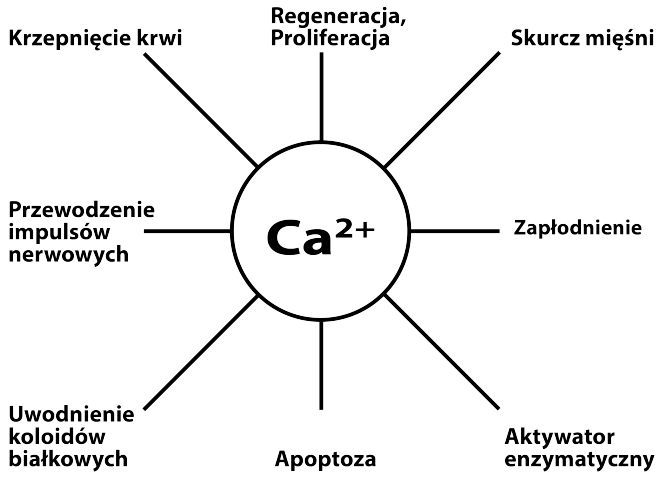
Podstawowymi elementami białkowymi biorącymi udział w transdukcji sygnału wapniowego są [20, 173, 246]:

- kanały wapniowe (transport bierny):
  - kanały wapniowe błony komórkowej (bramkowane napięciem -VGCC) i bramkowane ligandem - (LGCC)
  - kanały transportujące wapń z siateczki śródplazmatycznej: receptor inozytolo-3-fosforanu (IP_3R) oraz receptor rianodynowy (RyR)
  - kanały transportujące wapń do mitochondrium - VDAC oraz mitochondrialny uniporter
  - kanały pojemnościowego napływu jonów wapniowych (SOCEC)
  - kanały wapniowe aktywowane poprzez receptor (ROCC)
  - kanały TRPC (ang. transient receptor potential channel)
- pompy wapniowe (transport czynny)
  - plazmatyczna Ca^{2+}-ATPaza (PMCA)
  - sarko(endo)plazmatyczna Ca^{2+}-ATPaza (SERCA)
- wymienniki wapniowe (transport czynny)

- wymiennik sodowo/wapniowy (NCX)
- wymiennik sodowo/wapniowo/potasowy (NKCX)

1.3 Rola jonów wapnia w komórce

W toku ewolucji wytworzyło się wiele mechanizmów wykorzystujących wapń jako cząsteczkę sygnałową do realizacji specyficznych procesów fizjologicznych działających w różnych ramach czasowych. Sygnał wapniowy może działać od kilkunastu mikrosekund, po wiele godzin. Szybkie zmiany związane bezpośrednio z wahaniami stężenia wapnia w cytozolu obejmują takie zjawiska jak: skurcz mięśni poprzecznie prążkowanych, sekrecja hormonów, wzmożona produkcja ATP. Zmiany te zachodzą w komórce w ciągu sekund lub kilku minut. W dłuższej perspektywie czasu aktywowane są różne mechanizmy kontrolujące ekspresje genów w komórce, które mogą wpływać na różnicowanie komórek, proliferację, cykl komórkowy lub programowaną śmierć. Tego typu reorganizacja czynności komórki wymaga dłuższego czasu i zajmuje od kilku do kilkunastu godzin.



Rycina 1.2: Udział jonów wapnia w integracji różnych szlaków i procesów komórkowych.

Wapń w cytozolu stanowi więc przekaźnik informacji i może być używany jako sygnał integrujący procesy zachodzące w różnych przedziałach komórki lub sygnał przekazujący informację pomiędzy środowiskiem zewnętrznym, a komórką lub pomiędzy komórkami. Stanowi kluczowy element integrujący szereg szlaków sygnalizacyjnych i procesów: mechano-chemicznych, biochemicznych i elektrycznych (Ryc. 1.2). Aktywowane szlaki sygnalizacyjne prowadzą do zmian w funkcjonowaniu komórki, które mogą objawiać się w bardzo różnorodny sposób - od apoptozy po skurcz mięśni i kontrolę procesu zapłodnienia.

1.3.1 Sprzężenie mechano-chemiczne (skurcz mięśni)

Wszystkie typy mięśni wykazują zdolność do odpowiadania skurczem na docierające do nich sygnały elektryczne/chemiczne. Elementami kurczliwymi są włókienka fibrylarne tworzące sarkomer. Skrócenie sarkomeru wymaga energii dostarczanej przez

hydrolizę związku wysokoenergetycznego ATP do ADP i reszty fosforanowej. W obu typach mięśni (gładkich i poprzecznie prążkowanych) czynnikiem inicjującym skurcz jest wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie. Ciąg zdarzeń następujący od momentu inicjacji sygnału elektrycznego do skurczu mięśnia nosi nazwę sprzężenia mechanochemicznego.

Etap 1 Potencjał czynnościowy osiąga akson neuronu ruchowego. Potencjał czynnościowy aktywuje kanały wapniowe zależne od napięcia zlokalizowane w błonie komórkowej aksonu, co powoduje gwałtowne wnikanie jonów wapnia Ca^{2+} do wnętrza komórki. Pod wpływem kaskady sygnałowej uruchomionej zwiększonym stężeniem wapnia, pęcherzyki zawierające acetylocholinę łączą się z błoną komórkową uwalniając neurotransmiter do szczeliny płytki nerwowo-mięśniowej.
Acetylocholina dyfunduje przez szczelinę, łącząc się na jej drugim końcu z receptorami nikotynowymi, co powoduje otwarcie kanałów sodowych i potasowych zlokalizowanych w błonie komórkowej miocytu. Przewaga jonów sodu powoduje depolaryzację błony komórkowej i powstanie dodatniego potencjału czynnościowego. Pod wpływem potencjału czynnościowego retikulum endoplazmatyczne komórki mięśniowej uwalnia jony wapnia.

Etap 2 Mechanizm skurczu opisuje „ślizgowa teoria skurczu". Skracanie białek fibrylarnych jest wynikiem oddziaływań pomiędzy włóknami aktyny i miozyny, powiązanych z troponiną C (tzw. tropomiozyna). Zwiększenie stężenia jonów wapnia w cytozolu powoduje zmianę konformacji troponiny C. Kompleks tropomiozyny zmienia swoje położenie względem aktyny, odsłaniając miejsca kontaktu znajdujące się na włóknie aktynowym. Umożliwia to oddziaływanie aktyny z miozyną. Główki miozyny po połączeniu z aktyną, pod wpływem ADP przesuwają się, doprowadzając do przemieszczenia się włókienek względem siebie, co w efekcie powoduje wsuwanie się filamentów aktynowych głębiej pomiędzy filamenty miozynowe co prowadzi do skracania się sarkomeru. Główki miozyny pod wpływem ATP odłączają się od aktyny. Etap ten powtarzany jest przez cały czas, kiedy w cytozolu utrzymuje się podwyższone stężenie jonów wapnia.

W mięśniach gładkich nie ma troponiny C. Procesem inicjującym skurcz jest w nich fosforylacja lekkiego łańcucha miozyny przez zależną od kalmoduliny i wapnia kinazę lekkich łańcuchów miozyny.

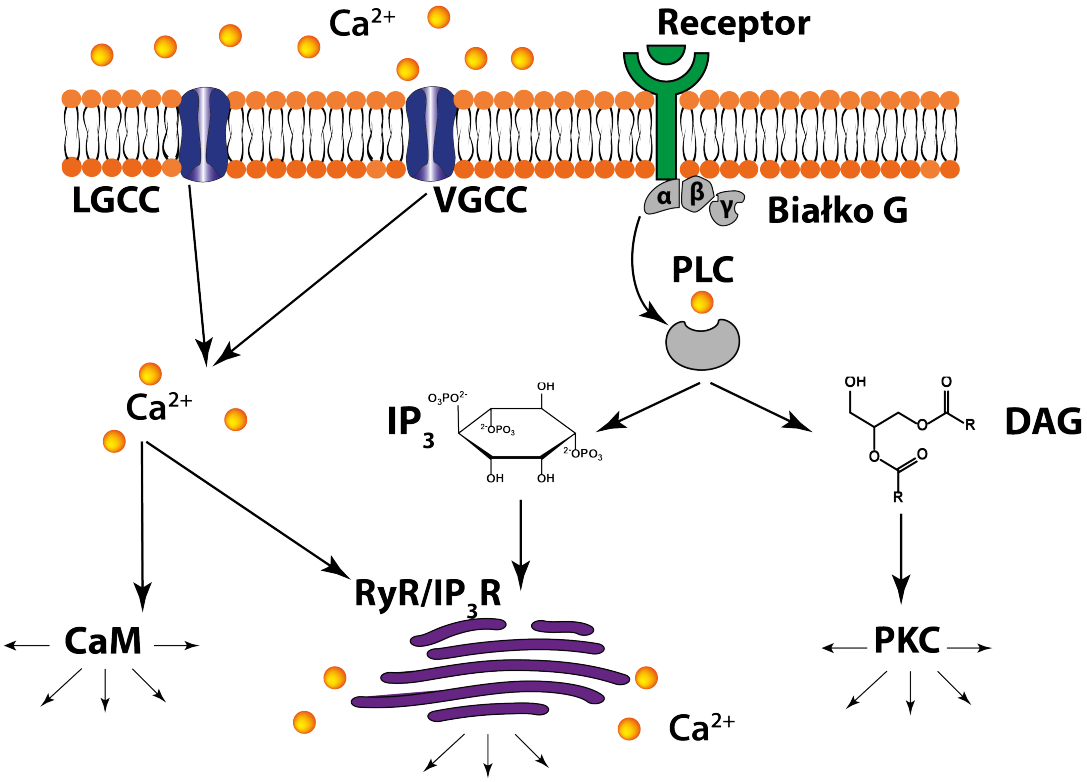
Etap 3 Wapń jest aktywnie wpompowywany z powrotem do zbiorników retikulum endoplazmatycznego przez pompę wapniową (Ca/ATP-azę). Tropomiozyna wraca do pierwotnej konfiguracji, blokując miejsca wiązania miozyny na aktynie.

1.3.2 Regulacja procesów biochemicznych

W wyniku związania ligandu lub zmiany różnicy napięć na powierzchni błony komórkowej, do komórki dostają się jony wapnia. Jony te są w stanie regulować aktywność szeregu protein, które w tym kontekście nazywane są białkami efektorowymi. Białka takie posiadają zdolność regulacji aktywności innych białek, należących do kaskady sygnałowej. Jednym z pierwszych poznanych białek efektorowych zależnych od wapnia była kalmodulina. Przyłączenie czterech jonów wapnia powoduje zmianę konformacji kalmoduliny, w wyniku czego może ona oddziaływać z innymi białkami. W ten sposób aktywowanych jest wiele enzymów zależnych od kalmoduliny (m.in. kinaza II). Kinazy aktywują inne białka, charakterystyczne dla danej kinazy, co w efekcie prowadzi do propagacji sygnału, który może dawać różnorodne efekty zależne od obecności w komórce poszczególnych elementów sygnałosomu. W odpowiedzi na aktywację kalmoduliny w komórce mogą zostać aktywowane szlaki odpowiedzialne za takie procesy jak: procesy zapalne, apoptozę, ekspresję genów, transport wewnątrzkomórkowy lub regulację cyklu komórkowego [24].

Sygnalizacja wapniowa oparta na receptorach metabotropowych polega na stymulacji receptorów błonowych sprzężonych z białkami G, które aktywują **fosfolipazę C** (PLC). Enzym ten powoduje hydrolizę 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu do inozytolotrifosforanu (IP_3), który wiąże się z receptorami $\mathbf{IP_3R}$ oraz **diacyloglicerolu** (DAG). Po związaniu IP_3 prowadzi do uwolnienia jonów wapnia z siateczki śródplazmatycznej do cytoplazmy. Sygnał wapniowy następnie może być propagowany w postaci fali wapniowej lub aktywować szereg kinaz białkowych zależnych od wapnia (Ryc. 1.3). DAG z kolei jest przekaźnikiem drugiego rzędu, który docelowo aktywuje rodzinę kinaz białkowych typu C (PKC). PKC reguluje aktywność kilkudziesięciu innych białek [202].

W zależności od organellum i właściwości sygnału wapniowego, aktywowane mogą być różne ścieżki efektorowe. W mitochondrium, wapń w ilościach mikromolowych, stymuluje produkcję ATP poprzez regulację allosteryczną trzech dehydrogenaz cyklu Krebsa: pirogronianowej, izocytrynianowej oraz α-ketoglutaranowej [67, 111]. W momencie, kiedy poziom wapnia utrzymuje się na podwyższonym poziomie przez dłuższy czas, mitochondria akumulują znaczne ilości tego jonu, co może doprowadzić do precypitacji fosforanu wapnia, produkcji reaktywnych form tlenu i utraty mitochondrialnego potencjału transbłonowego. Skutkuje to zwiększeniem ich objętości, powstają wtedy specyficzne pory permeabilizacyjne PTP (ang. ***p**ermeability **t**ransition **p**ore*), które uwalniają zawartość matriks do cytozolu. Pośród uwolnionych czynników znajdują się m. in.czynnik indukujący apoptozę (AIF ang. ***a**poptosis **i**nducing **f**actor*) i cytochrom C, odpowiedzialne za aktywację kaspaz (ang. *caspases – **c**ysteine-dependent **asp**artate specific protea**ses***) i wejście komórki na szlak apoptotyczny (Ryc. 1.8) [65, 68].



Rycina 1.3: Transdukcja sygnału wapniowego w komórce: kanały wapniowe bramkowane napięciem (**VGCC**) i ligandem (**LGCC**); **PLC**: fosfolipaza typu C; **CaM**: kalmodulina; **IP$_3$**: inozytolo-1,4,5-trifosforan; **DAG**: diacyloglicerol; **IP$_3$R** receptor inozytolo-1,4,5-trifosforanu; **PKC**: kinaza białkowa typu C.

W jądrze komórkowym, które otoczone jest podwójną błoną białkowo-lipidową, tzw. otoczką jądrową (jej przedłużenie stanowi szorstka siateczka śródplazmatyczna, określana jako RER (ang. **r**ough **e**ndoplazmic **r**eticulum)), wzrost stężenia Ca^{2+} może wpłynąć na transkrypcję genów pośrednio lub bezpośrednio. Pośrednio - poprzez aktywację jądrowych kinaz zależnych od wapnia, albo bezpośrednio, w wyniku aktywacji czynników transkrypcyjnych wiążących Ca^{2+} [107]. Jądro komórkowe określane jest czasami jako komórka wewnątrz komórki, ponieważ otoczka jądrowa zawiera własne elementy metabotropowej gałęzi szlaku sygnalizacji wapniowej, takie jak PLC, PKC, IP$_3$R, RyR, które generują osobne impulsy wapniowe wewnątrz jądra [235].

W oocytach fala wapniowa uwolniona w momencie wniknięcia plemnika powoduje zmianę organizacji osłon jaja. Mechanizm polega na aktywacji i dyfuzji specyficznej dla plemników fosfolipazy C uwalnianej w wyniku fuzji plemnika i oocytu. Gwałtowna zmiana stężenia wapnia propaguje się w postaci fali wapniowej rozchodzącej się po obwodzie całej komórki i doprowadza do zlewania się drobnych pęcherzyków z przestrzeni podbłonowej z błoną komórkową. Zawartość pęcherzyków modyfikuje skład otoczki oocytu [295].

1.3.3 Regulacja sygnałów elektrycznych

Sygnalizacja elektryczna odgrywa znaczącą rolę w komunikacji komórek pobudliwych np. syncytia serca, neurony, tkanka glejowa. W neuronach niektóre receptory neuroprzekaźników (NMDAR, AMPAR, 5-HTR) sprzężone są z kanałami wapniowymi (kanały bramkowane ligandem - LGCC, Rozdz. 1.6.2), obecnymi w błonach komórek pobudliwych. Obecne są też kanały wapniowe bramkowane napięciem (VGCC, Rozdz.1.6.2). Aktywacja tych kanałów prowadzi do napływu Ca^{2+} do wnętrza komórki, co zmniejsza różnicę potencjału elektrycznego utrzymywanego w poprzek błony komórkowej (tzw. potencjał spoczynkowy równy -70 mV). Po osiągnięciu wartości progowej (-50 mV) następuje otwarcie bramkowanych napięciem kanałów przewodzących odkomórkowo jony potasowe, oraz kanałów przewodzących jony sodowe do wnętrza komórki. Aktywowane są również kanały przepuszczające jony chlorkowe na zewnątrz komórki. Otwarcie tych kanałów powoduje ruch jonów zgodny z gradientami ich stężeń, który szybko niweluje różnicę potencjałów pomiędzy środowiskiem zewnątrz- i wewnątrzkomórkowym i wskutek szybkiego napływu sodu rośnie do wartości +35 mV. Jest to tzw. potencjał czynnościowy. Skutkiem ucieczki chloru jest narastająca depolaryzacja błony komórkowej spowalniana i osłabiana przez hiperpolaryzujące działanie wypływających z komórki jonów potasu [18, 276].

W mięśniach rezultatem depolaryzacji jest otwarcie zależnych od napięcia kanałów wapniowych (kanały typu L) i dalszy wzrost stężenia jonów wapnia w cytozolu. Sygnał wapniowy prowadzi do aktywacji kanałów rianodynowych, znajdujących się na powierzchni siateczki śródplazmatycznej. Generuje to kolejną falę wapniową spowodowaną wyrzutem wapnia z magazynu komórkowego. Mechanizm ten nosi nazwę **CICR** (ang. ***c****alcium* ***i****nduced* ***c****alcium* ***r****elease*). W komórkach nerwowych prowadzi to do uwolnienia neurotransmiterów w synapsach. Stanowi też podstawę zjawiska leżącego u podstaw uczenia się i pamięci, czyli długotrwałego wzmocnienia synaptycznego - LTP.

1.4 Rola Ca^{2+} w procesie apoptozy

Apoptoza, nazywana też programowaną śmiercią komórki, jest aktywnym, uporządkowanym procesem umożliwiającym eliminację komórek bez aktywowania stanu zapalnego i uszkodzenia otaczających tkanek. Zachodzi pod wpływem czynników endo- i egzogennych, które zapoczątkowują genetycznie kontrolowany program doprowadzający do jej śmierci. Apoptozie jednej komórki nie towarzyszy ani uszkodzenie komórek sąsiednich, ani powstanie stanu zapalnego. Podstawowymi cechami apoptozy są: niszczenie DNA (z udziałem endonukleaz), proteoliza białek i wytworzenie ciałek apoptotycznych zawierających otoczone błoną komórkową nie uszkodzone organelle. Ciałka te są rozpoznawane i szybko fagocytowane przez monocyty i makrofagi. Fizjologiczną

rolą apoptozy jest eliminowanie z ustroju komórek zakażonych, uszkodzonych, zmutowanych lub zbędnych. Apoptoza odgrywa znaczną rolę w:

- procesach rozwojowych, podczas wytwarzania się tkanek i narządów w trakcie embriogenezy (np. kształtowanie układu nerwowego, narządów rozrodczych, formowania palców i inne) [92, 137];
- w erytropoezie - erytropoetyna hamuje aktywność kaspaz w komórkach twórczych krwi, a szczególnie komórek prekursorowych czerwonych krwinek [271];
- w procesie dojrzewania limfocytów T [103];
- w przebiegu fizjologicznej inwolucji narządów, np. grasicy [71];
- w apoptozie neutrofilów [103];
- w procesie nowotworzenia (około 50% nowotworów posiada mutacje w genach kontrolujących apoptozę) [263];
- w zakażeniach (np. indukcja apoptozy limfocytów podczas zakażenia pierwotniakiem *T. brucei* [27], komórek nabłonkowych dróg oddechowych wywołanych zakażeniem *P. aeruginosa* [171] lub apoptoza komórek wyściółki żołądka wywołana infekcją *H. pylori* [300]);

Poznano wiele czynników stymulujących apoptozę, a sygnałem do jej rozpoczęcia może być sygnał spoza komórki, bądź z wnętrza komórki (Ryc. 1.8). Po odebraniu „sygnału śmierci" (np. związanie TNF z receptorem na powierzchni) w komórce uruchamiane są przemiany biochemiczne, których skutkiem jest aktywacja specyficznych proteaz cysteinowych: kaspaz (Ryc. 1.4), izoform kalpain, katepsyn [106, 255] i endonukleaz: **DFF40** (ang. ***D****NA* ***f****ragmentation* ***f****actor*) i **CAD** (***c****aspase* ***a****ctivated* ***d****eoxiribonuclease*) [40, 153, 298]. Rozpoczęcie procesów proteolitycznych i nukleolitycznych doprowadza do stopniowej degradacji białek strukturalnych i trawienia genomu na fragmenty o długości 180-200 par zasad, co w efekcie prowadzi do śmierci komórki. W mechanizmie mitochondrialnym bardzo ważną rolę odgrywają jony wapnia. Nadmienić warto, że apoptoza jest procesem aktywnym, regulowanym szeregiem czynników, takich jak: dostępność substancji odżywczych, czynników wzrostu, poziom hormonów, cytokin, obecności czynników cytotoksycznych, uszkodzenia DNA, czy aktywacja określonych receptorów błonowych.

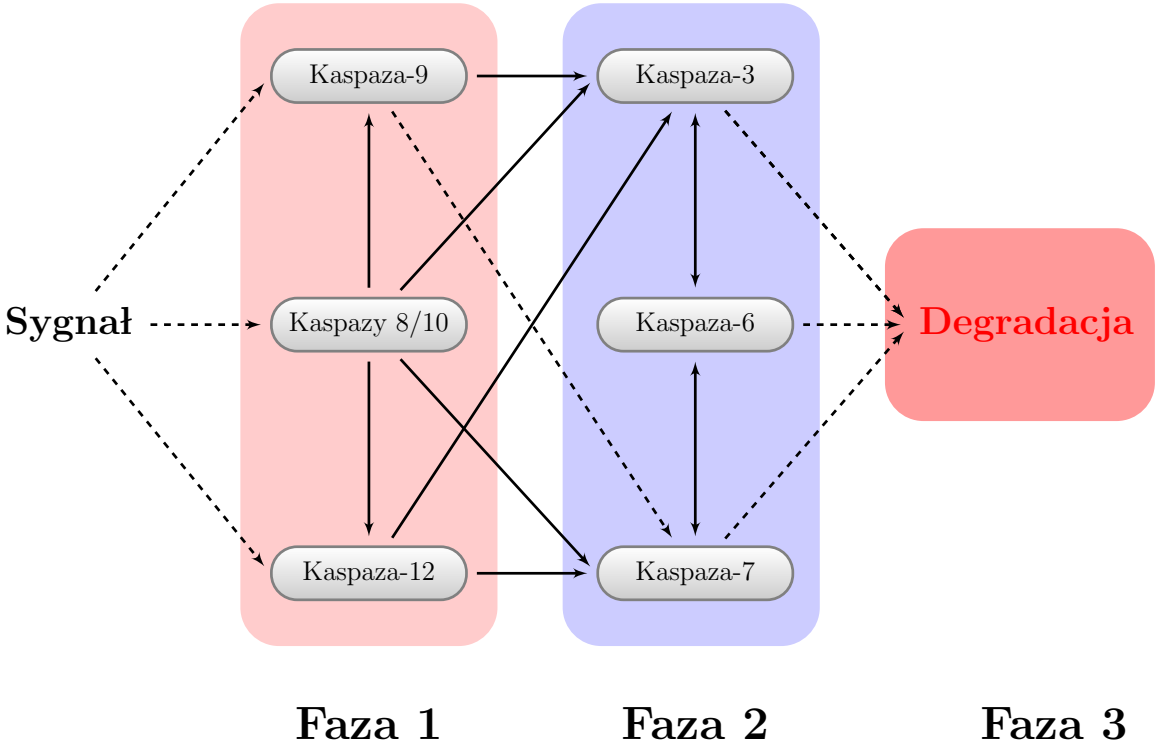
Główne zmiany i procesy towarzyszące apoptozie obejmują [129, 250]:

1. **Fazę inicjacji**
    - związanie ligandu z receptorami DR (ang. **d**eath **r**eceptors)
    - obkurczanie cytoplazmy, utrata kontaktu z sąsiednimi komórkami
    - pęcznienie mitochondriów
    - zagęszczenie chromatyny
    - powstanie kompleksu DISC (ang. ***d**eath **i**nducing **s**ignaling **c**omplex*)
    - aktywacja kaspaz pierwszej generacji tzw. kaspaz inicjujących (kaspazy -9, -8, -10 i -12)
2. **Fazę wykonawczą**
    - uwolnienie cytochromu C
    - powstanie apoptosomu: Apaf1 + cytochrom C
    - aktywacja kaspaz wykonawczych (kaspazy -3, -6 oraz -7)
    - aktywacja endonukleaz
3. **Fazę niszczenia**
    - degradacja DNA
    - degradacja białek
    - fragmentacja jądra komórkowego i cytoplazmy
    - formowanie się ciałek apoptotycznych

Akceptuje się podział kaspaz na trzy grupy, tj.

- aktywatory cytokin, związane ze stanami zapalnymi (kaspazy -1, -4, -5, -11, -12, -13, -14)
- inicjatory (kaspazy-8, -9, -10)
- efektory (kaspazy-3, -6, -7)

Jak już wspomniano, aktywacja kaspaz może przebiegać według dwóch odmiennych scenariuszy. Wyróżniamy **szlak zewnętrzny**, zależny od błonowych receptorów śmierci oraz **szlak wewnętrzny**, zależny od mitochondriów. Kaspazy syntetyzowane są w postaci nieaktywnej - tzw. zymogenów, które dopiero w trakcie aktywacji szlaku apoptotycznego przekształcane są do czynnych enzymów. Proces aktywacji prokaspaz nastąpić może w wyniku autoproteolizy, proteolizy przez inicjującą kaspazę bądź związania cząsteczek adaptorowych. Dojrzałe enzymy tworzą heterotetramery [153, 203].



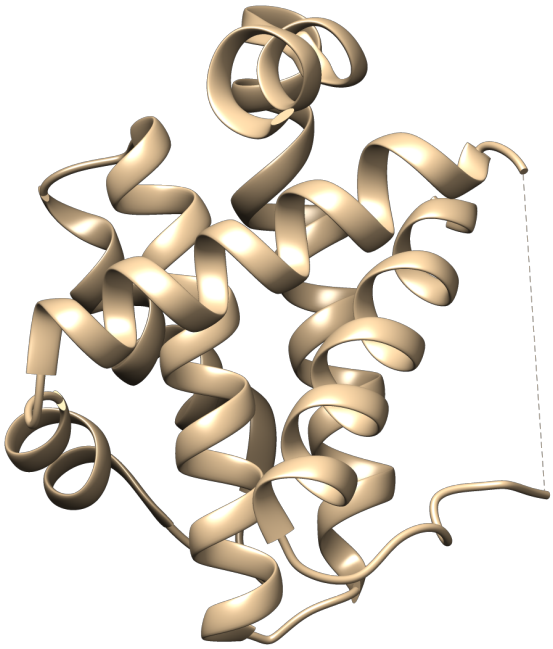
Rycina 1.4: Schemat przedstawiający zależności pomiędzy kaspazami w trakcie ich aktywacji, tzw. kaskada kaspaz. **Faza 1** obejmuje indukcję apoptozy, **Faza 2** aktywację kaspaz efektorowych, oraz **Faza 3** - degradację [40, 48].

Niektóre enzymy proteolityczne biorące udział w apoptozie, np. izoformy **kalpainy**, do działania wymagają jedynie obecności jonów wapnia, który przyłączany jest do jednej z domen wykazującej dużą homologię z kalmoduliną. Dokładniej, wiązanie wapnia następuje dzięki obecności motywów „E-F hand" w strukturze kalpain [37, 211]. Badania eksperymentalne wykazały, że wzrost aktywacji kalpain wyprzedza zmiany morfologiczne typowe dla komórek apoptotycznych. Dodatkowo w wielu typach komórek, które uruchomiły program apoptozy dochodzi do rozchwiania homeostazy jonów Ca^{2+}, co prowadzi często do aktywacji izoform kalpainy [106, 255]. Z punktu widzenia niniejszej pracy na szczególna uwagę zasługuje szlak wewnętrzny, w którym przepływ jonów wapnia z ER do mitochondrium aktywuje mechanizmy prowadzące do pęcznienia mitochondriów, otwarcia megakanału **PTP** i ostatecznie do utraty ciągłości błon mitochondrialnych i uwolnienia do cytozolu m. in. cytochromu C, który jest bardzo silnie działającym czynnikiem pro-apoptotycznym [153, 250]. Aby dokładnie nakreślić złożony charakter oddziaływań pomiędzy ER, mitochondriami i jonami wapnia, których finałem jest śmierć komórki, w dalszej części tego rozdziału szczegółowo wyjaśnione zostaną poszczególne etapy szlaku wewnętrznego.

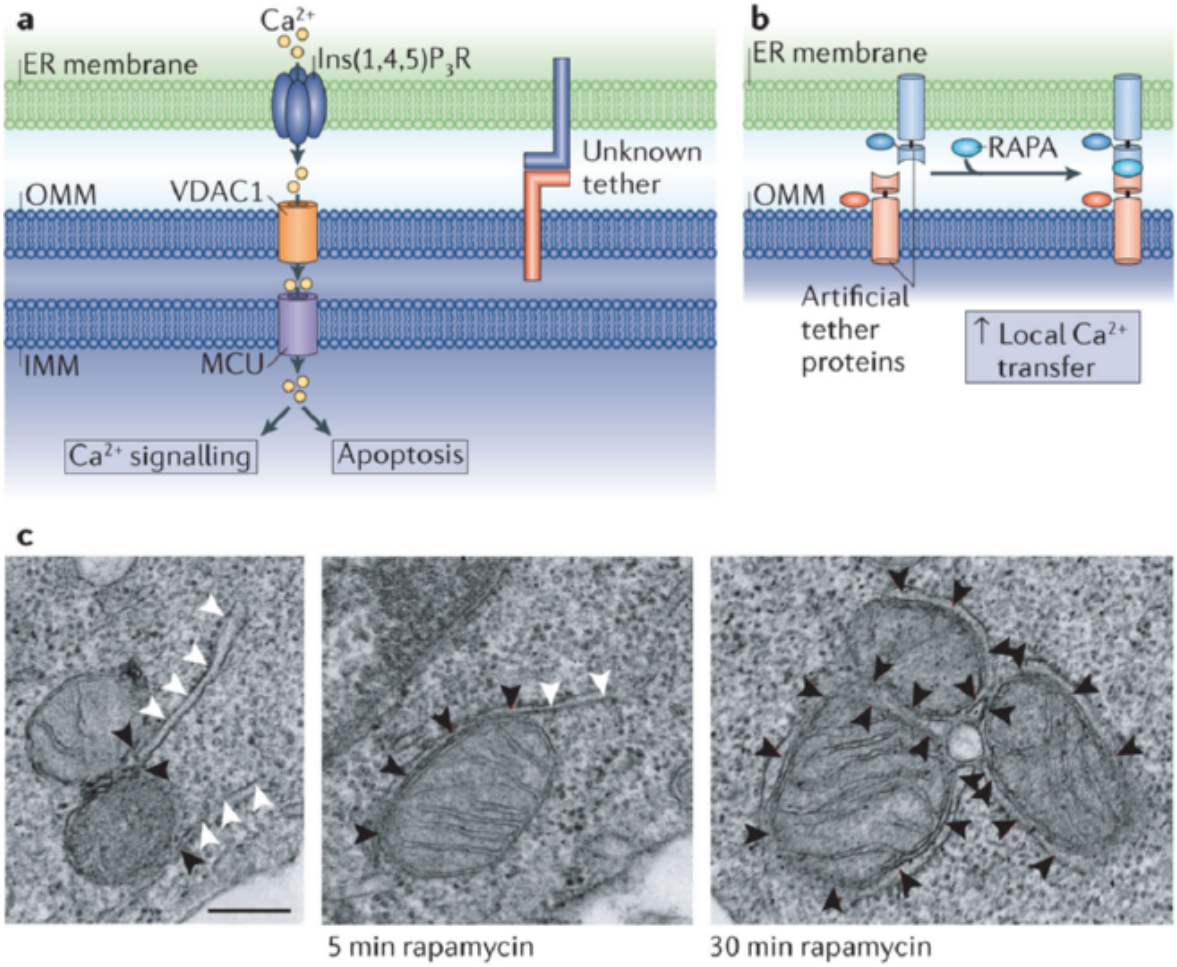
Wśród czynników uruchamiających mitochondrialny szlak śmierci wymienia się m.in. nagromadzenie się reaktywnych form tlenu - ROS (ang. ***r**eactive **o**xygene **s**pecies*), tlenku azotu, jonów Ca^{2+}, szok termiczny lub obecność toksyny takich jak ceramid, kwas arachidonowy. Akumulacja uszkodzeń DNA również może stanowić sygnał

apoptotyczny [153]. Sygnały śmierci indukują szereg zmian na poziomie molekularnym prowadzących do zmiany objętości mitochondriów („puchnięcia mitochondriów") i przerwania ciągłości błon mitochondrialnych. Powoduje to uwolnienie do cytozolu szeregu białek pro-apoptotycznych, prowadzących do śmierci komórki. Uwalniane są m.in. **cytochrom C**, **AIF**, **Smac/DIABLO** [72, 284]. Główną rolę w mechanizmie uwolnienia tych białek przypisuje się jonom wapnia. Ponieważ PTP jest w stanie przepuszczać cząsteczki nie większe niż 1.5 kDa, oczywistym jest zatem, że większość z wymienionych wyżej molekuł jest zbyt wielka (np. cytochrom c - 10.5 kDa, AIF - 66.9 kDa), żeby przedostać się przez PTP do cytozolu. Jednym z mechanizmów wyjaśniających to zjawisko jest teoria „pęcznienia" organelli. Gromadzeniu się jonów wapnia w macierzy (Ryc. 1.6) towarzyszy napływ wody. Prowadzi to do wzrostu objętości mitochondriów, co w ostateczności doprowadza do pękania błony zewnętrznej i uwolnienia zawartości przestrzeni perymitochondrialnej oraz macierzy do cytozolu [165]. Jak wiadomo transport jonów Ca^{2+} pomiędzy retikulum endoplazmatycznym i mitochondriami w większości zachodzi w miejscach kontaktu tych dwóch struktur (por. 1.7.1), dlatego też dokładne poznanie mechanizmu wymiany jonów wapnia pomiędzy tymi kompartmentami poprzez kompleksy MAM stanowić może klucz do lepszego poznania mechanizmu apoptozy [100, 102, 122].

Z literatury wynika, że nadmierny napływ jonów wapniowych do mitochondrium powoduje aktywowanie programu apoptozy, czyli uwolnienia białek, które znajdowały się wewnątrz mitochondrium: np. cytochromu C - składnik łańcucha oddechowego, **AIF** oraz **Smack/DIABLO**, proteazy serynowe **HtrA2/Omi**, **endonukleazę G**. Na kolejnych etapach szlaku apoptotycznego prowadzi to do aktywacji kaspaz efektorowych (kaspazy-3, 6 i 7), które doprowadzają do degradacji białek w komórce [68, 186, 237]. Cytochrom C w cytozolu tworzy duży, niejednorodny kompleks z białkami Apaf1 i Apaf2 oraz prokaspazy-9, nazywany apoptosomem. Cytochrom C działa w tym kompleksie jako kofaktor i stymuluje auto oligomeryzacje białka Apaf-1, które z kolei jest aktywatorem prokaspazy-9. Kaspaza-9 uznawana jest za kaspazę inicjatorową mitochondrialnego szlaku apoptotycznego. Na drodze ograniczonej proteolizy może ona aktywować kaspazy wykonawcze (kaspazę-3 lub -7), które



Rycina 1.5: Wstążkowa reprezentacja domeny BH4 białka Bcl-X_L (kod PDB: **1AF3**) [10].



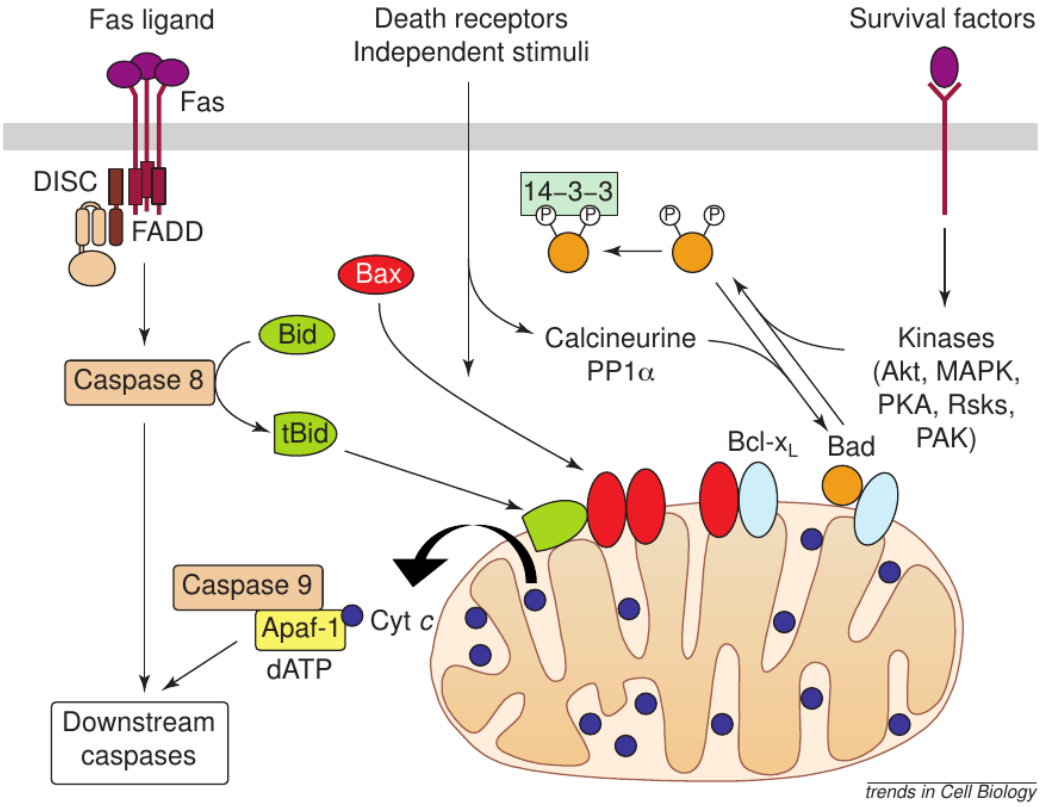
Rycina 1.6: (**A**) Transport jonów Ca^{2+} pomiędzy retikulum endoplazmatycznym i mitochondriami podczas wczesnej fazy apoptozy zachodzi w miejscach kontaktu tych dwóch struktur. Szczególną rolę w procesie ustawienia poszczególnych kanałów jonowych w apozycji odgrywają specjalne białka spinające o nieznanym charakterze. (**B**) Indukcja miejsc wiązania za pomocą białek hybrydowych (opis w tekście) oraz rapamycyny (**RAPA**); (**C**) Zdjęcia wykonane transmisyjnym mikroskopem elektronowym komórek RBL-2H3 ze zmodyfikowanymi sztucznymi białkami spinającymi przed i po dimeryzacji indukowanej rapamycyną. Czarne strzałki wskazują miejsca kontaktu ER-mitochondrium, natomiast białe strzałki ER bez kontaktu. Wskaźnik odległości to 250 nm [236].

aktywują kaskadę innych kaspaz lub rozpoczynają proces degradacji aparatu białkowego [40, 203]. Prokaspaza-3 może również bezpośrednio aktywować polipeptyd AIF, który aktywowany przenosi się do jądra komórkowego i tam aktywuje endonukleazy rozpoczynające degradację DNA [40, 48].

Uwolnienie cytochromu C i innych białek mitochondrialnych zaangażowanych w apoptozę regulowane jest przez grupę protein z **rodziny Bcl-2** (ang. ***B**-**c**ell **l**eukemia/ **l**ymphoma-**2***), których przedstawiciele mogą mieć działanie zarówno proapoptotyczne (Bak, Diva, Bcl-X_S, Bik, Bim Bad, Bid, Egl-1), jaki i antyapoptotyczne (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, CED-9, Bcl2A1, Bfl-1, Bcl-2-L2) [41]. Szczegółowy opis poszczególnych białek znajduje się w Tab. 1.2. Białka rodziny Bcl-2 dzielą ze sobą cztery **domeny**

BH (ang. ***B**cl-2 **h**omology region*)(Ryc. 1.5), nazwane BH1, BH2, BH3, BH4, które odgrywają znaczną rolę w procesie kontroli apoptozy. W białkach anty-apoptotycznych (Bcl-2 oraz $BclX_L$) wszystkie cztery domeny są konserwowane ewolucyjnie, natomiast białka proapoptotyczne take jak Bad, Bid oraz Bim posiadają tylko jedną domenę - BH3 - i z tego powodu wyróżniane są jako podgrupa białek o nazwie „*BH3-only*" [169]. Czasami, także białka Bax wyodrębniane są z rodziny Bcl-2 jako osobna podgrupa.

Domeny BH uczestniczą w dimeryzacji poszczególnych przedstawicieli grupy białek Bcl-2. Dimeryzacja może zachodzić na drodze łączenia się białek Bcl-2, wtedy wykorzystywane są zazwyczaj oddziaływania typu „**ogon-głowa**", kiedy to N-końcowy region białka (zawierający domenę BH4) oddziałuje z dalszym, C-końcowym regionem siostrzanej cząsteczki, w której zlokalizowane są domeny BH1, BH2 oraz BH3. Heterodimeryzacja natomiast polega na łączeniu białek Bcl-2/Bax, kiedy zaangażowane są oddziaływania „**ogon-ogon**", dzięki możliwość interakcji domen BH1, BH2, BH3 białek Bcl-2 ze środkową częścią Bax, w której znajduje się domena BH3 [41, 242]. Homo - i heterodimeryzacja białek z rodziny Bcl-2 wpływa w znaczny sposób na proces uwalniania cytochromu C z mitochondrium i aktywności niektórych kaspaz oraz na proces formowania się i aktywności PTP, co przekłada się na decyzje komórki o kontynuowaniu, bądź terminacji szlaku apoptotycznego zależnego od mitochondrium.



Rycina 1.7: Mitochondria stanowią centralny punkt decyzyjny komórki, w którym krzyżują się zewnętrzne i wewnętrzne szlaki apoptotyczne. Wiele ścieżek programowanej śmierci komórki zależna jest od białek rodziny Bcl-2, w szczególności białek grupy „BH3-only" takich jak Bid i Bad [165].

Działanie niektórych przedstawicieli białek rodziny Bcl-2:

Antyapoptotyczne:

Bcl-2 Hamuje apoptozę w różnych systemach komórkowych, np. komórkach krwiotwórczych i neuronach. Reguluje śmierć komórek przez kontrolę przepuszczalności błony mitochondrialnej. Hamuje aktywność kaspaz poprzez zapobieganie uwalnianiu cytochromu C z mitochondriów i/lub przez wiązanie się z czynnikiem aktywującym apoptozę Apaf-1 [28, 152].

BclX_L Znajduje się na zewnętrznej błonie mitochondrialnej i reguluje otwarcie kanału VDAC. VDAC reguluje mitochondrialny potencjał błonowy, a więc kontroluje wytwarzanie reaktywnych form tlenu i uwalnianie cytochromu C przez mitochondria, z których oba są silnymi induktorami apoptozy [44].

Bfl-1 Hamuje apoptozę indukowaną IL-3. Może działać w odpowiedzi komórek krwiotwórczych na sygnały zewnętrzne i wspomaga przeżywalności komórek śródbłonka podczas infekcji. Indukowany NFκB hamuje aktywność czynnika TNFα [310].

Proapoptotyczne:

Bak W obecności odpowiedniego bodźca, przyspiesza programowaną śmierć komórek przez wiązanie do antyapoptotycznego białka Bcl-2 [247].

Diva Ekspresja białka Diva hamuje wiązanie Bcl-X_L do kompleksu Apaf-1. Stanowi nowy typ mitochondrialnych czynników proapoptotycznych z rodziny Bcl-2, które promują apoptozę niezależnie od regionu BH3, poprzez bezpośrednie wiązanie do Apaf-1 [135].

Bik Przyspiesza programowaną śmierć komórki. Wiąże się z represorami apoptozy,np. Bcl-X_L, BHRF1, Bcl-2 lub ich homologów. Nie oddziałują z białkami Bax [279].

Bim Indukuje apoptozę wiążąc się z anty-apoptotycznymi białkami takimi jak Bcl-2, Bcl-X_L i Mcl-1, hamując ich działanie przeżyciowe [55].

Bad Promuje śmierć komórek. Konkuruje z białkiem Bax w wiązaniu do białek antyapoptotycznych: Bcl-X_L, Bcl-2 i Bcl-2-L2/Bcl-W, w ten sposób wpływając na poziom heterodimeryzacji tych białek z Bax. Działa jako łącznik pomiędzy zewnętrznymi i wewnętrznymi ścieżkami programowanej śmierci [99].

Bid Produkt proteolizy tBid umożliwia uwolnienie cytochromu C. Przeciwdziała działaniu ochronnemu białka Bcl-2 [96, 123].

Bax W warunkach stresu, ulega zmianom konformacyjnym, które powodują jego przemieszczenie do błony mitochondriów, gdzie oddziałuje z poryną VDAC. Co ostatecznie prowadzi do uwolnienia cytochromu C [97, 247].

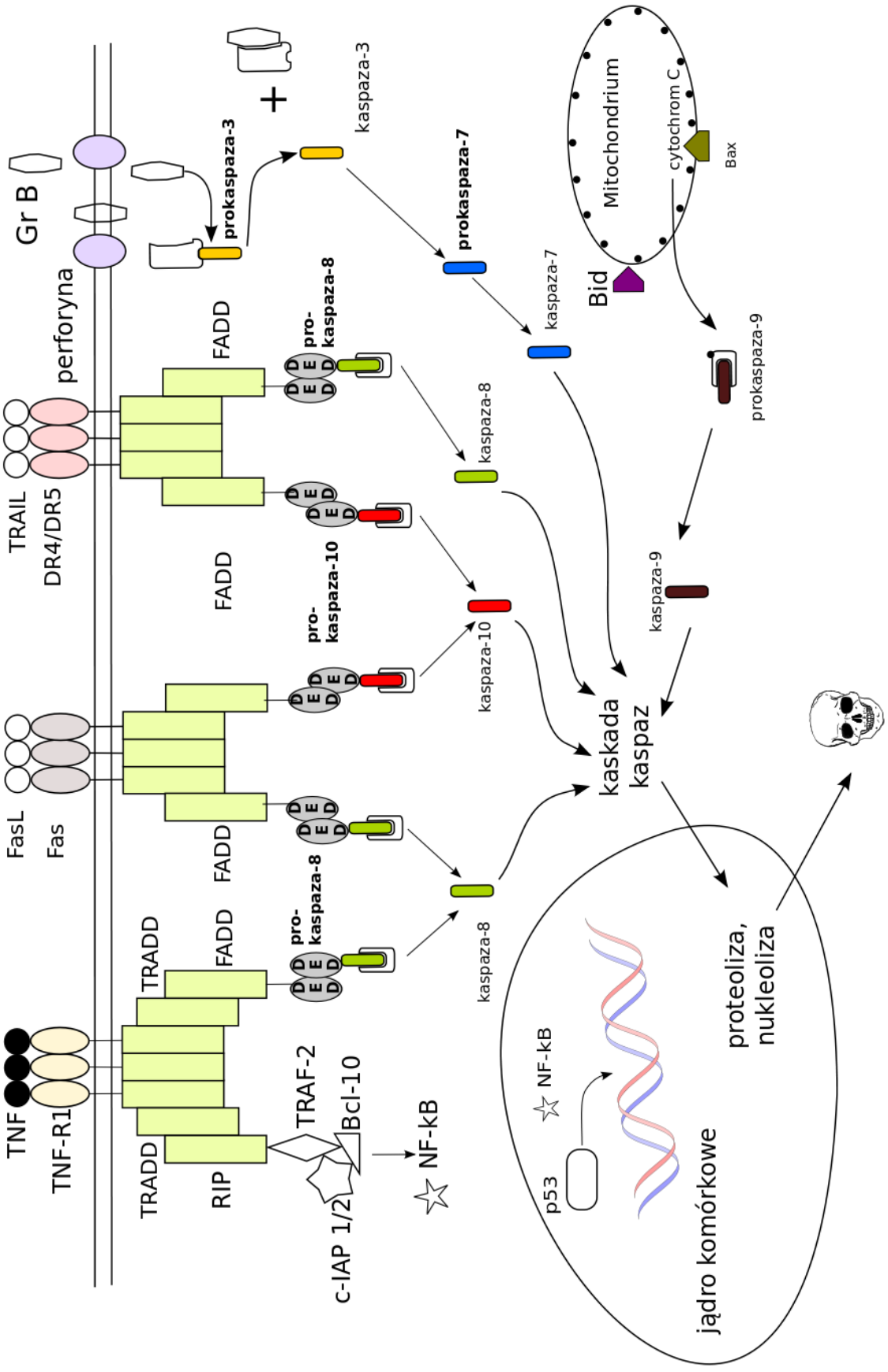
Symbol	Pełna nazwa białka	Domeny BH	Referencje
	Anty-apoptotyczne		
Bcl-2	***B**-**c**ell **l**eukemia/lymphoma-**2***	BH1, BH2, BH3, BH4	[152]
Bcl-2-L2	Bcl-2-like protein 2-**l**ike protein **2**		[99]
Bcl-X_L	***B**-**c**ell **l**ymphoma-e**x**tra **l**arge*	BH1, BH2, BH3, BH4	[16, 44]
Mcl-1	***M**yeloid **c**ell **l**eukemia sequence **1***	BH1, BH2, BH3, BH4	[215]
CED-9	***C**ell **d**eath protein 9*	BH1, BH2, BH3, BH4	[130]
Bcl2A1	***Bcl2**-related protein **A1***	BH1, BH2, BH3, BH4	[124]
Bfl-1	**B**cl related **f**etal **l**iver homolog - **1**	BH1, BH2, BH3, BH4	[308, 310]
	Pro-apoptotyczne		
Bak	***B**cl-2 homologous **a**ntagonist **k**iller*	BH1, BH2, BH3	[41]
Diva	***D**eath **i**nducer binding to **v**Bcl-2 and **A**paf-1*	BH1, BH2, BH3, BH4	[135]
Bcl-X_S	***B**-**c**ell **l**ymphoma-e**x**tra **s**mall*	BH3, BH4	[16, 39]
Bik	***B**cl-2-**i**nteracting **k**iller*	BH3	[73]
Bim	***B**cl-2-**i**nteracting **m**ediator of cell death*	BH3	[104, 205]
Bad	***B**cl-2-**a**ssociated **d**eath promoter*	BH3	[2]
Bid	***B**cl-2 **i**nteracting **p**rotein*	BH3	[172]
Egl-1	**Egg l**aying abnormal-1	BH3	[49]
Bax	***B**cl-2-**a**ssociated **X** protein*	BH1, BH2, BH3	[55, 303]

Tablica 1.2: Białka rodziny Bcl-2 - udział poszczególnych domen BH w strukturze.

Proteoliza białka Bid łączy zewnętrzną ścieżkę apoptotyczna ze ścieżką mitochondrialną. Umożliwia to przekazanie zewnętrznych sygnałów apoptozy płynących z receptorów błonowych na szlak aktywujący mitochondrialny mechanizm śmierci. Skrócony polipeptyd Bid, czyli tBid (ang. **t**runctated **Bid**) wiąże się z białkiem Bax, doprowadzając do zmian konformacyjnych jego N-końca, co umożliwia Bax przyłączanie do powierzchni mitochondriów. Tam oddziałuje z poryną VDAC przy tworzeniu megakanału

PTP. Efektem jest oligomeryzacja białek Bax i Bak na zewnętrznej błonie mitochondrialnej (Ryc. 1.7), co poprzedza wyrzut wymienionych wcześniej czynników apoptotycznych do cytozolu [247, 279]. Mitochondria stanowią więc centralny „punkt decyzyjny", w którym zbiegają się najważniejsze szlaki prowadzące do apoptozy [68, 165].

Istnieje jeszcze jeden szlak apoptotyczny, niezależny od sygnalizacji receptorów powierzchniowych, czy mitochondriów, który jest uruchamiany w retikulum endoplazmatycznym w wyniku działania czynników stresogennych. Stres powoduje nagromadzenie się jonów wapnia w retikulum, co destabilizuje funkcjonowanie białek wspomagających prawidłowe zwijanie innych protein - chaperonów, co doprowadza do nagromadzenia się nieprawidłowo zwiniętych białek w ER.

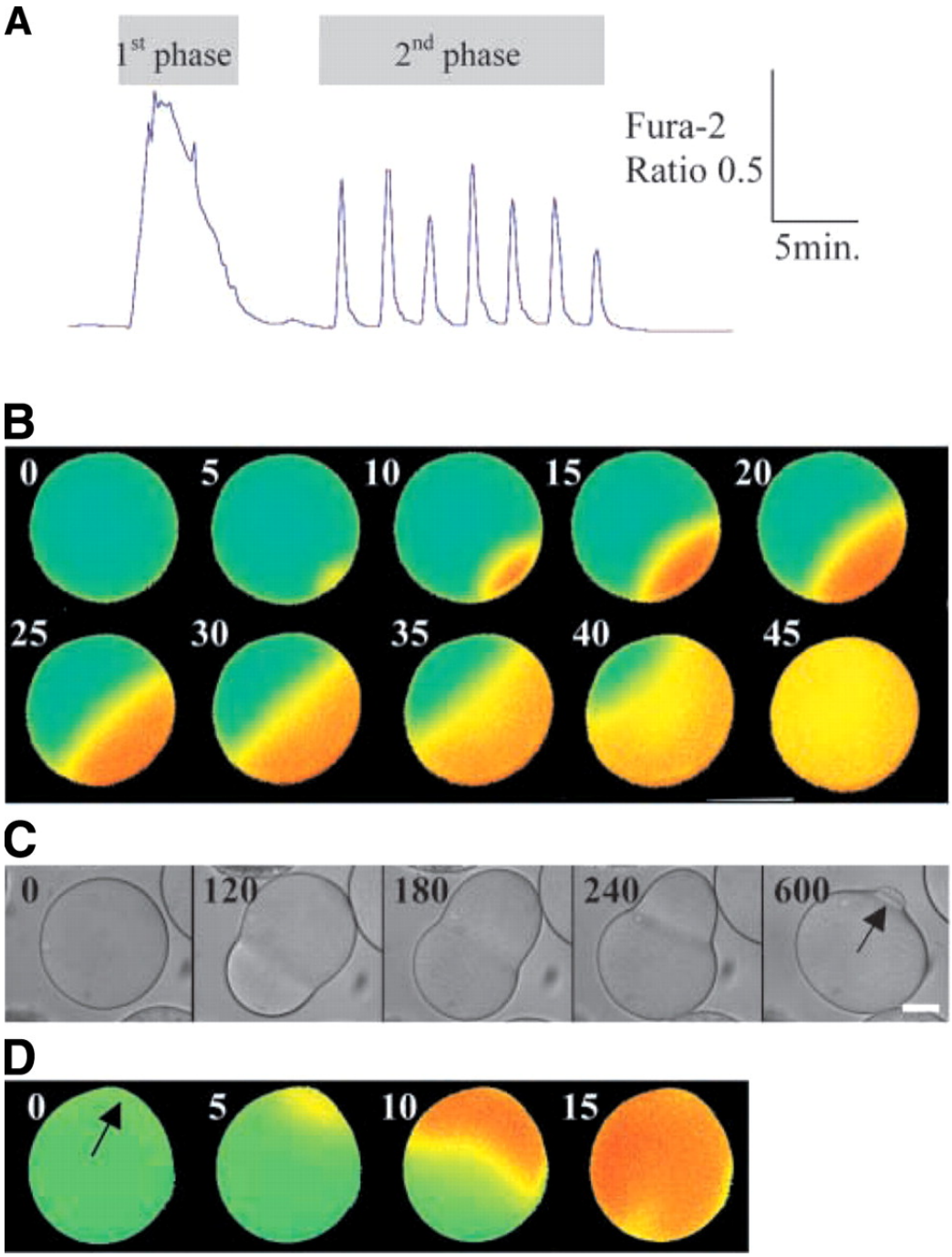


Rycina 1.8: Uproszczony schemat głównych szlaków apoptotycznych [68].

1.5 Rola Ca^{2+} w zapłodnieniu

Rola jonów wapnia związana z aktywacją oocytów podczas procesu zapłodnienia znana jest od lat 90-tych poprzedniego wieku. Natomiast dopiero niedawno zaczęto gromadzić informacje dotyczące znaczenia Ca^{2+} podczas aktywacji plemników przed zapłodnieniem [241].

Początek nowego życia zaczyna się od wymiany szeregu informacji, w których kluczową rolę odgrywa wapniowa ścieżka sygnalizacyjna. Wapń odgrywa rolę kluczowego przekaźnika, który wymienia informacje pomiędzy gametami. Gdy plemnik zbliża się do powierzchni komórki jajowej obie gamety ulegają aktywacji za sprawa zmian stężenia wolnych jonów wapnia, które z kolei zmieniają metabolizm obu gamet [36]. Zmiany cytozoliczne oocytu zachodzą poprzez aktywację receptora IP_3. Plemniki ssaków aktywują się tuż przed zapłodnieniem i również w tym procesie wapń odgrywa znaczącą rolę. Wzrost stężenia tych jonów w części ogonkowej plemnika doprowadza do wzrostu częstotliwości „ruchów" włókien kurczliwych. Zwiększa to ruchliwość plemnika, który jest wtedy w stanie pokonać opór środowiska (wyściółkę śluzową macicy, osłonkę przejrzystą). Wyrzut jonów wapnia w oocycie odbywa się dzięki aktywacji enzymu - fosfolipazy typu C (PLC) za pomocą czynnika aktywującego - tzw. **PLC**ζ pochodzącego z plemnika i wzrostu stężenia IP_3 wewnątrz komórki jajowej [264, 305]. Wzrost stężenia IP_3 wyzwala serię fal wapniowych w oocycie (Ryc. 1.9). Późniejsze zmiany stężenia wapnia służą jako wyznaczniki kolejnych podziałów komórkowych oraz jako sygnały to powstawania wzorców **gastrulacji** i **organogenezy**, współtworząc program rozwojowy zarodków. Dodatkowo, w przypadku komórki jajowej, w chwili zapłodnienia do cytozolu uwalniane są jony wapnia, które mogą wywołać pojedynczą falę wapniową bądź szereg oscylacji jonów wapnia. Powstanie pojedynczej lub wielokrotnej fali wapniowej jest cechą specyficzną gatunkowo. Fala ta jest sygnałem, który ma na celu ustawienie fazy cyklu komórkowego oocytu i wyrzut ziarnistości znajdujących się pod błoną komórkową. Zawartość pęcherzyków zmienia skład chemiczny otoczki oocytu i uniemożliwia przyłączenie się kolejnego plemnika [108, 265].



Rycina 1.9: Fale wapniowe przechodzące przez oocyt podczas procesu zapłodnienia. (**A**) czasowa charakterystyka poszczególnych fal wapniowych w oocycie podczas zapłodnienia. Widoczna jest jedna duża fala wapniowa, po której następuje siedem mniejszych. (**B**) fala wapniowa pierwszej fazy, rozpoczynająca się w punkcie wniknięcia plemnika. Fuzja gamet prowadzi do powstania dużej fali wapniowej, która w ciągu 40 sekund obejmuje cały oocyt. (**C**) reorganizacja struktury wewnętrznej oocytu i wytworzenie "kurczliwego bieguna", z którego biorą początek kolejne fale wapniowe. (**D**) fala wapniowa podczas drugiej fazy, rozchodząca się z bieguna kurczliwego [295].

1.6 Homeostaza wapniowa w komórce

Badania ostatnich lat wykazują, że jony wapnia stanowią kluczową rolę w przekazywaniu informacji w komórkach eukariotycznych. Stężenia Ca^{2+} w komórce jest niskie i rośnie gwałtownie dopiero w wyniku pobudzenia. Podwyższone stężenie wapnia w komórce uruchamia różnego rodzaju kaskady zdarzeń, które prowadzą do aktywacji wielu szlaków przekaźnictwa sygnału w komórce i określonej odpowiedzi komórki. Wapń spełnia więc klasyczną definicję wtórnego **przekaźnika informacji**. Stężenie Ca^{2+} w cytozolu, w komórce niepobudzonej jest bardzo niskie i wynosi około 50-100 nM, natomiast w przestrzeni zewnątrzkomórkowej poziom tego jonu wynosi 1-2 mM. Różnica pomiędzy cytozolem a płynami ustrojowymi jest więc gigantyczna. Stężenie jonu po obu stronach błony komórkowej różni się niemal dziesięć tysięcy razy (Tab. 1.3). W wyniku pobudzenia komórki stężenie Ca^{2+} cytozolicznego wzrasta dziesięciokrotnie do 1-2 μM. Przy tak dużej różnicy stężeń utrzymanie stałego, niskiego poziomu Ca^{2+} w komórce realizowane jest za pomocą układów białek transportujących wapń, takich jak: pompy, kanały, czy wymienniki, przez które Ca^{2+} jest usuwany na zewnątrz lub magazynowany w organellach wewnątrzkomórkowych (Ryc 1.10). Ogół procesów prowadzących do utrzymania stałego, niskiego stężenia Ca^{2+}, które pozostaje w dynamicznej równowadze nosi nazwę **homeostazy wapniowej**.

Jon	Stężenie [mM]	
	W cytozolu	Poza komórką
K^+	140	4
Na^+	14	440
Cl^-	4	116
HCO_3^-	12	29
Mg^{2+}	0.8	1.5
Ca^{2+}	<0.0002	2

Tablica 1.3: Stężenie jonów w komórce i macierzy zewnątrzkomórkowej [168].

Nadmiar Ca^{2+} usuwany jest z cytozolu na zewnątrz, tj. w kierunku wyższego stężenia, przez enzymy błony plazmatycznej Ca^{2+}-ATPazy, zwane także pompami wapniowymi (PMCA). Proces ten odbywa się kosztem energii uzyskiwanej z hydrolizy ATP (ATP/Ca^{2+} = 1:1). Innym mechanizmem usuwania Ca^{2+} są tzw. transportery drugiego rzędu, czyli wymienniki sodowo-wapniowe i sodowo-potasowo-wapniowe, będące białkami błonowymi, transportującymi jony sodu i/lub potasu na wymianę z jonami wapnia (Na^+K^+/Ca^{2+} = 3:1). Wapń jest także magazynowany w organellach wewnątrzkomórkowych takich jak mitochondria oraz siateczka śródplazmatyczna. Dodatkowo w każdym z kompartmentów występują też swoiste białka buforujące, które

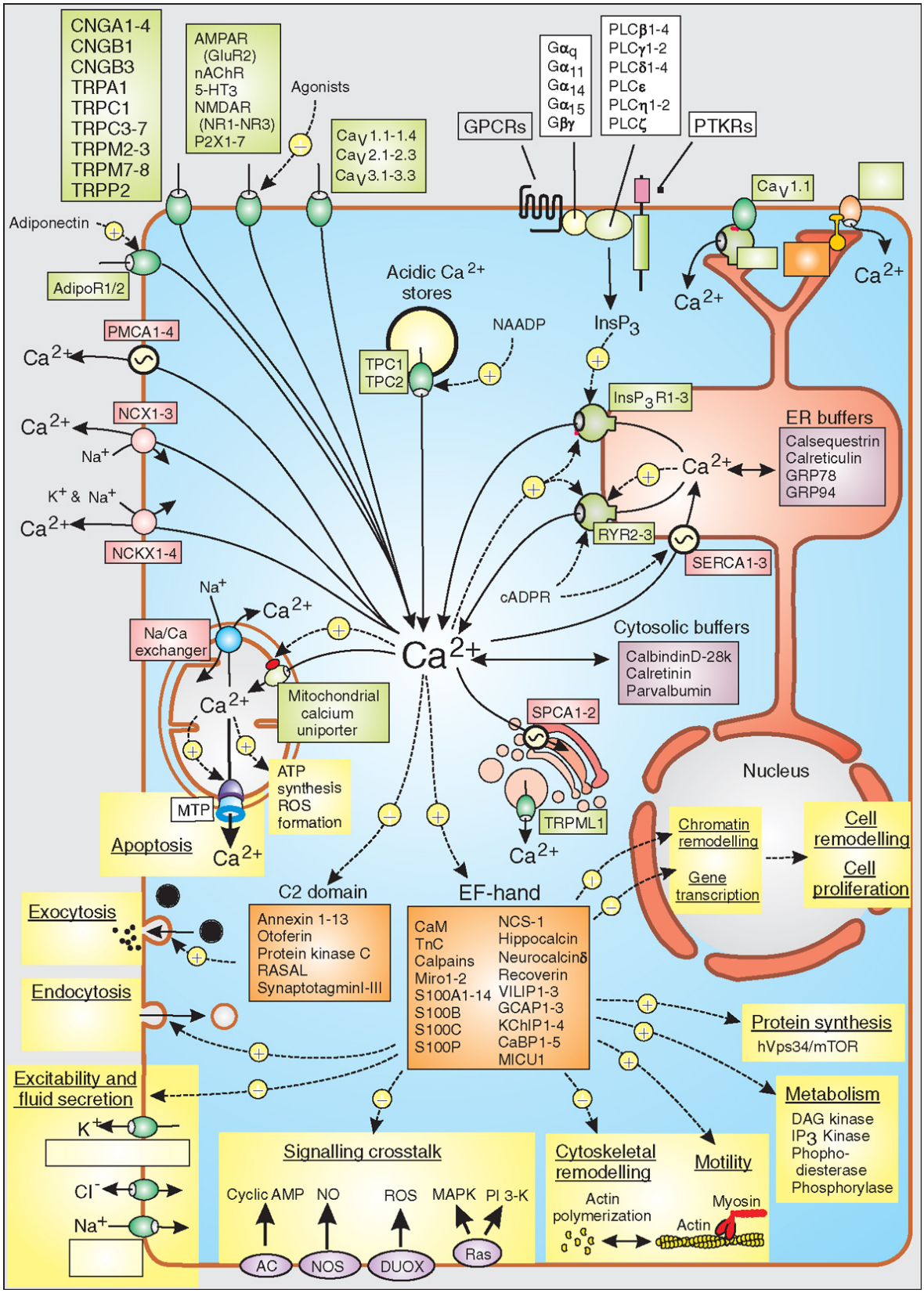
Kompartment	**Stężenie [μM]**	
	Spoczynek	**Aktywacja**
Cytozol	**0.05–0.1**	**0.5–2**
ER	**0.5**	**0.1**
Mitochondria	**0.2**	**1–500**
Jądro komórkowe	**0.1**	**2**
Aparat Golgiego	**0.3**	**0.2**
Przestrzeń zewnątrzkomórkowa	**2000**	**∼2000**

Tablica 1.4: Stężenie jonów wapnia w poszczególnych kompartmentach komórek eukariotycznych w czasie spoczynku i w wyniku aktywacji sygnalizacji wapniowej [163].

bardzo wydajnie wiążą wolne jony wapnia (Rozdz. 1.6.1). Do siateczki śródplazmatycznej Ca^{2+} pompowany jest przez kolejną Ca^{2+}-ATPazę (SERCA), różniącą się od tej występującej w błonie plazmatycznej przede wszystkim wydajnością (ATP/Ca^{2+} = 1:2). Jony Ca^{2+} zmagazynowane wewnątrz siateczki również wiązane są z określonymi białkami buforującymi: kalsekwestryną i kalretikuliną (Tab. 1.5). Wapń magazynowany jest również w mitochondriach, aparacie Golgiego i jądrze komórkowym. Transport wapnia do mitochondriów - drugiego pod względem znaczenia magazynu jonów wapniowych w komórce, kontrolowany jest przez multimeryczne białko - uniporter mitochondrialny, opisany szczegółowo w rozdziale 1.6.4. Transport jonów na zewnątrz kontrolują mitochondrialne wymienniki sodowo-wapniowe. Szczegółowy opis mechanizmów transportu jonów wapnia -z i -do magazynów retikularnych i mitochondrialnych znajduje się w rozdziałach 1.6.3 i 1.6.4. Wymienione wyżej mechanizmy współuczestniczą w zachowaniu homeostazy wapniowej w komórce i pozwalają na zachowanie stałego stężenia tych jonów w cytozolu (w wysokich stężeniach Ca^{2+} jest cytotoksyczny).

W komórkach niepobudliwych mobilizacja Ca^{2+} w komórce ma charakter dwufazowy. Pierwszą fazę stanowi opisany w rozdziale 1.3.2 szlak sygnalizacyjny, w którym aktywacja receptora metabotropowego, sprzężonego z białkiem G prowadzi do aktywacji fosfolipazy C, produkcji IP_3 i uwolnienia jonów wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych. Komórki pobudliwe charakteryzują się tym, że odpowiednie kanały jonowe

- bramkowane ligandem, bądź napięciem znajdują się w ich błonie komórkowej i odpowiedni sygnał aktywuje napływ jonów wapnia ze środowiska zewnątrzkomórkowego do cytozolu. Jak już wspomniano stężenie jonów wapnia w cytozolu jest niskie i wynosi $\sim$ 50 - 100 nM. Podczas aktywacji wzrasta średnio dziesięciokrotnie do 1-2 μM. Siateczka śródplazmatyczna jest magazynem jonów wapna, więc pobudzenie powoduje ich uwolnienie, co oznacza, że stężenie tych jonów spada z 0.5 μM do 0.1 μM. Mitochondria w stanie spoczynkowym akumulują niewielkie ilości Ca^{2+} (0.2 μM), ale podczas aktywacji sa w stanie bardzo wydajnie akumulować uwolnione do cytozolu jony wapnia i stężenie ich rośnie w macierzy mitochondrialnej do 1 μM. W ekstremalnych przypadkach mitochondria mogą pomieścić o wiele większe ilości tych jonów - nawet do 500 μM. Stężenie wapnia w pozostałych kompartmentach przed pobudzeniem i w trakcie aktywacji przedstawiono w Tab. 1.4 [163].



Rycina 1.10: Mechanizmy komórkowe zaangażowane w transport Ca^{2+} [23, 46].

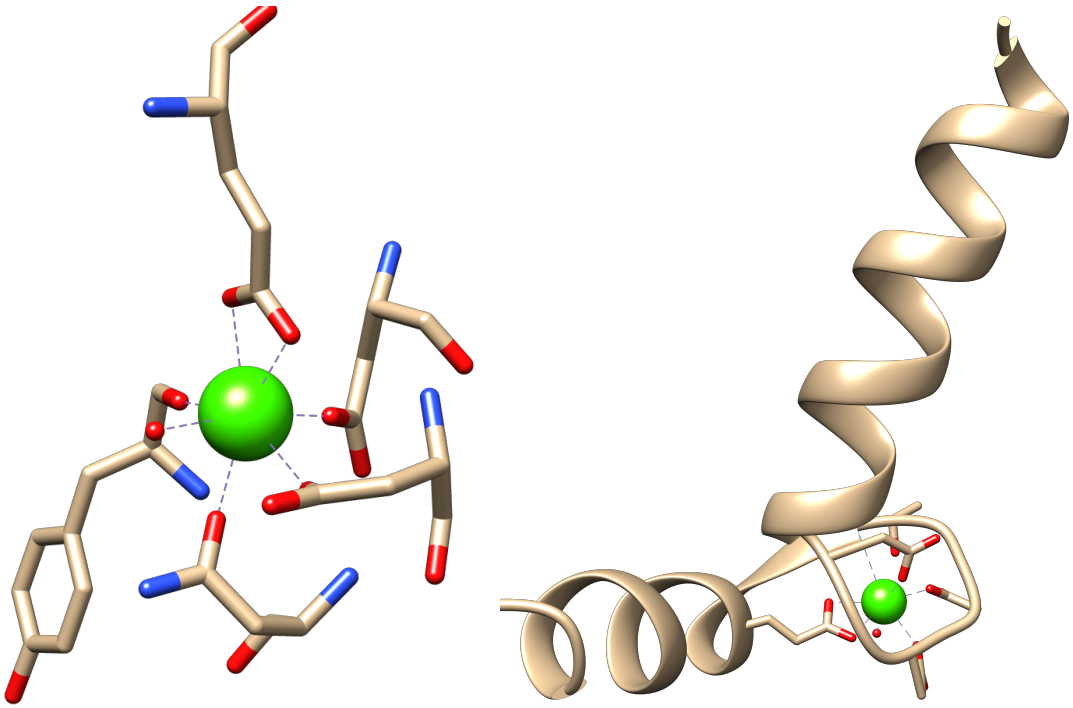
1.6.1 Bufory i sensory wapniowe

Stężenie wolnych jonów wapnia w cytozolu utrzymywane jest na niskim poziomie także przez odwracalne i selektywne wiązanie tych jonów przez wielkocząsteczkowe białka lub nieorganiczne związki chemiczne. Białka takie określane sa ogólnie jako CaBP (ang. **ca**lcium **b**inding **p**roteins). Wydajność wiązania Ca^{2+} pozwala na zaszeregowanie do jednej z grup, określanych jako - **bufory wapniowe** lub **sensory wapniowe** (Tab. 1.5). Bufory to bardzo zróżnicowana grupa związków, których zadaniem jest związać jak największą ilość jonów wapnia. Z reguły robią to za pomocą sił elektrostatycznych, eksponując na powierzchni negatywnie naładowane reszty aminokwasowe, które oddziałują z dodatnio naładowanymi jonami wapnia. Sensory służą jako cząsteczki wykrywające obecność jonów wapnia. Zdolność do wykrywania lub buforowania wolnych jonów wapnia zależy od poziomu ekspresji i kombinacji wielu rodzajów białek wiążących wapń obecnych w komórce, przez co poziom związanych i wolnych jonów wapnia w różnych typach komórek kształtuje się bardzo różnorodnie. Na przykład komórki Purkinjego - neurony występujące w korze móżdżku - charakteryzują się bardzo wysokim poziomem parvalbuminy i kalbindyny, co w efekcie powoduje, że na każdy jon wolnego wapnia przypada około 2000 zbuforowanych. W innych komórkach stosunek ten utrzymuje się w przedziale 50 – 100:1. Sygnał wapniowy w cytozolu jest bardzo niski. Motoneurony np. mają bardzo niewielkie możliwości buforowania wapnia, co w konsekwencji daje znaczny wzrost poziomu wapnia w cytozolu podczas sygnalizacji.

Obie podgrupy wykorzystują dwa rodzaje motywów strukturalnych, które pozwalają związać jony Ca^{2+}: **motyw EF** oraz **C2**. W niektórych przypadkach (np. kalbindyna) obecność wielu motywów wiążących wapń pozwala funkcjonować w podwójnej roli: jako bufor i sensor.

Motywy EF

Termin "EF-hand" wprowadzono w 1973 roku. Termin ten opisowo przedstawiał reprezentacje wstążkową domeny odpowiedzialnej za wiązanie Ca^{2+} w parvalbuminie. Białka EF-hand stanowią najważniejszą rodzinę białek wiążących wapń (tzw. *„EF-hand calcium binding proteins"*). Jest to bardzo różnorodna i liczna rodzina białek, której przedstawiciele zaliczaja sie z reguły do sensorów Ca^{2+} [302]. Klasycznym przykładem jest tutaj kalmodulina (CaM) (Ryc. 1.12). Motyw wiążący wapń składa się z układu heliks-pętla-heliks, w którym wiązanie wapnia zachodzi właśnie w pętli łączącej helisy, złożonej zwykle z dwunastu aminokwasów 1.11 [110, 201]. Mechanizm wiązania opiera się na dwunastu negatywnie naładowanych atomach tlenu, z reszt hydroksylowych i karbonylowych szkieletu białkowego heliksów i podstawników grup bocznych, które oddziałują elektrostatycznie z jonami wapnia. Z reguły w białku wiążącym wapń występują dwie takie pętle.



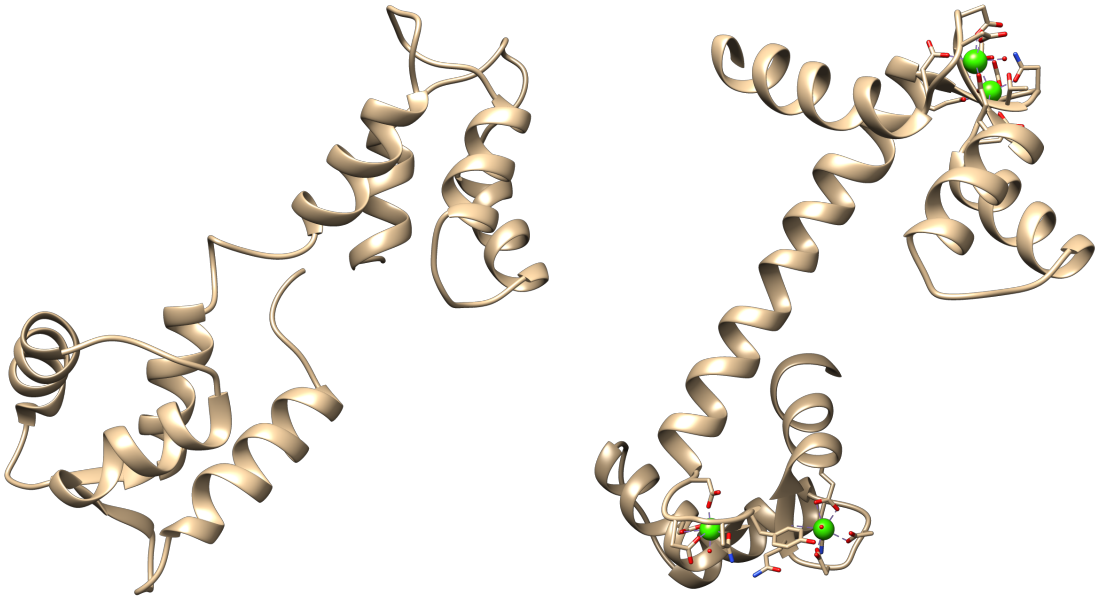
(a) Ułożenie reszt aminokwasowych wiążących Ca^{2+}. Kolor niebieski - atomy azotu, czerwony - atomy tlenu

(b) Heliksy E i F oraz pętla łącząca

Rycina 1.11: Struktura motywu EF-hand.

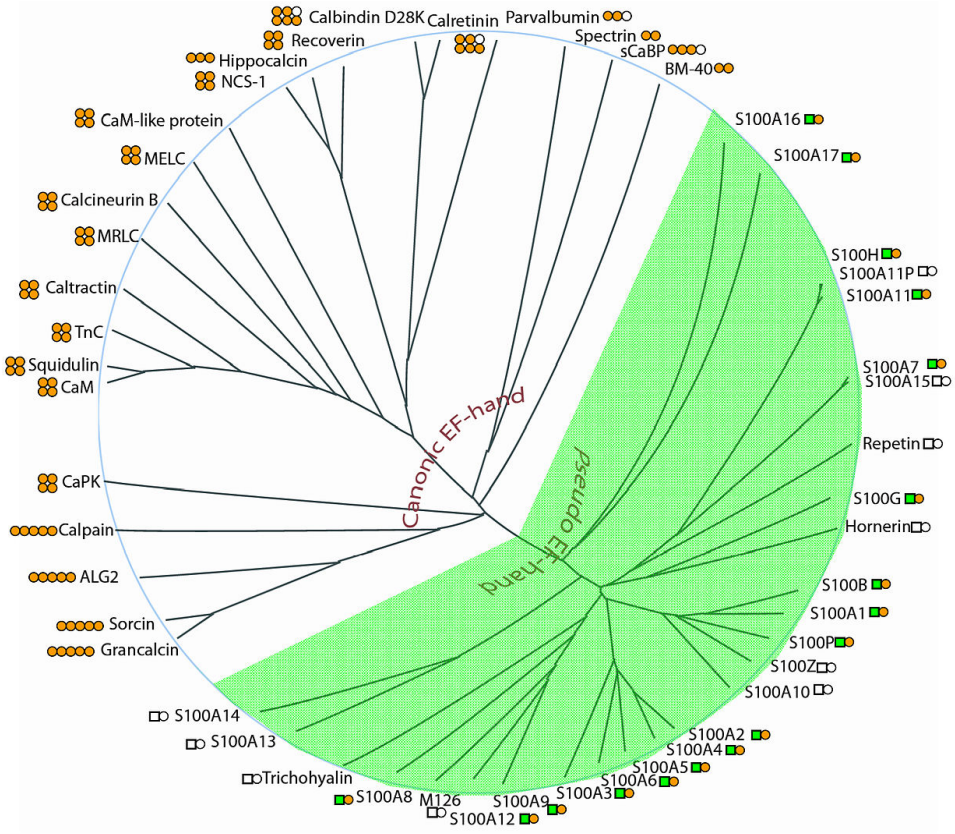
Jeżeli w białku występuje więcej motywów EF (nawet do 12), mamy do czynienia ze zjawiskiem kooperatywnego wiązania jonów wapnia. Związanie jednego jonu zwiększa powinowactwo kolejnych miejsc wiązania [166]. Cząsteczka kalmoduliny zawiera dwie domeny z motywem EF, co sprawia, że wiąże 4 jony wapnia. Stała dysocjacji takiego układu wynosi $K_d \sim 10^{-6}$ M. Po związaniu Ca^{2+} kalmodulina zmienia konformację, eksponując domeny hydrofobowe. Kalmodulina reguluje funkcję i aktywność około 300 białek, m.in.: kalcyneuryny, syntazy tlenku azotu (NOS - ang. ***n**itric **o**xide **s**ynthase*), receptora IP_3R, PMCA [262]. Liczba białek posiadających ten motyw jest olbrzymia. Szacuje się, że jest ich od 600 do kilku tysięcy. Ogólnie można podzielić je na 66 dużych rodzin, liczących sobie kilku, bądź kilkuset przedstawicieli. Pod względem funkcjonalnym zgrupowanych w dwie duże podgrupy (Ryc. 1.13) [309]:

- **Kanoniczne EF-hand** - występujące np. w kalmodulinie (Ryc. 1.11), gdzie 12 reszt pętli stabilizuje jon wapnia poprzez tlen reszt karboksylowych.
- **Pseudo EF-hand** - znajdujące się np. w białkach S100, które posiadają zmodyfikowaną sekwencję pętli aminokwasowej wiążącej wapń.



(a) kalmodulina, bez Ca^{2+} (kod PDB: **1CFD**) (b) kalmodulina z Ca^{2+} (kod PDB: **3CLN**)

Rycina 1.12: Wstążkowa reprezentacja struktury trzeciorzędowej kalmoduliny [15, 156].



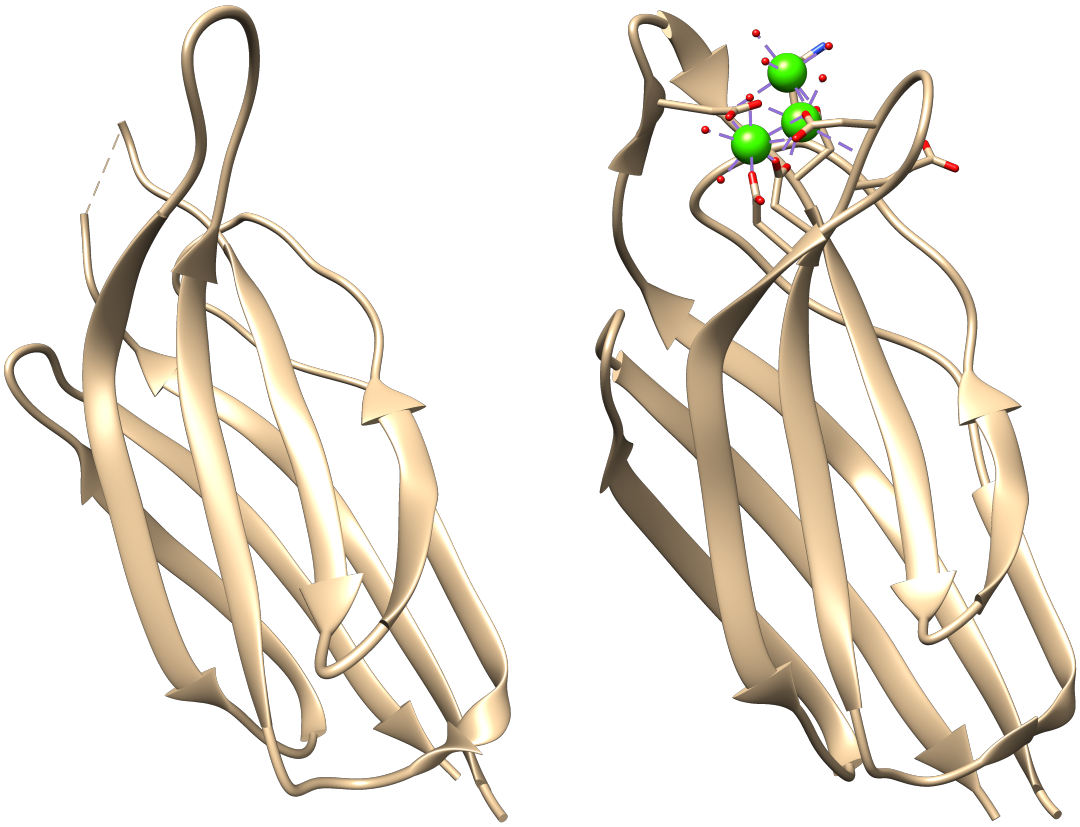
Rycina 1.13: Drzewo filogenetyczne białek z rodziny EF-hand [309].

	M. molowa monomeru [kDa]	Liczba motywów EF-hand/C2	Ilość związanych jonów Ca^{2+}	Stała dysocjacji K_d[M]
Sensory				
kalmodulina	17	4	4	10^{-6}
S100	12	4	4	$10^{-6} - 10^{-7}$
kalcyneuryna	80	4	4	$10^{-6} - 10^{-7}$
NCS	22	4	2	$5\text{-}10^{-6}$
parvalbumina	12	3	2	10^{-7}
kalbindyna-D28k	28	6	4	$10^{-5} - 10^{-6}$
kalbindyna-D9k	9	2	2	$10^{-3} - 10^{-6}$
kalretynina	29	6	4	4×10^{-7}
retikulokalbina	44	6	6	1×10^{-3}
synaptotagmina	47	2	6	$3 - 6\times10^{-4}$
rabfilina	82	2	6	$1 - 2\times10^{-6}$
DOC2	82	2	6	$0.1 - 0.3\times10^{-6}$
perforyna	60	1	3	10^{-4}
UNC-13	180	3	9	–
Bufory				
kalretikulina	55	–	~25 mol Ca^{2+}/mol Pr	2×10^{-5}
Grp94	94	–	~19 mol Ca^{2+}/mol Pr	2×10^{-6}
BIP/Grp78	78	–	~1-2 mol Ca^{2+}/mol Pr	10^{-5}
Kalneksyna	80	–	–	$5\text{-}10^{-5}$
ERp72	72	–	~12 mol Ca^{2+}/mol Pr	10^{-5}
kalcystoryna/PDI	55	–	~23 mol Ca^{2+}/mol Pr	$2\text{-}5\times10^{-3}$
kalsekwestryna	55	–	~30 – 80 mol Ca^{2+}/mol Pr	1×10^{-3}

Tablica 1.5: Bufory i sensory wapniowe. Ilość związanych jonów wapnia dla sensorów odpowiada liczbie pojedynczych jonów, natomiast dla buforów wyrażona jest w ilości moli Ca^{2+} na 1 mol białka (Pr) [7, 34, 64, 112, 113, 121, 160, 210, 226, 227, 243, 302].

Motywy C2

Domena C2 liczy ∼120 aminokwasów o silnie konserwowanej sekwencji (Ryc. 1.14). To charakterystyczny motyw złożony z ośmiu anty-równoległych β-kartek, jedna na drugiej. Tego typu układy zdolne są wiązać od dwóch do trzech jonów wapnia. Wiązanie następuje w pętlach utworzonych z wolnych łańcuchów aminokwasów występujących pomiędzy β-kartkami. Występują z reguły w białkach, które wykorzystują ładunek Ca^{2+} do przemieszczenia się w pobliże dwuwarstwy lipidowej, np. fosfolipaza C, synaptotagmina, białkowa kinaza C [199, 277].



(a) C2 bez Ca^{2+} (kod PDB: **3W56**) (b) C2 z Ca^{2+} (kod PDB: **3W57**)

Rycina 1.14: Wstążkowa reprezentacja struktury trzeciorzędowej motywu C2 [277].

Kilka jonów potrafi wytworzyć pole elektrostatyczne, pozwalające znacznie przyśpieszyć wiązanie z białkami na powierzchni błony komórkowej (np. w przypadku fosfolipazy, która wykorzystuje domenę C2 do zbliżenia się do inozytolu na powierzchni błony). Związanie Ca^{2+} w pętlach obniża negatywny ładunek białka i pozwala na penetrację dwuwarstwy lipidowej przez reszty hydrofobowe i aromatyczne.

1.6.2 Przepływy wapnia z i do komórki

Poziom jonów wapnia w komórce podlega ścisłej regulacji. Stężenie tych jonów w środowisku zewnątrzkomórkowych wynosi w przybliżeniu ∼ 2mM, z kolei w cytozolu, podczas spoczynku jest stosunkowo niskie i wynosi 20 – 100 nM w zależności

od rodzaju komórki. Tak niski poziom wapnia jest konieczny ze względu na obecność fosforanów, których sole z wapniem są słabo rozpuszczalne, więc dochodziłoby do precypitacji i utraty tych ważnych dla komórki związków. Duży gradient stężenia Ca^{2+} występuje także pomiędzy cytozolem, a siateczką śródplazmatyczną. Stężenie Ca^{2+} w ER jest ok. 1000 razy większe niż w cytoplazmie i wynosi $\sim$0.5 – 1 mM. Stężenie wapnia w mitochondrium waha się pomiędzy 50 – 500μM (Ryc. 1.10) [46]. Szereg wyspecjalizowanych białek (Rozdz. 1.2) zaangażowanych jest w utrzymaniu „status quo", czyli niskiego poziomu wapnia w cytozolu. Tworzą układ pomp, kanałów i wymienników, które kontrolują stężenie Ca^{2+} w cytozolu, utrzymując jego poziom w stanie równowagi dynamicznej. Sygnał wapniowy tworzą poszczególne przepływy: napływ jonów wapnia ze środowiska zewnątrzkomórkowego do wnętrza komórki oraz wypływ, uwalnianie z magazynów wewnątrzkomórkowych i transport w przeciwnym kierunku.

Wapń do większości typów komórek napływa głównie poprzez **kanały bramkowane napięciem** (VGCC) [306] lub **ligandem** (LGCC) [296], znajdujące się na błonie komórkowej. Istnieje jednak szereg innych mechanizmów napływu jonów wapnia, które wykorzystują wyspecjalizowane białka/kanały np.: kanały wapniowe zależne od receptorów (ROCC) [246], kanały pojemnościowego napływu wapnia (SOCEC) [209], kanały TRP [214].

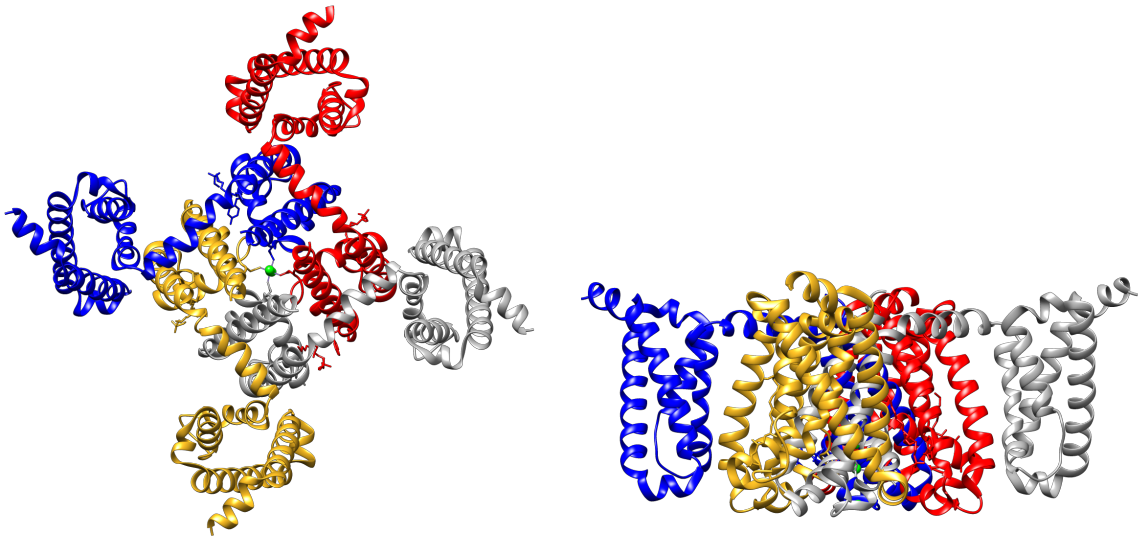
Typ kanału	Miejsce występowania	Opis
Typ L (Ca_V 1.1-1.4)	komórki mięśniowe oraz inne komórki zwierzęce	aktywacja przy wysokim potencjale błony,regulacja skurczu komórek mięśniowych
Typ N (Ca_V 2.2)	neurony	aktywacja przy wysokim potencjale błony; wolniejsza inaktywacja niż kanały T; sekrecja neurotransmitterów
Typ P (Ca_V 2.1)	neurony gruszkowate (Purkinjego) inne kom. nerwowe	napięcie, fosforylacja, białka G; uwalnianie neurotransmitterów w szczelinach presynaptycznych, również znajdowane we włóknach Purkinjego serca.
Typ Q (Ca_V 2.1)	komórki ziarniste móżdżka	wysoki poziom aktywacji i relatywnie niska kinetyka.
Typ R (Ca_V 2.3)	komórki ziarniste móżdżka	wysoki poziom aktywacji i relatywnie niska kinetyka działania.
Typ T (Ca_V 3.1-3.3)	powszechnie w komórkach zwierzęcych	aktywacja przy niskim potencjale błony, regulacja wejścia wapnia przy ujemnym potencjale błony

Tablica 1.6: Lista ważniejszych kanałów wapniowych, bramkowanym napięciem, występujących w komórkach eukariotycznych [86, 189, 253, 304].

Kanały bramkowane napięciem (VGCC)

Kanały **VGCC**, które określane są również jako $\mathbf{Ca}_V$, występują w dużych ilościach w błonach komórek pobudliwych i stanowią niezbędny element prawidłowego funkcjonowania neuronów, gleju, mięśni szkieletowych, serca czy gruczołów wewnątrzwydzielniczych. Z reguły nie działają jako osobne kanały, lecz kooperują ściśle z innymi rodzajami kanałów jonowych - potasowymi i sodowymi lub kanałami aktywowanymi neuotransmiterami, wspierając potencjał czynnościowy (w neuronach) lub stanowiąc główną jego część (mięśnie serca). Ich otwarcie następuje w wyniku zmiany potencjału błonowego w stosunku do potencjału spoczynkowego komórki (-70 mV). VGCCs składane są z kilku podjednostek, które tworzą heteromultimery (najczęściej występujący kanał typu L składa się z się z pięciu podjednostek). Rdzeń kanału stanowi podjednostka α_1 złożoną z czterech domen formujących pierścień w błonie białkowo-lipidowej o wielkości 170-250 kDa. Każda z domen zawiera 6 transbłonowych motywów o strukturze α-helisy (Ryc. 1.15). Co czwarty heliks posiada pozytywnie naładowane krótkie sekwencje transbłonowe o właściwości czujnika jonów Ca^{2+}. Już pojedynczy

pierścień ma funkcjonalność kanału jonowego, ale z reguły podjednostka α sprzężona jest dodatkowo z innymi podjednostkami (np. α_2, β, γ, δ), które modyfikują kinetykę aktywacji/dezaktywacji i lokalizację kanału (Tab. 1.6) [269, 301].



Rycina 1.15: Struktura czwartorzędowa kanału bramkowanego napięciem (kod PDB: **4MW3**). Kolorami oznaczono poszczególne łańcuchy tetrameru [269].

Typ kanału	**Typ L**	**Typ N**	**Typ P**	**Typ Q**	**Typ R**	**Typ T**	Referencje
	Ca_V 1.1-1.4	**Ca_V 2.2**	**Ca_V 2.1**	**Ca_V 2.1**	**Ca_V 2.3**	**Ca_V 3.1-3.3**	
Przewodność [pS]	25	11–20	9–20	15–16	15–20	8	[249]
Selektywność (Ca^{2+}>Ba^{2+})	2:1	2:1	2:1	–	1.3:1	1:1	[249]
Potencjał aktywacji [mV]	-10 – -50	-20	-50	-50	-25 – -40	-70	[249]
Czas deaktywacji [s]	0.15–2	0.1–0.2	0.5–1	0.5–1	0.05–0.1	0.01–0.07	[249]
Antagoniści (IC50) [μM]							
ω-konotoksyna MVIIA	brak	0.078–1	brak	brak	brak	brak	[225, 249]
ω-konotoksyna GVIA	brak	0.028–2	brak	brak	brak	brak	[225, 249]
ω-agatoksyna AgaIVA	brak	brak	0.015	0.05–1	0.05	brak	[225]
ω-konotoksyna MVIIC	brak	0.018	0.018	0.05–1	brak	brak	[190, 225]
ω-agatoksyna AgaIIIA	0.001	0.001	ND	ND	brak	brak	[81]
SNX-482	brak	brak	0.03–0.75	0.03–0.75	0.015–0.03	brak	[11, 225]
Nimodypina	0.135–2.6	brak	brak	brak	brak	5–11	[38, 94, 261]
Nifedypina	0.1	brak	brak	brak	brak	39	[261]
Efonidypina	10	brak	brak	brak	brak	1.3–13	[94, 187]
Amplodypina	3–5	brak	brak	brak	brak	4–13	[94, 158]
Nikardypina	9–26	brak	32–97	32–97	brak	5–13	[95]
Verapamil	0.6–1	brak	brak	brak	brak	20–30	[38, 90]
Diltiazem	3–33	brak	brak	brak	brak	30	[38]
Mibefradil	1.7–21	brak	208	208	brak	0.5–11	[1, 299]

Tablica 1.7: Podział kanałów bramkowanych napięciem ze względu na wrażliwość na inhibitory i właściwości fizyko-chemiczne. Dane z IUPHAR-DB oraz [120, 253].

Istnieje kilka rodzajów VGCCs, które są strukturalnie homologiczne, lecz nie identyczne konstrukcyjnie. Wyszczególniono pięć podtypów kanałów VGCC, które różnią się właściwościami fizjologicznymi (np. czas otwarcia, przewodność i wrażliwość na potencjał) oraz wrażliwość na niektóre inhibitory. W zależności od tych różnic VGCCs dzielimy na kanały L, N, P, Q, R i T (Tab. 1.6). Np. kanały typu L, są wrażliwe na zablokowanie przez 1,4-dihydropirydynę (DHP), ale nie przez ω-konotoksynę, wyizolowana z jadu ślimaka *Conus geographus* (ωCTX) lub ω-agatoksynę, wyizolowaną z jadu węży grzechotnikowatych (ωAGA). Dane dotyczące pozostałych typów kanałów znajdują się w Tab. 1.7 [120, 253].

Jak już wspomniano, kanały VGCCs aktywowane są zmianą potencjału elektrycznego na powierzchni błony komórkowej. Zmiana wpływa na układ sensorów jonów Ca^{2+} w α-helisach, dochodzi do zmiany konformacji i otwarcia kanału. Jony wapnia swobodnie przemieszczają się ze środowiska zewnątrzkomórkowego do cytozolu zgodnie z gradientem stężenia [159]. Wapń wchodzący do komórki przez VGCC inicjuje dalsze etapy propagowania sygnału w komórce, poprzez aktywację mechanizmów efektorowych: kinaz białkowych, białek sensorowych i innych przekaźników drugiego rzędu.

Kanały te są wysoce selektywne, mimo to bardzo szybkie i mogą powodować lokalnie duży wzrost stężenia wapnia: >1 mM w odległości ~1μm od ujęcia wylotu kanału [221].

Kanały bramkowane ligandem (LGCC)

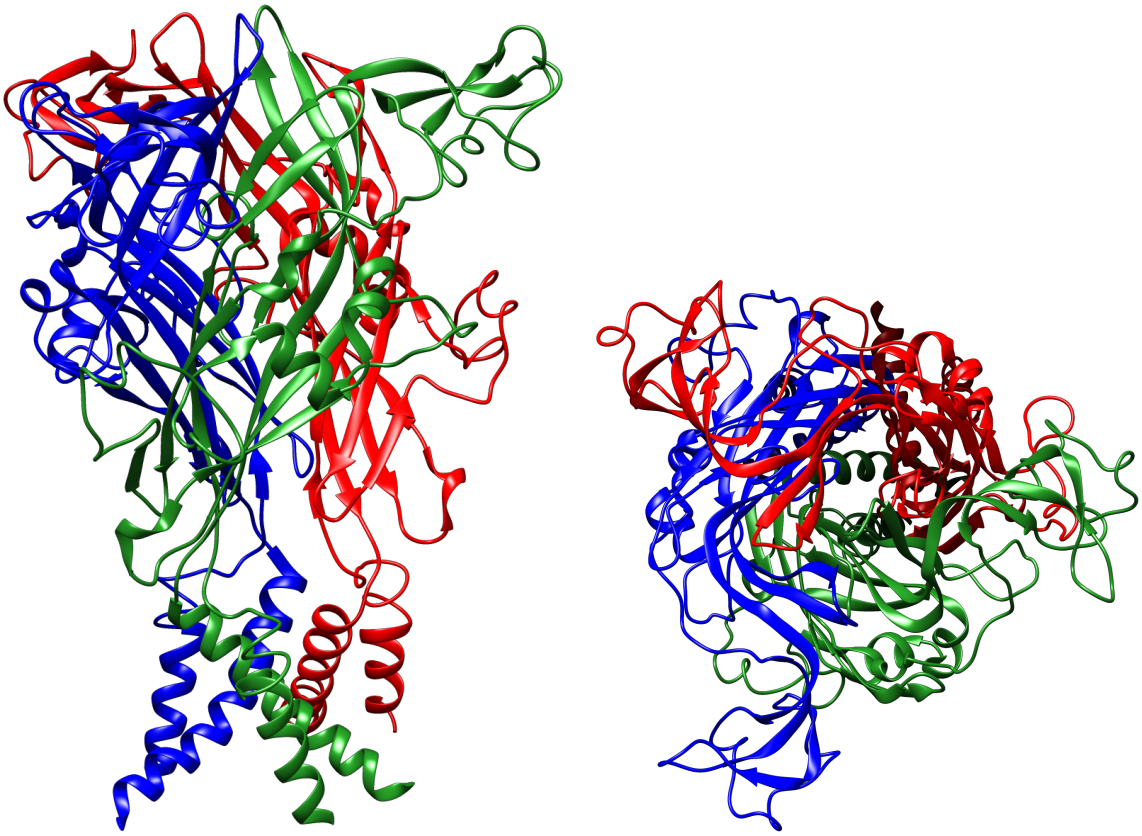
Inną grupą kanałów, które uczestniczą w transporcie wapnia do wnętrza komórki jest grupa tzw. receptorów jonotropowych lub kanałów jonowych bramkowanych ligandem (LGCC). W wyniku wiązania ligandu z domeną receptorową, która znajduje się w miejscu allosterycznym białka z dala od samego kanału, receptor jonotropowy zmienia swoją konformację, w tym domen tworzących kanał jonowy. Kanał otwiera się umożliwiając napływ kationów (Ca^{2+}, K^+, Na^+) lub anionów (Cl^-), które przenikają przez błonę komórkową zgodnie z gradientem stężeń. Ze względu na specyficzny charakter wiązania receptora do ligandu, kanały te dzielimy właśnie według cząsteczki transmitera, który go aktywuje. Są to: acetylocholina (Ach), serotonina (5-HT), kwas γ-aminomasłowy (GABA), kwas glutaminowy oraz nukleotydy purynowe (np. ATP). Większość z wymienionych typów receptorów może transportować jony wapnia, jedynie receptopry GABA sprzężone są z kanałami transportującymi jony chlorkowe, zostaną więc pominięte w dalszym opisie.

Pod względem strukturalnym wyróżnić możemy trzy kategorie receptorów jonotropowych, w których kanał jonowy tworzony jest przez pięć, cztery i trzy podjednostki. Do jednej z rodzin należą tzw. receptory o budowie **pentamerycznej**, do której należą nikotynowe receptory cholinergiczne (nAChR - ang. ***n**icotinic **a**cetyl**ch**oline **r**eceptors*) [19, 292], serotoninergiczne typu 3 (5-HT_3R - ang. *5-**h**ydroxy**t**ryptamine*

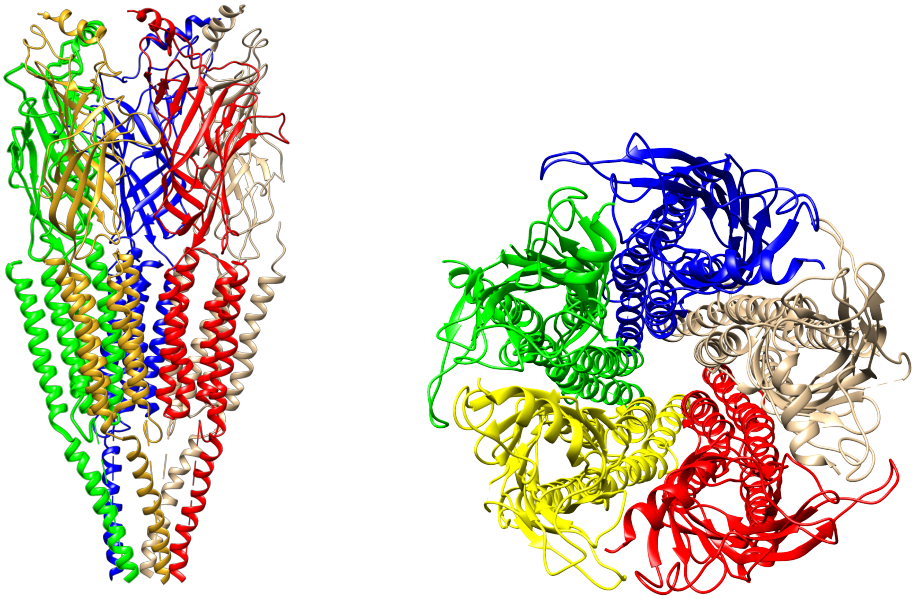
***r**eceptors*) [217]. **Tetrameryczne** receptory glutaminergiczne (AMPAR - ang. *α-**a**mino-3-hydroxy-5-**m**ethyl-4-isoxazole**p**ropionic **a**cid **r**eceptor*; NMDAR - ang. ***N**-**m**ethyl-**D**-**a**spartate **r**eceptor*) stanowią kolejną podgrupę [174] oraz **trymeryczne** receptory purynergicze (P2X) [79, 138, 204].

Nazwa	Agonista	Warianty podjednostek	Referencje
		Pentamery	
nAChR	acetylocholina	$(\alpha_1)_2\beta_1\delta\varepsilon$, $(\alpha_3)_2\beta_1\delta\gamma$ $(\alpha_3)_2(\beta_4)_3$, $(\alpha_4)_2(\beta_2)_3$ $(\alpha_7)_5$	[19, 292]
$5HT_3$	serotonina	$5\text{-}HT_{1-7}$	[217]
		Tetramery	
NMDAR	kwas N-metylo-D-asparaginowy	NR1-1a,NR1-1b NR1-2a,NR1-2b NR1-3a,NR1-3b NR1-4a,NR1-4b	[162, 174]
AMPAR	α-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolo-propionowy	GluR1–4	[174]
		Trimery	
P2X	nukleotydy purynergiczne	$P2X_{1-7}$	[79, 138, 204]

Tablica 1.8: Podział i struktura receptorów bramkowanych ligandem



Rycina 1.16: Struktura czwartorzędowa kanału bramkowanego ligandem P2X (kod PDB: **3I5D**). Kolorami oznaczono poszczególne łańcuchy trimeru [146].



Rycina 1.17: Struktura czwartorzędowa kanału nAChR (kod PDB: **2BG9**). Kolorami oznaczono poszczególne łańcuchy pentameru [281].

Pompa plazmatyczna (PMCA)

W komórce obecne są dwa oddzielne mechanizmy usuwania wapnia: za pomocą białka ATPazy, który jest pompę wapniową i wymiennika jonowego. Pozwala to na utrzymanie bardzo niskiego stężenia jonów wapnia w cytozolu, które jest utrzymywane na poziomie 50-100 nM.

Pompa wapniowa zlokalizowana na błonie komórkowej należy do rodziny ATPaz typu P, do której należą trzy rodzaje pomp wapniowych: PMCA (pompy błony komórkowej), SERCA (pompy magazynów wewnątrzkomórkowych) i SPCA (pompy na powierzchni aparatów Golgiego). PMCA składa się z 10 transbłonowych domen, przy czym obydwa końce: NH2, i COOH znajdują się od strony cytoplazmatycznej. Cytoplazmatyczny fragment pompy zawiera 3 ważne rejony: pętlę cytoplazmatyczną, pełniącą istotną rolę podczas cyklu transportowego, centrum aktywne z asparaginianem w pozycji D465 (ten aminokwas ulega fosforylacji) oraz domeną regulatorową na końcu karboksylowym [70, 114].

ATPazy charakteryzuje wysokie powinowactwo do jonów Ca^{2+}, mechanizm działania opiera się o wykorzystanie energii zawartej w ATP, która pozwala usunąć wapń z cytoplazmy [31]. W trakcie cyklu pracy pompy wytwarzany jest nietrwały związek pośredni, który powstaje z reszty fosforanowej z ATP i reszty asparaginianu, który znajduje się w centrum aktywnym enzymu. W wyniku fosforylacji enzym zmienia konformację i zmniejsza się jego powinowactwo do jonów wapnia, które pierwotnie wiążą się do domen po cytoplazmatycznej stronie. Zmiana konformacyjna powoduje, że jony wapnia są eksponowane do środowiska zewnętrznego. Zmniejszone powinowactwo powoduje oddysocjowanie jonu. PMCA transportuje jeden jon wapnia podczas jednego cyklu hydrolizy ATP [70].

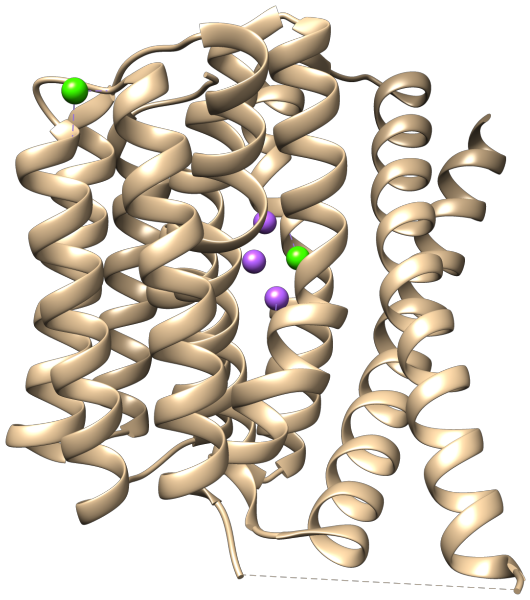
Aktywność PMCA regulowana jest na kilka sposobów. Podstawowym mechanizmem jest fosforylacja reszt serynowych, treoninowych i tyrozynowych przez kinazy typu A (PKC) oraz typu A (PKA). Modyfikacje reszt treoninowych i serynowych zwiększają V_{max} oraz powinowactwo do jonów wapnia, natomiast fosforylacje reszt tyrozynowych hamują aktywność pompy [70]. Aktywność PMCA regulowana jest również przez skład lipidowy otoczenia. W szczególności obecność fosfolipidów: 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu (PIP_2) i fosfatydyloseryny. Obecność tych związków obniża stałą półaktywacji pompy do 100 nM. Pompa wapniowa PMCA wchodzi również w interakcje z szeregiem białek, które modyfikują jej aktywność m. in kalmodulina, kalpainy, oraz rodziny białek posiadających tzw. domenę PDZ [229].

Wymiennik Na^+/Ca^{2+} (NCX)

Wymiennik sodowo-wapniowy może znajdować się w jednym z dwóch stanów konformacyjnych: w konformacji skierowanej w stronę przestrzeni miedzybłonowej lub

zewnątrzkomórkowej, oraz konformacji skierowanej w stronę cyzolu/macierzy mitochondrium. Białko posiada trzy miejsca wiązania jonów sodowych i jedno miejsce wiązania jonów wapniowych. Przełączenie pomiędzy konformacjami następuje w dwóch sytuacjach: kiedy wszystkie miejsca wiązania sodu są związane, a miejsce wiązania wapnia wolne lub kiedy miejsce wiązania wapnia jest zajęte, a miejsca wiązania sodu wolne. Otwarcie nośnika w stronę cytozolu powoduje, że wypełniane są miejsca wiązania jonów wapnia (ze względu na niewielką ilość jonów Na^+ w cytozolu). Odwrotnie wygląda sytuacja, kiedy wymiennik znajduje się w konformacji otwartej na zewnątrz komórki. Tam stężenie jonów sodu jest niemal 70 razy wyższe niż stężenie jonów wapnia, więc z większym prawdopodobieństwem obsadzone zostaną wszystkie miejsca wiązana jonów sodu. W ten sposób wprowadzenie zasad dotyczących możliwości zmiany konformacji wytworzyło nośnik jonów, który wykorzystuje ich potencjał chemiosmotyczny do zamiennego przenoszenia ich w poprzek błony biologicznej [5].

Wymiennik **NCX** jest zatem typowym przykładem antyportu drugiego rzędu w komórce. Zużywa energię zmagazynowaną w wyniku przeniesienia trzech jonów sodowych do przetransportowania jednego jonu wapnia na zewnątrz komórki. NCX to wymiennik o bardzo niskim powinowactwie, ale wysokiej sprawności transportowej w stosunku do jonów wapnia. Dlatego ich działanie istotne jest na początku sygnału wapniowego, kiedy stężenie wapnia jest najwyższe. Pozwala to na szybkie usuniecie z cytozolu dużych ilości wapnia. Wykorzystuje ruch do komórkowy ruch jonów sodu zgodny z gradientem stężeń do transportu jonów wapnia wbrew gradientowi [251]. NCX odgrywa szczególną rolę w komórkach pobudliwych, gdzie z dużą wydajnością usuwa znaczne ilości jonów wapnia, który napływa do cytozolu w trakcie aktywacji na styku synaps lub płytki moto-nerwowej [9]. Oprócz jonów wapnia niektóre przenośniki są w stanie transportować potas. Mówimy wówczas o wymiennikach $Na^+/K^+/Ca^{2+}$ (**NCKX**), które stanowią osobną podrodzinę i wymieniają sód na jony potasu i wapnia. U ssaków opisano trzy geny kodujące białka NCX i sześć kodujących białka NCKX [173].



Rycina 1.18: Schemat wstążkowy przedstawiający strukturę wymiennika sodowo-wapniowego. Zielonym kolorem oznaczone zostały jony Ca^{2+}, purpurowym jony Na^+ (kod PDB: **3V5U**) [167].

1.6.3 Przepływy wapnia w magazynach ER

Wypływ wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych aktywowany jest dwoma oddzielnymi mechanizmami. Pierwszy polega na oddziaływania białko-białko i polega na serii zmian konformacyjnych będących efektem tych oddziaływań. Sensory wapnia na powierzchni błony komórkowej (np. kanał $Ca_V1.1$ typu L) oddziałują bezpośrednio z kanałami uwalniającymi wapń, głównie RyR-1, zmieniając konformacje tego ostatniego. Mechanizm ten występuje główne w mięśniach szkieletowych i niektórych neuronach podwzgórza [23]. Drugi mechanizm oparty jest o syntezę przekaźnika drugiego rzędu. Aktywacja receptorów lub kanałów na błonie komórkowej, prowadzi do wytworzenia drugorzędowego przekaźnika dyfundującego w cytozolu i aktywującego uwolnienie wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych. Jednym z głównych przekaźników drugiego rzędu jest sam wapń, który jest w stanie aktywować kanały RyR/IP_3R na drodze **wypływu wapnia indukowanego wapniem** (CICR - ang. **c**alcium **i**nduced **c**alcium **r**elease). Ten autokatalityczny mechanizm jest podstawą utrzymujących się oscylacji wapniowych. Kolejnym ważnym przekaźnikiem drugiego rzędu jest trójfofsatydylo-1,4,5-inozytolu (IP_3) produkowany po wewnętrznej stronie błony komórkowej.

Pobudzenie komórki powoduje aktywacje receptorów błonowych inicjując kaskadę sygnalizacyjną, która uwalnia Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych. Stężenie jonów wapnia w cytoplazmie gwałtownie wzrasta. Wzrost ten spowodowany jest uwalnianiem jonów wapnia z ER za pośrednictwem zlokalizowanych w błonie ER **receptorów trojfofsatydylo-1,4,5-inozytolu** (IP_3R) oraz **receptorów rianodynowych** (RyR). Uwalnianie jonów wapniowych z ER za pośrednictwem IP_3R wymaga związania wtórnego przekaźnika - trojfofsatydylo-1,4,5-inozytolu (IP_3), natomiast receptory RyR aktywowane są poprzez wzrost stężenia wapnia w cytozolu (CICR). Impuls aktywujący klaster receptorów może spowodować lokalną zmianę stężenia wapnia w cytoplazmie, zwaną „iskrą Ca^{2+}" (ang. *blip*), ta z kolei powoduje otwarcie kanałów kolejnych klastrów (ang. *„puf"*) [88] i masowy napływ wapnia do cytozolu. Na skutek pobudzenia komórki wzrost jonów wapnia w cytozolu rośnie do wartości rzędu 0.5–2 μM.

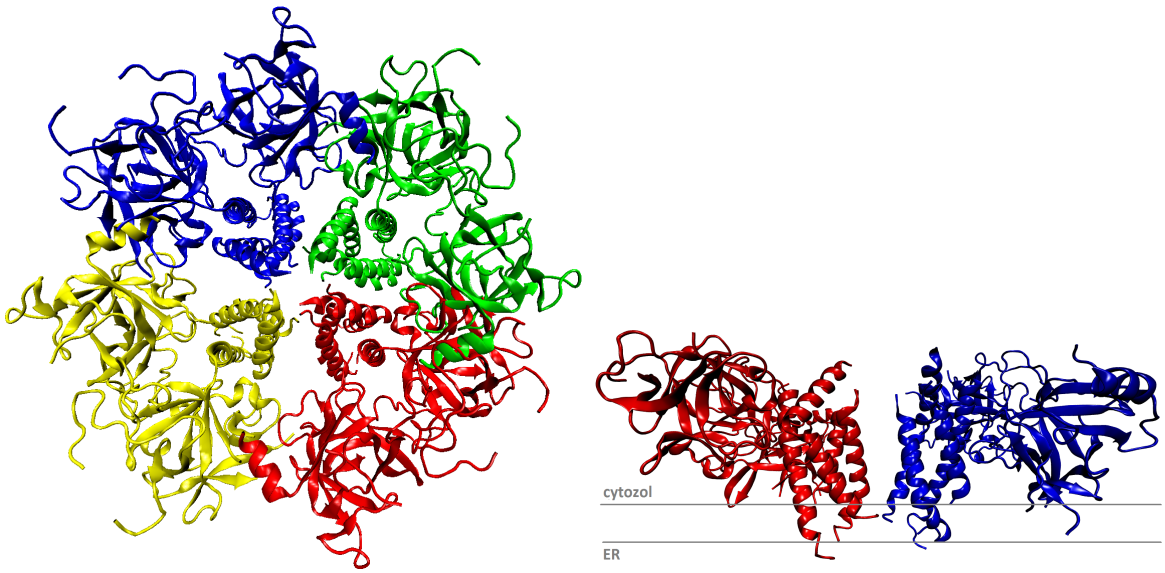
Osobnym zagadnieniem jest wymiana wapnia między cytozolem i mitochondriami. Wysokie stężenie jonów wapnia w mitochondrium związane jest z obecnością dużego gradientu elektrochemicznego pomiędzy wnętrzem mitochondrium - tzw. macierzy, a przestrzenią perymitochondrialną, która znajduje się pomiędzy zewnętrzną (OMM) wewnętrzną błoną mitochondrium (IMM). Różnica potencjałów nosi również nazwę potencjału błonowego mitochondriów i określana jest jako $\Delta\Psi_m$. Pobieranie Ca^{2+} przez mitochondria zachodzi przy udziale wyspecjalizowanego kanału wapniowego - uniportera mitochondrialnego, który wykorzystuje potencjał $\Delta\Psi_m$ do przemieszczenia pozytywnie naładowanych jonów do macierzy. Za uwalnianie jonów wapnia z mitochondrium odpowiadają dwa rodzaje transporterów: wymiennik Na^+/Ca^{2+} oraz wymiennik H^+/Ca^{2+} [163].

Jony wapnia uwalniane są z siateczki po aktywacji jednego z rodzajów kanałów wapniowych. W komórkach pobudliwych często występują kanały rianodynowe (RyR), natomiast w komórkach niepobudliwych receptory IP_3 (IP_3R).

Receptor rianodynowy (RyR)

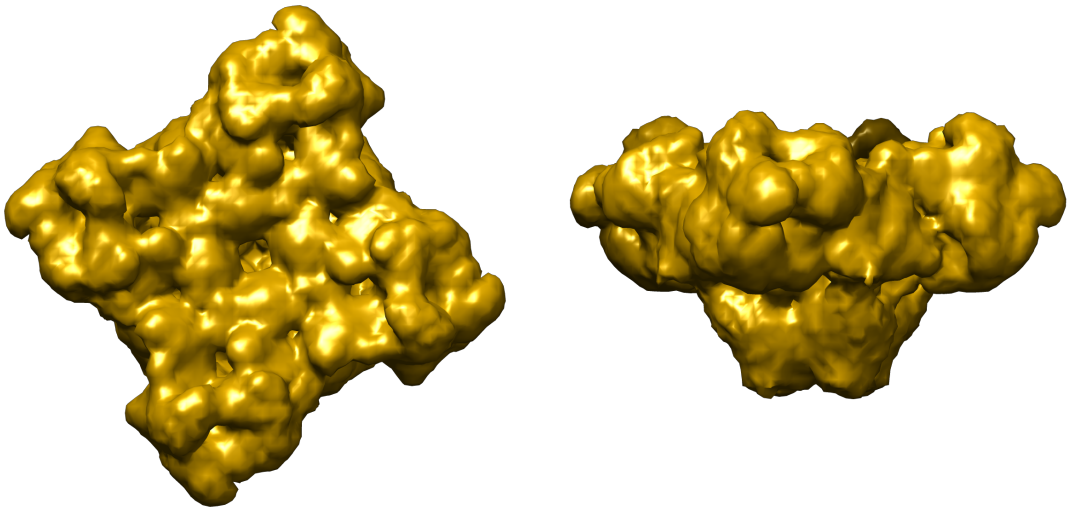
Receptor rianodynowy (Ryc. 1.19) jest bardzo popularnym typem kanału wapniowego, który występuje w większości w komórkach pobudliwych (komórki mięśniowe, kardiomiocyty, komórki Purkinjego). Kanał rianodynowy należy do grupy dużych kanałów jonowych, składa się z czterech monomerów o masie $>$ 2 MDa (każda z czterech podjednostek masę około 550 kDa). RyR zlokalizowany jest w błonie szorstkiej i gładkiej siateczki śródplazmatycznej [20]· Większość tetrameru znajduje się po stronie cytoplazmatycznej (ponad 4/5), a jedynie 1/5 białka stanowią domeny transbłonowe i fragment luminalny [293]. Receptory rianodynowe sklonowano po raz pierwszy z komórek mięśni szkieletowych [185, 268] i kardiomiocytów [206] królika. Wyizolowano trzy izoformy RyR1, RyR2, RyR3 i każda z nich ulega ekspresji na wysokim poziomie w komórkach mięśni szkieletowych, oraz na niższym poziomie w komórkach nerwowych, jądrach, nadnerczach i jajnikach [293]. Istnieje zróżnicowanie w poziomie ekspresji poszczególnych form, np. RyR1 ulega w większości ekspresji w komórkach mięśni i komórkach Purkinjego móżdżka [93, 132, 206, 268], RyR2 ulega ekspresji głównie w kardiomiocytach [12, 13] i komórkach nerwowych [132], natomiast RyR3 ulega ekspresji głównie w neuronach kory mózgowej, w obszarze hipokampa i w komórkach mięśniowych przepony [89, 161, 175]. Sam kanał stanowią domeny transbłonowe, które natywnie tworzą kanał w formie zamkniętej [154]. Kanały RyR modulowane są przez szereg małych cząsteczek, jonów i białek, do których należą m.in.: Ca^{2+}, Mg^{2+}, PKA, kalmodulina, FKBP12/12.6, CaMKII, kalsekwestryna. Tworzą one kompleks makromolekularny, który moduluje strukturę tetrameru, za czym idzie przepustowość jonów wapnia.

Domena N-terminalna zawiera miejsca wiązania szeregu modulatorów (np. białka FKBP12/12.6), które wiążą się do kanału wapniowego w konformacji zamkniętej i stabilizuje go.



(a) Homotetramer - widok z góry (b) Widok horyzontalny dwóch podjednostek

Rycina 1.19: Wstążkowa reprezentacja struktury czwartorzędowej receptora rianodynowego złożonego z czterech podjednostek, które jako homotetramer tworzą kanał wapniowy RyR-1 - dokowanie monomerów przy użyciu oprogramowania **MultiFit Webserver** [274]. Kod PDB monomeru: **2XOA** [280], kod EMDB mapy gęstości elektronowej **EMDB-1606** [239].

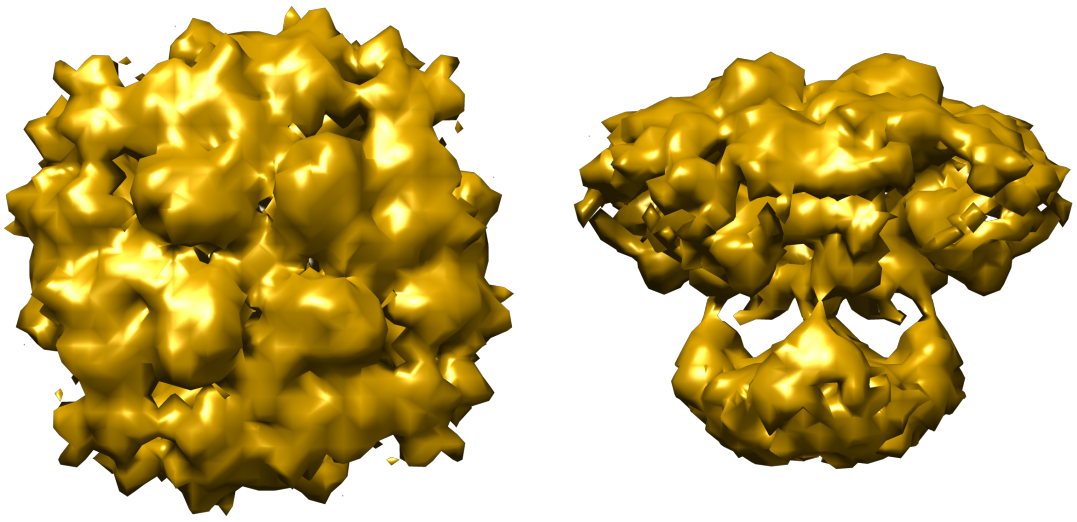


(a) Widok z góry. (b) Widok z boku

Rycina 1.20: Mapa gęstości elektronowej receptora rianodynowego RyR-1 w stanie zamkniętym, uzyskana metodą cryo-EM (kod EMDB: **EMDB-1606**) [239]. Mapa gęstości elektronowej pozwala określić kształt cząsteczki.

Receptor IP_3 (IP_3R)

Aktywacja komórek przez czynniki pozakomórkowe (agonistów) może prowadzić do aktywacji białek G, co z kolei prowadzi do wytworzenia 1,4,5-trifosforanu inozytolu (IP_3). IP_3 jest uważany za ogólny przekaźnik drugiego rzędu, który łatwo dyfunduje w cytozolu. Jego receptor - IP_3R jest z kolei kanałem uwalniającym jony wapnia do cytozolu (Rozdz. 1.6.3). Kanał ten usytuowany jest na błonie retikulum endoplazmatycznego szorstkiego i gładkiego (ER). Jednym z najważniejszych czynników kontrolujących aktywność IP_3R są jony wapnia obecne po cytozolicznej stronie kanału. Dlatego też określane są czasem jako ko-agonista tego kanału. W stężeniach do 300 nM obecność jonów wapnia po cytozolicznej stronie znacznie zwiększa przepuszczalność kanału dla tych jonów. W wyższych stężeniach wapń hamuje aktywność białka [212]. W organizmach wyższych odkryto trzy podstawowe izoformy kanału kodowane przez trzy różne geny. Różne izoformy posiadają bardzo podobną strukturę i funkcję. Różni je wrażliwość na poszczególne regulatory, czy lokalizacja subkomórkowa. Białko odkryto w latach 80-tych poprzedniego stulecia. Pierwsze doświadczenia z białkiem początkowo określanym jako P4000 od razu skojarzone zostało z mechanizmem zwiększania ilości wapnia w cytozolu.



(a) Widok z góry. (b) Widok z boku

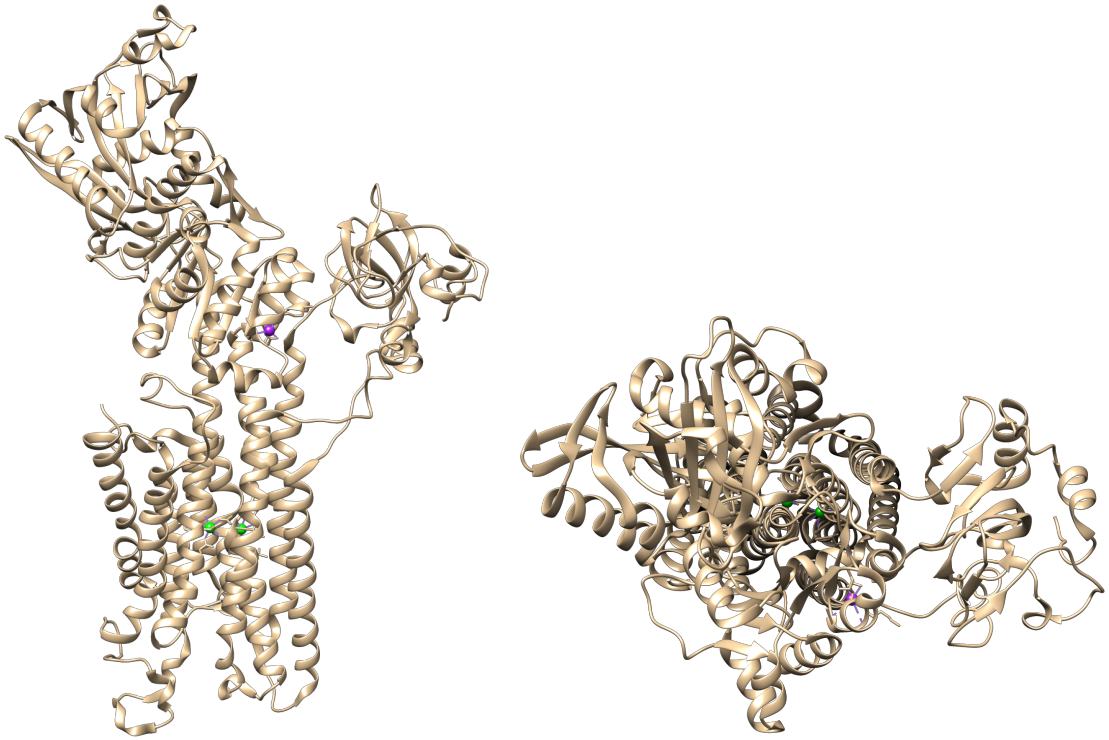
Rycina 1.21: Mapa gęstości elektronowej receptora inozytolo-3,4,5-trifosforanu (kod EMDB: **EMD-5278**) [248].

Wykazano, że w przypadku organizmów zmutowanych, u których ekspresja P4000 nie występuje lub jest znacznie zredukowana dochodzi do szeregu zaburzeń OUN - obumieranie komórek Purkinjego, znacznie zredukowany rozrost dendrytów. Immunoprecypitacja pozwoliła wyizolować białko i dopiero w latach 90-tych udało się wyizolować samo białko i przeprowadzić analizę genetyczną. Sklonowano cDNA o długości 2700 aa,

czyli ∼10 kpz. Oczyszczone białko zostało zanalizowane i po wkomponowaniu w dwuwarstwę lipidową okazało się działać jako kanał wapniowy [194]. Strukturę krystaliczną jądra kompleksu IP_3R z ligandami określono w 2002 roku [30]. Analiza struktury wykazała, że każda z izoform charakteryzuje się innym powinowactwem białka w stosunku do IP_3. Domena odpowiedzialna za wiązanie IP_3 znajduje się w pobliżu N-końca. Jądro kompleksu obejmuje aminokwasy od 226-558 i jest to podstawowa funkcjonalna jednostka odpowiedzialna za wiązanie trifosforanu inozytolu. Badania mutantów receptora IP_3R wskazują na jeden wspólny typ dysfunkcji, który pojawia się po upośledzeniu funkcji kanału lub jego wyciszeniu, czyli występowanie zaburzeń funkcji OUN, napady padaczkowe, obniżona plastyczność neuronalna. Myszy, u których sztucznie wywołano podwójny nokaut genu IP_3R ($IP_3R^{-/-}$) ginęły krótko po narodzinach [145].

Pompa sarko-endoplazmatyczna (SERCA)

Pompa wapniowa jest ATP-azą typu P, która transportuje jony wapnia w kierunku wyższego gradientu gradientu stężenia jonów wapnia w świetle ER. Energia do transportu pochodzi z hydrolizy ATP. Na każdą cząsteczkę ATP zużytą do zmiany konformacji przypadają dwa jony wapnia przetransportowane z cytozolu do ER.



Rycina 1.22: Schemat wstążkowy struktury trzeciorzędowej pompy wapniowej SERCA komórek mięśniowych (kod PDB: **1SU4**)[275].

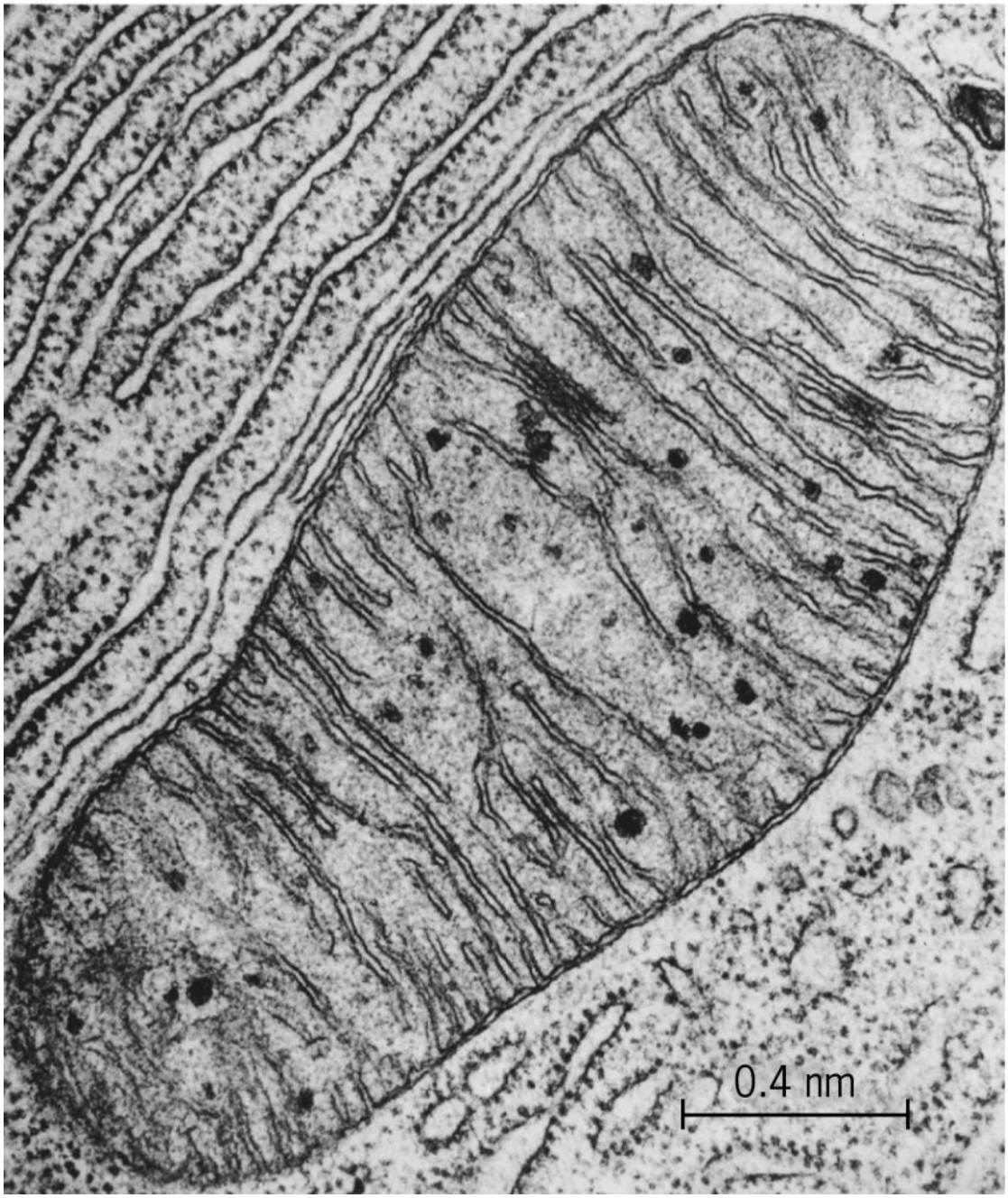
Mechanizm działania SERCA oparty jest o czterostopniowy model. Miejsce hydrolizy ATP położone jest blisko asparaginianu 351, który odbiera resztę fosforanową

z ATP. Miejsce hydrolizy jest znacznie oddalone od miejsca transportowego, wiec kontrola stanu pompy zachodzi w wyniku dużych ruchów domeny wiążącej ATP, która otwiera i zamyka kanał, przez który przechodzi wapń. SERCA transportuje również H^+. Jeden cykl przenosi dwa jony wapnia do lumen i cztery jony wodoru do cytoplazmy [163].

Pompa SERCA występuje głównie w błonie siateczki śródplazmatycznej oraz sarkoplazmatycznej. Podobnie jak wszystkie ATPazy typu P posiada 10 transbłonowych domen z końcami -NH_2 oraz -COOH ułożonymi po stronie cytoplazmatycznej. Aktywacja następuje w wyniku fosforylacji reszty asparaginowej znajdującej się w centrum aktywnym enzymu. SERCA nie zawiera obszaru dodatnio naładowanych reszt w obrąbie pierwszej pętli cytoplazmatycznej, co sprawia, że w przeciwieństwie do PMCA nie oddziałuje z kwasowymi fosfolipidami. Miejsce aktywne znajdujące się w drugiej pętli cytoplazmatycznej zawiera kwas asparaginowy ulegający fosforylacji (patrz Rozdz. 1.6.2) [31, 170].

1.6.4 Przepływy wapnia w magazynach mitochondrialnych

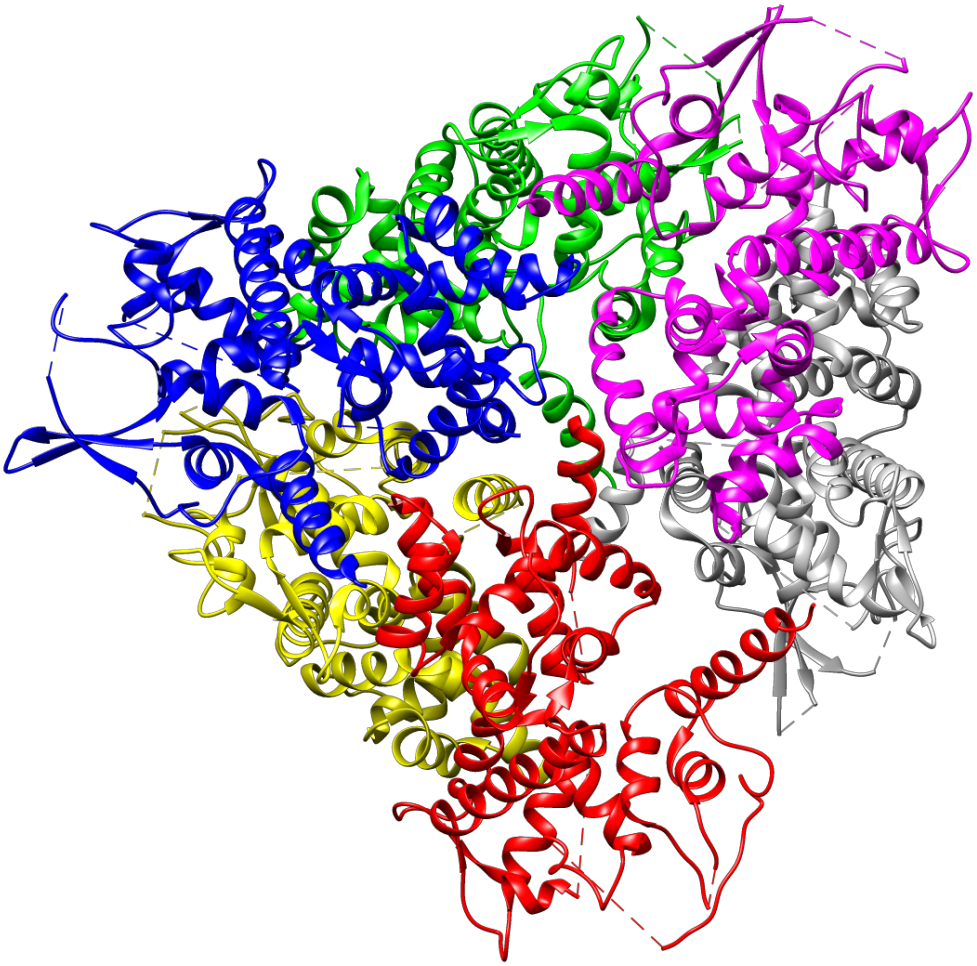
Mitochondria mogą przyjmować w komórce różnorodne kształty. Od małych globularnych struktur do skomplikowanych sieci tubul. Na początku lat osiemdziesiątych, kiedy identyfikowane były podstawowe elementy odpowiedzialne za homeostazę wapniową rola mitochondriów została ograniczona. Uważano, że stanowią magazyn o dużej pojemności, który aktywuje się w sytuacjach patologicznych, gdy jony wapnia „przeładują" cytozol. Uwaga badaczy skierowała się na badaniu aktywności siateczki śródplazmatycznej. Sytuacja zmieniła się, kiedy zaczęto oznaczać poziom wapnia bezpośrednio w macierzy mitochondrialnym. Użycie białka hybrydowego - sensora wapniowego aequoryny i mitochondrialnej sekwencji kierunkowej pozwoliło na precyzyjne pomiary wskazujące, że wzrost poziomu wapnia w mitochondrium odbywa się równolegle ze wzrostem wapnia w cytozolu zanim poziom wapnia osiągnie wielkość progową dla uniportera [233]. Równolegle podobne wyniki uzyskano wykorzystując znaczniki fluorescencyjne z pozytywnym ładunkiem, które lokowały się w macierzy mitochondrialnym ze względu na negatywny ładunek po wewnętrznej stronie IMM (np. rhod-2) [141]. Od ponad dekady wykorzystywane są również białka wrażliwe na obecność jonów wapnia na bazie GFP [198], które pozwalają na śledzenie niewielkich zmian stężenia wapnia. Zastosowanie tych metod pozwoliło na dokładne zbadanie rzeczywistych zmian stężenia wapnia w komórce i zbadanie dynamiki wymiany wapnia dla poszczególnych kompartmentów. Stosując te metody wykazano, że napływ wapnia aktywowany np. agonistą wiąże się również z następującym po nim wzroście stężenia jonów Ca^{2+} w mitochondrium. Proces ten ma miejsce zarówno w komórkach pobudliwych (np. kardiomiocyty [278]), jak i komórkach niepobudliwych (hepatocyty, HeLa [232, 272]).



Rycina 1.23: Mitochondrium i siateczka śródplazmatyczna szorstka - mikrografia [244].

Mitochondrialny uniporter

Mitochondrialny uniporter wapniowy (MCU *ang.* ***m****itochondrial* ***c****alcium* ***u****niporter*) odpowiedzialny jest za pobieranie jonów wapniowych z cytozolu komórki do macierzy mitochondrium. Główną siłę napędową funkcjonowania uniportera jest gradient elektrochemiczny w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej, zwany $\Delta\Psi_m$ = -180mV. Ponieważ wewnętrzna strona IMM naładowana jest ujemnie, transport pozytywnie naładowanych jonów Ca^{2+} kierowany jest do wnętrza mitochondrium. Każdemu przeniesionemu przez IMM jonowi wapniowemu towarzyszy spadek potencjału elektrycznego $\Delta\Psi_m$. Badania techniką „patch-clamp" wykazały, że białko uniportera jest w stanie



Rycina 1.24: Struktura trzeciorzędowa heksameru MICU1, kontrolującego pobór jonów wapnia przez uniporter mitochondrialny (kod PDB: **4NSC**) [290].

tworzyć kanał wapniowy, selektywny dla jonów wapniowych [155]. Obecność selektywnego kanału wapniowego na wewnętrznej błonie mitochondrialnej postulowana już wcześniej, kiedy w latach 80-tych po raz pierwszy zaobserwowano kanał o przewodnictwie elektrycznym ok. 20 pS. Izolacja glikoproteiny o masie 40 kDa pozwalała na rekonstytucję takiego kanału do sztucznych błon lipidowych [59].

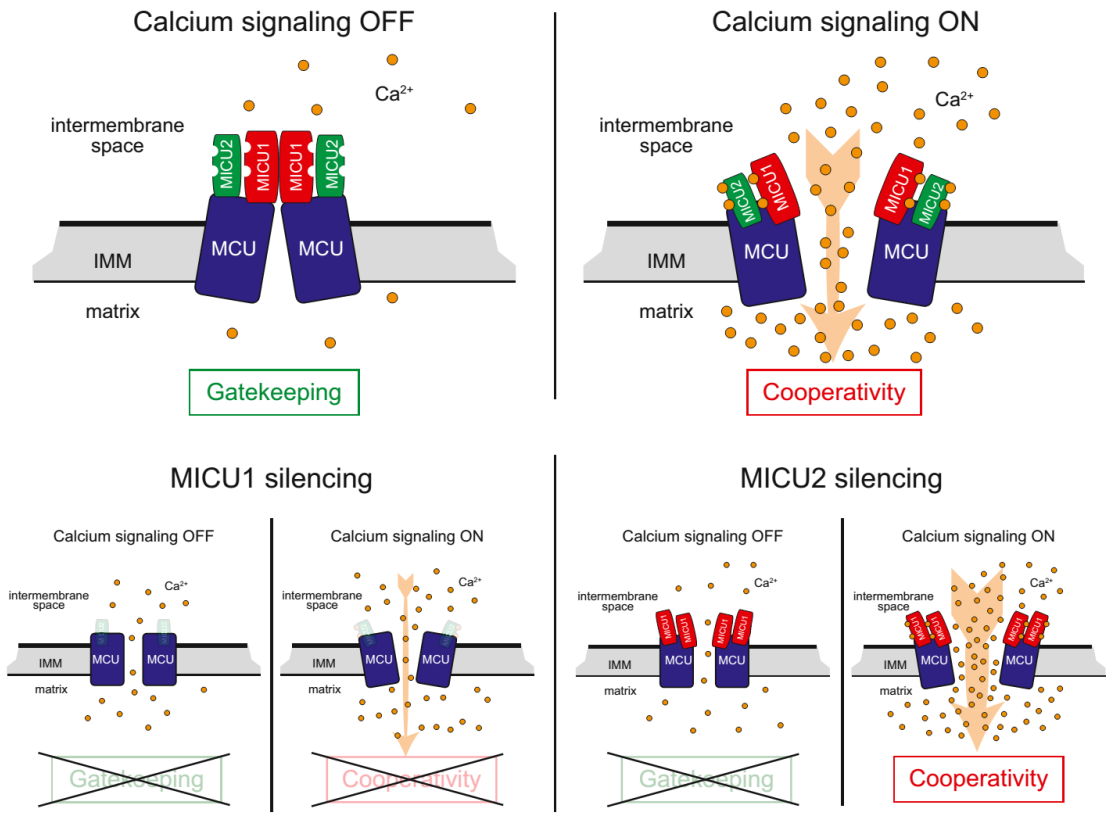
Dane eksperymentalne ostatnich lat potwierdzają, że uniporter mitochondrialny składa się z wielu podjednostek, które pełnią różne funkcje, organizując transport jonów wapnia przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Trzon kanału stanowi podjednostka **MCU**, która może występować w alternatywnej formie - **MCUb** [228]. Z niektórych prac wynika, że MCU oraz MCUb tworzą por przewodzący jony wapnia [42]. **MICU1** to podjednostka o masie 50kDa, regulująca przepustowość kanału, która posiada w swojej strukturze dwa kanoniczne motywy EF-hand [218], które przyłączają jony wapnia (po jednym dla każdego motywu) i szereg niekanonicznych, które prawdopodobnie nie posiadają tej funkcjonalności [290]. Podjednostka ta zlokalizowana została po stronie matrix mitochondrium [134]. Pojawiły się również doniesienia o istnieniu

podjednostek regulatorowych **MCUR1** i **EMRE**, które mogą kontrolować przepustowość kanału [42, 240]. Mechanizm otwierania i zamykania kanału został niedawno opisany przez Wanga i współpracowników [290]. MCU i MCUb tworzą por, który połączony jest z heksamerem powstałym po połączeniu podjednostek MICU1. Zgodnie z modelem przedstawionym przez Wanga w takiej formie kanał pozostaje zamknięty. [290]. Białko MICU1 może przyłączyć dwa jony wapnia, które zmieniają jego konformację i odsłaniają miejsca interakcji z drugą, analogiczna podjednostką (MICU1+Ca^{2+}). Podjednostki w dimerze oddziałują ze sobą silniej, niż podjednostki w heksamerze, więc w obecności jonów wapnia i formowanie się dimerów jest raczej nieuniknione. Dimery mogą tworzyć oligomery za sprawą C-końca MICU1, który pozwala im łączyć się ze sobą. Otwarcie kanału następuje po destabilizacji heksameru MICU1+Ca^{2+} [290].

Dalsze mechanizmy oddziaływania dimerów lub oligomerów MICU1 + Ca^{2+} z podjednostką są obecnie przedmiotem badań i stopniowo ujawniane są kolejne szczegóły mechanizmu kontroli aktywności tego kanału wapniowego. Wiadomo jest, że MICU1 kontroluje poziom aktywacji kanału uniportera i jego przepustowość, która jest zależna od obecności jonów wapnia w środowisku [51]. Jednak mechanizm regulacyjny przepustowości uniportera mitochondrialnego wydaje się być o wiele bardziej złożony w świetle doniesień Patrona i współpracowników [213], którzy opisują oddziaływanie paralogu MICU1, stanowiącego kolejną podjednostkę regulatorową - **MICU2** (Ryc. 1.25). MICU2 różni się od swojego poprzednika masą molekularna (45 kDa) i dzieli z nim około 42 % sekwencji białkowej [213]. Wg. autorów zarówno MICU1 i MICU2 regulują pobieranie wapnia przez uniporter. MICU1 ma niewątpliwie efekt stymulujący na aktywność transportera. MICU2 zaś ma wpływ hamujący aktywność kanału. Razem tworzą heterodimer o masie 95 kDa [51, 180]. Dodatkowo Plovanich i współpracownicy, używając metod bioinformatycznych, zidentyfikowali kolejny paralog MICU1, który nazwali **MICU3** [222].

Doświadczenia Patron i współpracowników potwierdzają, że białka MICU1 i MICU2 znajdują się bardzo blisko siebie (w odległości nie większej niż 10 Å). Znakowanie histochemiczne wykazało, że oba białka zajmują zbliżone lokalizacje w komórce (Ryc. 1.26, panel A). Dodatkowo wykonane przez nich doświadczenia z wykorzystaniem transferu energii F$^{'}$urstera pomiędzy specjalnie skonstruowanymi białkami hybrydowymi obejmującymi MICU1 i MICU2 oraz ich połączenia z białkami fluorescencyjnymi GFP i mCherry (1.26, panel B). Trawienie proteolityczne (Ryc. 1.26, panel C) wykazało, że monomer MICU1 ma masę molową 50 kDa, z kolei w kompleksie z MICU2 tworzą prążek na wysokości 95 kDa [213].

Kolejne mechanizmy kontroli aktywności obejmują wpływ nukleotydów adeninowychna kanał uniportera. Głównym czynnikiem aktywującym mitochondrialny uniporter wapniowy jest podwyższone stężenie Ca^{2+} w cytozolu. Po akumulacji Ca^{2+} w macierzy mitochondrialnej i powrocie do fizjologicznego stężenia Ca^{2+} w cytozolu, aktywność uniportera obniża się. Allosteryczne oddziaływaniem jonów wapniowych

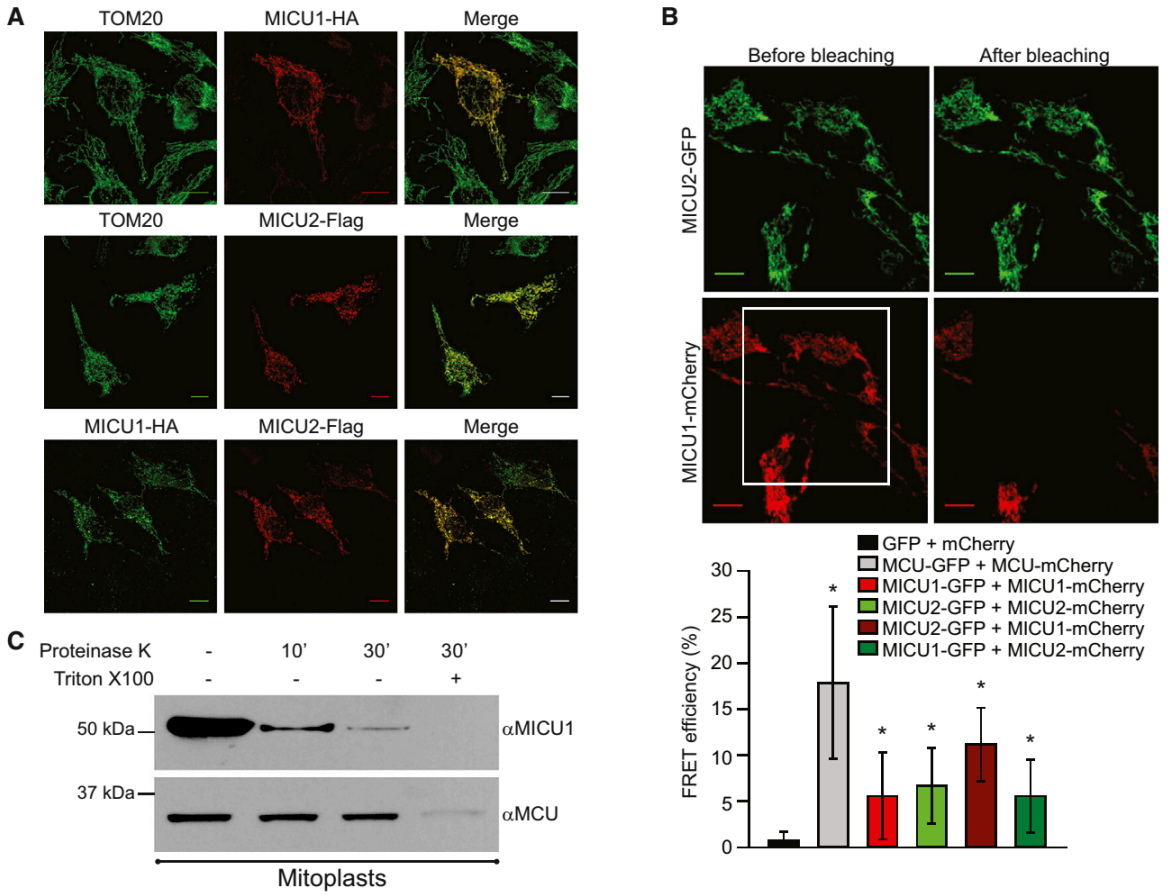


Rycina 1.25: Proponowany model kontroli aktywności uniportera mitochondrialnego [213].

reguluje aktywność MICU. Dla prawidłowego funkcjonowania uniportera wapniowego niezbędny jest również wysoki potencjał w poprzek błony mitochondrialnej. Ważnymi fizjologicznymi modulatorami aktywności uniportera wapniowego są nukleotydy adeninowe. Białko hamowane jest przez wysokie stężenie ATP, natomiast ADP stymuluje pobieranie wapnia do mitochondriów.

Prawdopodobnie oddziaływanie nukleotydów adeninowych z uniporterem wapniowym odbywa się za pośrednictwem mitochondrialnych receptorów purynergicznych: mP2y1, którego stymulacja prowadzi do zwiększenia aktywności uniportera i mP2y2, którego pobudzeniu towarzyszy hamowanie MCU. ADP może aktywować obydwa receptory, natomiast ATP jedynie mP2y2. W ten sposób szybkość pobierania wapnia do mitochondriów jest uzależniona od stosunku stężeń ATP/ADP w cytoplazmie. Endogennymi aktywatorami mitochondrialnego uniportera Ca^{2+} są także poliaminy, a przede wszystkim spermina. Związki te obniżają stężenie Ca^{2+} wymagane do aktywacji uniportera. Również flawonoidy (kwercetyna, kempferol, genisteina i genistyna) aktywują MCU prawdopodobnie bezpośrednio oddziałując z uniporterem wapniowym.

W latach 90-tych zidentyfikowano kolejny mechanizm pobierania jonów wapniowych przez uniporter mitochondrialny. Mechanizm ten aktywny jest podczas krótkotrwałej ekspozycji mitochondriów na submikromolowe stężenie Ca^{2+}, które stanowią tzw. fizjologiczny puls wapniowy, związany z oscylacjami wapnia w komórce. Doświadczenia



Rycina 1.26: Oddziaływania MICU1 i MICU2 w przestrzeni perymitochondrialnej. **(A)**: Komórki HeLa transfekowane były dwoma różnymi plazmidami, zawierającymi hybrydowe białka MICU-HA i/lub MICU2-Flag. Po 24. godzinach komórki były utrwalane i przeprowadzano barwienie histochemiczne z użyciem przeciwciał przeciwko fragmentom: αHA, *alpha*Flag oraz przeciwko markerowi mitochondrialnemu αTom20. **(B)**: Analiza transferu energii FRET dla białek: MCU,MICU1, MICU2 transfekowanych GFP oraz mCherry. Poniżej zdjęcia z mikroskopu konfokalnego histogram oddziaływania między sobą poszczególnych par białek. **(C)** Delikatna proteoliza białek mitoplastów pozyskanych z wątroby myszy proteinazą K, znakowanych na obecność MICU1 (prążek 50 kDa) i MCU (prążek 37 kDa) [213].

przeprowadzone przez Gunter i współpracowników oraz Vinogradow i Sparagna sugerują, że w tych warunkach mitochondria pobierają Ca^{2+} znacznie wydajniej. Mechanizm został zdefiniowany jako tzw. szybki mechanizm pobierania jonów wapniowych **RaM** (ang. **ra**pid **m**ode of Ca^{2+} uptake) [33, 117, 260, 285]. Obecnie wiadomo już jest, że RaM realizowany jest przez uniporter, który może występować w kilku konformacjach charakteryzujących się różnym powinowactwem i przewodnictwem dla jonów wapnia.

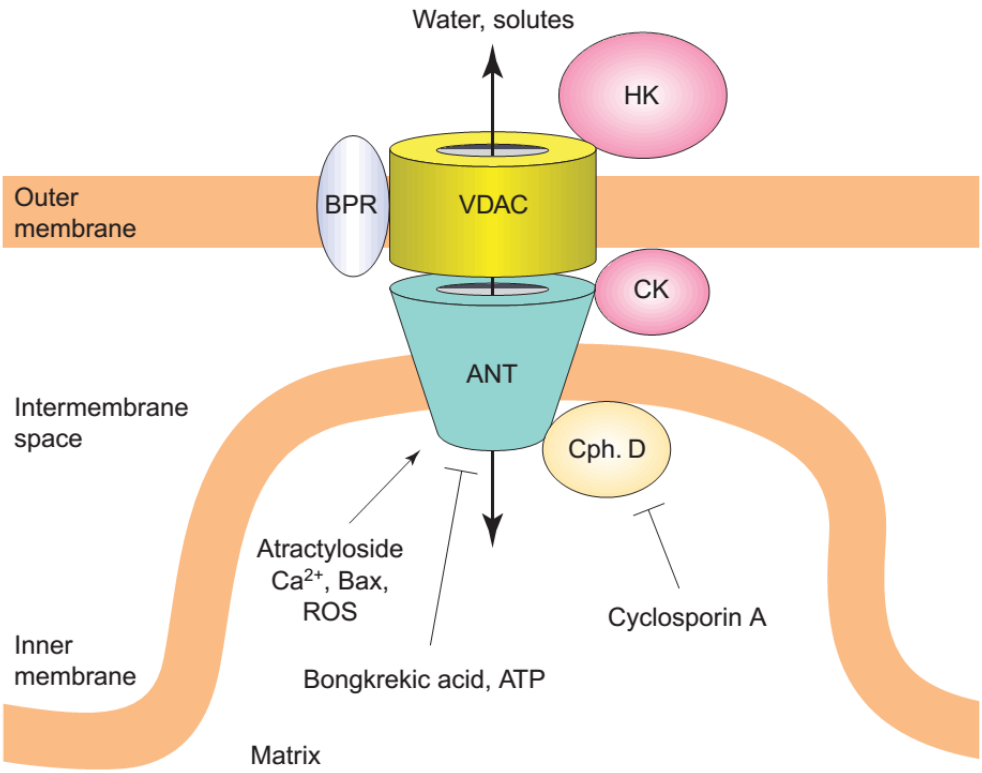
Mitochondrialny wymiennik Na^+/Ca^{2+} (mNCX)

Działanie mitochondrialnych transporterów drugiego rzędu, czyli mitochondrialnego wymiennika sodowo-wapniowego nie różni się od funkcjonowaniem od swojego cytoplazmatycznego odpowiednika (por. Rozdz. 1.6.2).

Megakanał (PTP)

Pod wpływem substancji osmotycznie czynnych, np. Ca^{2+}, mitochondria zwiększają objętość. Proces ten nazywany jest „pęcznieniem mitochondriów" i może prowadzić do mechanicznego rozerwania błony wewnętrznej. Ponieważ wewnętrzna błona mitochondrialna posiada szereg wpukleń (tzw. grzebieni mitochondrialnych), jej powierzchnia jest kilkakrotnie większa od powierzchni błony zewnętrznej B. Uważa się, że za pęcznienie mitochondriów odpowiedzialny jest nieselektywny **megakanał PTP** (ang. **p**ermeability **t**ransition **p**ore) o średnicy 2.8 nm, którego aktywacja powoduje, że wewnętrzna błona mitochondriów staje się przepuszczalna dla molekuł o masie cząsteczkowej poniżej 1500 Da. to do pęcznienia mitochondriów, a nawet do mechanicznego rozerwania ich błony wewnętrznej.

Jedną z pierwszych zmian w mitochondriach jest powstanie i otwieranie się specyficznych porów mitochondrialnych określanych mianem PTP (por. Podrodz. 1.6.4). Powstają na styku zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej, a w ich skład wchodzą białka będące składnikami obu błon mitochondrialnych. Należą do nich m.in. należąca do IMM m.in. translokaza nukleotydów adeninowych – ANT (ang. ***a**denine **n**ucleotide **t**ranslocator*), która tworzy kompleks z białkiem VDAC i obwodowym receptorem benzodiazepiny - BPR, będących składnikami błony zewnętrznej. Model megakanału PTP przedstawiono schematycznie na Ryc. 1.27. W strukturze poru zidentyfikowano również szereg enzymów, np. kinaza kreatynowa. Jony wapniowe stanowią istotny czynnik aktywujący megakanał w układach doświadczalnych, natomiast w komórce, oprócz Ca^{2+} na modulację aktywności megakanału mogą wpływać również białka z rodziny Bcl-2/Bax oraz obecność związków związanych z metabolizmem lipidów takich jak ceramid i kwas arachidonowy.



Rycina 1.27: Strukturalne przedstawienie megakanału PTP. Przy otwarciu kanału woda i rozpuszczone w niej substancje wnikają do macierzy, powodując zwiększenie jej objętości. **ANT** - translokaza nukleotydów adeninowych, **BPR** - obwodowy receptor benzodiazepiny; **CK** - kinaza kreatyninowa; **CL-S** - syntaza kardiolipiny; **HSD/I** - dehydrogenaza/izomeraza 3β=hydroksysteroidów; **GK** - kinaza glicerolowa; - peroksydaza glutationowa; **HK** - heksokinaza; **VDAC** - poryna; Na schemacie uwzględniono również miejsca działania niektórych aktywatorów (atraktylozyd, Bax, Ca^{2+}, ROS) i inhibitorów (cyklosporyna A, kwas bongkrekowy (BA), ATP) otwarcia kanału [165].

1.7 Kompleksy błonowe

Komórka jest struktura dynamiczną. Tysiące procesów biochemicznych zachodzących w bardzo małej przestrzeni możliwe jest dzięki kompartmentalizacji. Cytozol podzielony jest na mniejsze przedziały, dzięki czemu blisko siebie mogą zachodzić wykluczające się procesy biochemiczne lub składowane są produkty tych przemian. Kompartmenty różnych rodzajów mogą się ze sobą łączyć w odpowiedzi na stan fizjologiczny komórki lub w wyniku aktywacji szlaku sygnałowego. Sytuacja taka ma miejsce np. w przypadku sygnalizacji wapniowej. Większość dużych organelli jest w stanie magazynować wapń: retikulum, mitochondria, aparat Golgiego [193], jądro komórkowe[4], czy drobne pęcherzyki - mikrosomy [200]. Większość tych struktur może oddziaływać ze sobą w sposób bezpośredni, tworząc **kompleksy błonowe**. Pozwala to na szybkie i efektywne przekazywanie sygnałów i integrację różnych szlaków sygnałowych [163, 220]. Miejsca kontaktu określane są również jako mikrodomeny [21, 234]. Są to

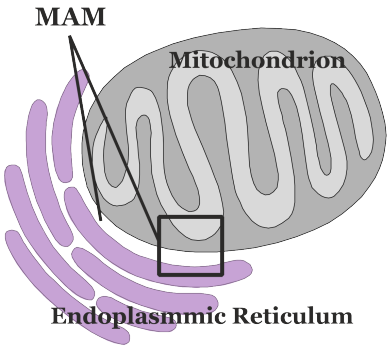
wyizolowane przestrzenie, gdzie stężenie wapnia może zwiększyć się kilkunastokrotnie w bardzo krótkim czasie. W zależności od organelli wchodzących ze sobą w interakcje wyróżnia się szereg mikrodomen. Niektóre tworzone *„ad hoc"* w wyniku aktywacji szlaku sygnałowego, inne z kolei będące stałym elementem szlaku, tworzone konstytutywnie.

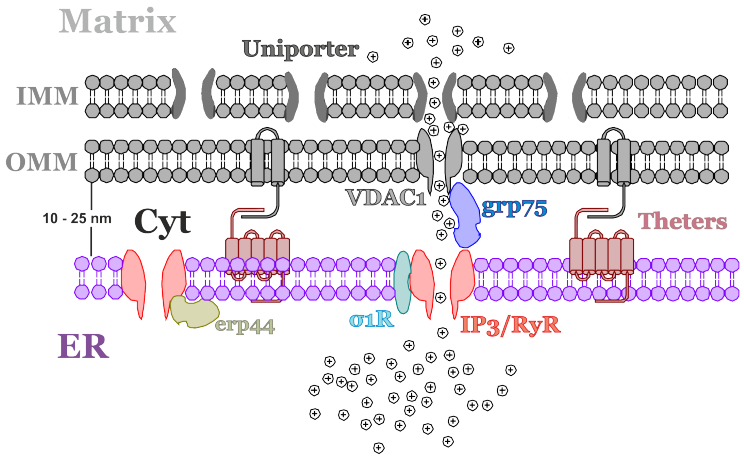
Połączenie błony retikulum z błoną komórkową pozwala na szybkie uzupełnienie jonów wapnia w ER z puli zewnątrzkomórkowej. Podobnie mitochondria mogą łączyć się zarówno z ER, jak i błoną komórkową, kształtując dynamikę sygnału wapniowego w komórce [125]. Najważniejszymi przedziałami, które uczestniczą w sygnalizacji wapniowej są mitochondria i siateczka śródplazmatyczna (Ryc. 1.23). Struktury te ściśle współpracują ze sobą, tworząc fizyczne połączenia przypominające synapsy, umożliwiające bezpośrednie przekazywanie sygnału z jednego kompartmentu do drugiego. Struktury takie nazywane są kompleksami błonowymi. Kompleks powstający na styku mitochondria-ER określany jest jako **kompleksy błon związanych z mitochondriami - MAM** (ang. ***m**itochondria **a**ssociated **m**embranes*). Szacuje się, że większość jonów wapniowych uwolnionych z ER buforowana jest w mitochondriach [183]. Aktywacja kanałów IP_3R może spowodować wzrost stężenia jonów wapnia w przestrzeni mitochondrialnej, przekraczającego nawet ≈20 krotnie globalne wzrosty jonów wapnia wywołanych aktywacją tych receptorów [53]. Zaobserwowano też, że wzrost stężenia jonów wapnia w cytozolu indukowany aktywacją receptorów IP_3R, powoduje odpowiadający mu wzrost stężenia jonów wapnia w matriks [234]. Dodatkowo badania mikroskopowe potwierdzają, że większość mitochondriów (80%) jest połączona z retikulum endoplazmatycznym [182]. Ostateczne Csordás i współpracownicy wykazali, że miejsca uwalniania jonów wapniowych z retikulum (obecność receptora IP_3R) powiązane są z obszarami występowania uniportera mitochondrialnego, odpowiedzialnego za transport jonów wapniowych do matriks. [53]

1.7.1 MAM

Istnienie kompleksów błonowych, które wyróżniały się obecnością enzymów charakterystycznych dla frakcji retikularnej i mitochondrialnej zostało odkryte już w latach 70-tych. W swoje pracy Dennis i Kennedy wyizolowali ze szczurzych hepatocytów specyficzny rodzaj frakcji błonowej, którą określili jako „frakcja x" [66]. Intensywne badania tej frakcji rozpoczęły się dopiero 20 lat później, kiedy to powiązano frakcję x z intensyfikacją metabolizmu lipidów [238]. „Frakcja x" to kompleks błon siateczki śródplazmatycznej i mitochondrium, które łączą się w przypominający synapsą interfejs spajający te dwa organella (schemat przedstawiony został na Ryc. 1.28).

Odległość między błonami kompleksu waha się od 9 nm dla gładkiej siateczki śródplazmatycznej, do 30 nm w przypadku szorstkiej [52]. Interfejs mitochondrialno-retikularny stabilizowany jest przez szereg protein, które w większości powiązane są z głównymi elementami przewodzącymi sygnał wapniowy w tych kompartmentach, tj.

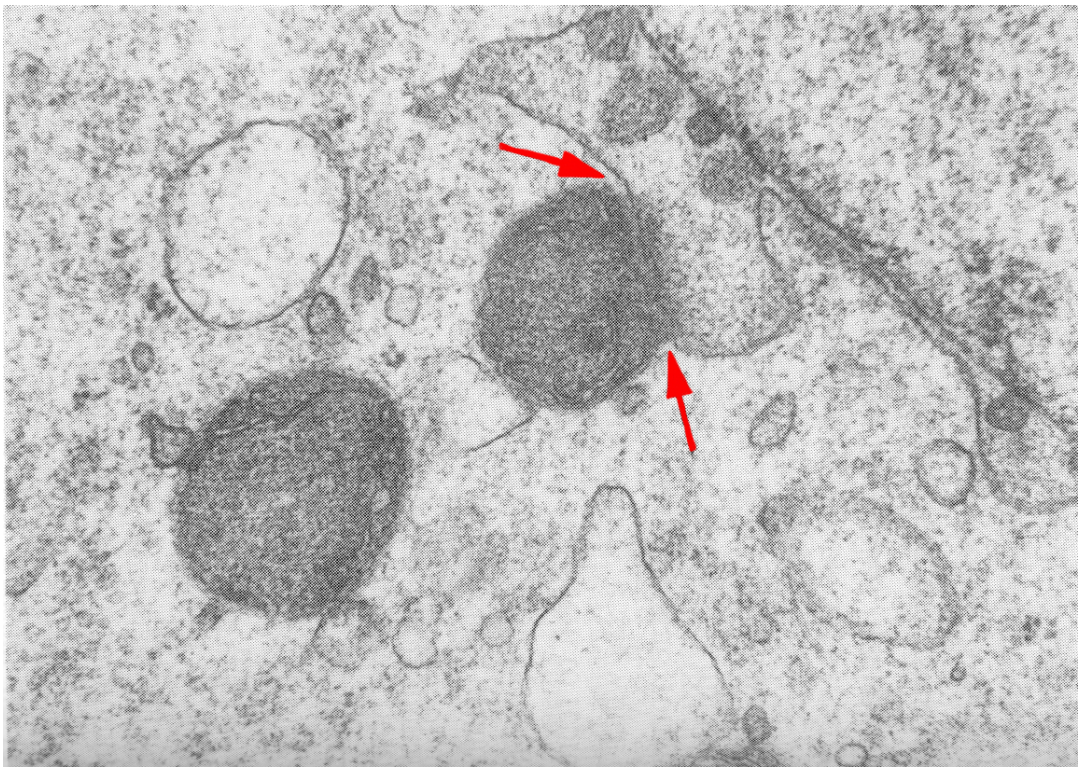




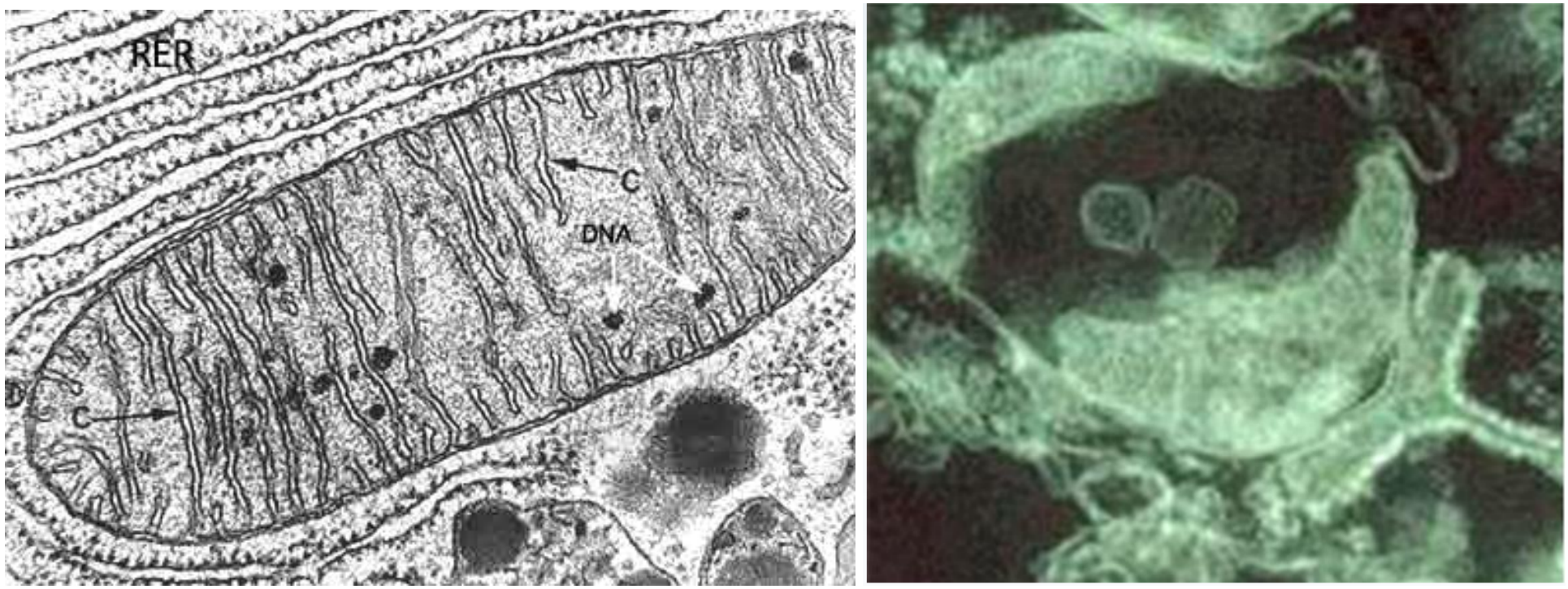
Rycina 1.28: Kompleks mitochondrialno-retikularny (MAM), ER - siateczka śródplazmatyczna, Cyt - cytozol, IP_3R/RyR - kanały wapniowe na powierzchni ER, VDAC-1/uniporter - kanały wapniowe mitochondrium; białka stabilizujące połączenie: erp44/erp57 - białka siateczki śródplazmatycznej 44/57, σ_1R - sigma-1 receptor oraz chaperon grp75 [77, 267].

receptorem IP_3, pompą wapniową SERCA oraz kanałem VDAC (Tab. 1.9, Ryc. 1.28). Jak już wspomniano, struktury te mogą powstawać „*de novo*" w trakcie aktywacji szlaku sygnalizacji wapniowej [54].

Błony białkowo-lipidowe pozostają ze sobą połączone nawet podczas ekstrakcji opartej na frakcjonowaniu komórek za pomocą wirowania [297]. Struktury te widoczne są na mikrografii z mikroskopu elektronowego - Ryc. 1.29 [216] oraz Ryc. 1.30 [164, 244], jak i mikrografiach uzyskanych za pomocą tomografii elektronowej - Ryc. 1.31 [236].



Rycina 1.29: Mikrografia wykonana transmisyjnym mikroskopem elektronowym z blastomeru (czterokomórkowy embrion *in vitro*). Strzałki wskazują miejsca bliskiego kontaktu mitochondrium z wypukleniami pochodzącymi z otoczki jądrowej, które następnie przechodzą w struktury retikularne (powiększenie x40000) [216].



Rycina 1.30: Miejsca kontaktu mito-ER w komórce. Prawy panel - mikrografia z mikroskopu elektronowego autorstwa R. Więckowskiego -powiększenie ×26000 [164]. Lewy panel - mikrografia przedstawiająca ułożenie mitochondrium i szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (RER) na podstawie [244]. Strzałki wskazują grzebienie mitochondrialne (**C**).

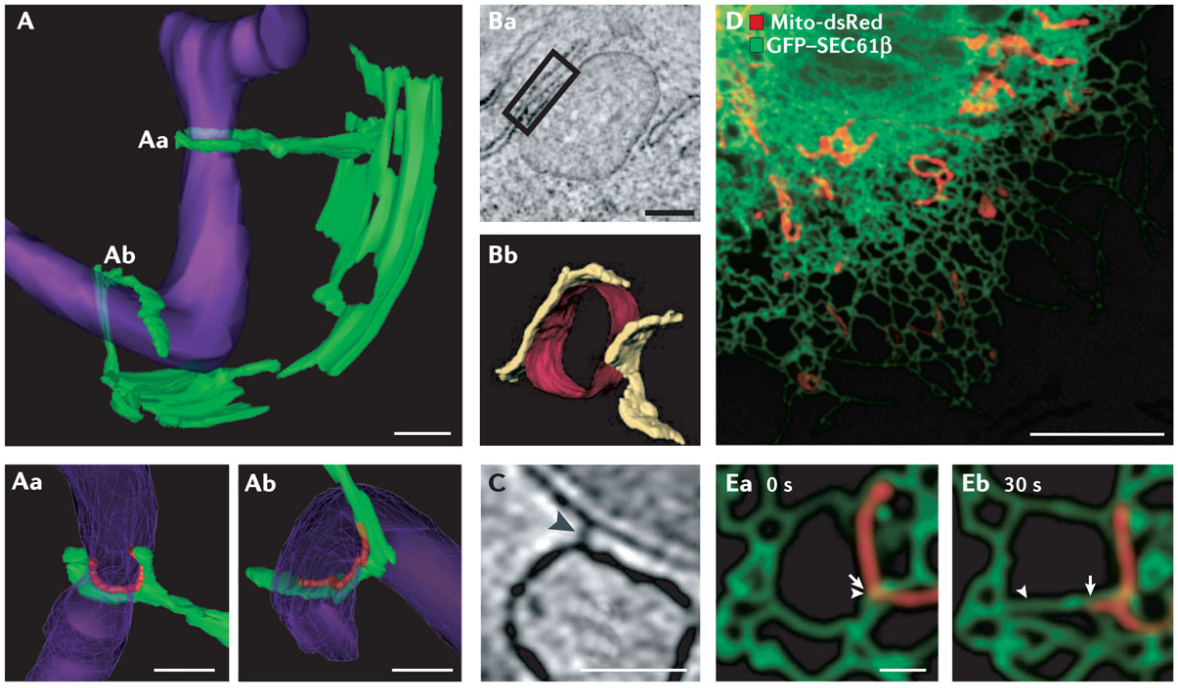
Białko	Funkcja	Referencje
	Siateczka śródplazmatyczna	
IP_3R1-3/RyR	kanały wapniowe w ER	[125]
BiP	chaperon ER	[98]
Sigma1-R	reguluje funkcjonowanie IP_3R1	[126, 266]
FKBP12	reguluje funkcjonowanie kanałów RyR	[43]
ERp44	reguluje funkcjonowanie IP_3R3	[266]
ERp57	białko związane z Ca^{2+}-ATP-azą	[266]
SERCA	pompa wapniowa membrany ER	
kalretikulina	bufor wapniowy	[266]
kalneksyna	bufor wapniowy	[266]
	Cytozol	
PACS-2	kontroluje połączenia ER-Mit i apoptozę wywołaną białkiem Bid	[252]
AMF-R (i.e gp78)	pomaga w stabilizacji MAM - rekrutuje p97	[288]
S100A1	reguluje napływ Ca^{2+} do ER	[286]
S100B	białko spinające membrany, bierze udział w transporcie lipidów	[294]
grp75	białko powiązane z VDAC	[61, 266]
hsp60	białko szoku cieplnego, stabilizator połączenia	[266]
Mitofuzyna-2	spina ER z mitochondrium	[60, 191]
	Mitochondria	
VDAC-1	kanał Ca^{2+} na OMM	[125, 126]
Uniporter	kanał dla Ca^{2+} na IMM	[126, 125]

Tablica 1.9: Najważniejsze białka tworzące kompleksy MAM.

Według [236], połączenia pomiędzy retikulum endoplazmatycznym, a mitochondriami obserwowane są w wielu typach komórek należących do różnych gromad organizmów żywych: w komórkach drożdży, linii komórkowej DT40 kurzych limfocytów, hepatocytach szura (Ryc. 1.31, A-C) i zdefiniowane są tam jako obszary, w których błony obu organelli zbliżone są do siebie, ale nie zlewają się,a odległość między nimi wynosi 10–30 nm. Niewielka odległość pomiędzy błonami pośrednio sugeruje, że mogą być one spinane ze sobą za pomocą białek zlokalizowanych na powierzchni przeciwległych błon (1.31, C). Ponadto z tego powodu w miejscach kontaktu problematyczna wydaje się lokalizacja rybosomów w przypadku RER. Z obserwacji dokonanych przy użyciu tomografii elektronowej wynika, że miejsca kontaktu mogą przybierać bardzo różnorodne formy, od niewielkich „łat", po pierścienie ER otaczających podłużne mitochondria. Wydaje się też, że połączenia MAM są stosunkowo stabilne i nawet gdy jedno z organelli porusza się, drugie podąża wraz z nim, nie zrywając kontaktu. (1.31, Ea-Eb). Jak wynika z obserwacji żywych komórek, połączenia mitochondriów i ER nie wpływają na rozmieszczenie tych organelli w komórce (1.31, D).

Szczególną rolę w procesie ustawienia kanałów jonowych w apozycji odgrywają specjalne białka spinające, wzmacniające połączenia mitochondrium-ER (w dalszej części akapitu nazywane połączeniami Mit-ER) i odgrywające olbrzymia rolę w przepływie wapnia między tymi organellami. W jednym z doświadczeń Csordás i współpracownicy wykazali, że kontrola przepływu jonów wapniowych z ER do mitochondrium może odbywać się nie tylko poprzez regulację pracy kanałów białkowych, ale także poprzez odpowiednią kontrolę odległości i stabilizację połączenia w interfejsie MAM [52]. Aby zbadać wpływ stabilności połączeń na transmisję Ca^{2+} autorzy zaczęli od wykorzystania tomografii elektronowej do obserwacji izolatów mitochondriów z wątroby szczura i szczegółowego uwidocznienia połączeń Mit–ER z bardzo dużą rozdzielczością. W sekcji A Ryc. 1.32 widać cienkie struktury łączące pęcherzyki ER z OMM (powiększone na panelach 1, 2 i 3). Widoczne struktury spinające występują w klastrach po 6 i więcej, rozciągając się na długości 13–22 nm. Odległość pomiędzy powierzchniami błon wynosi 6–15 nm. Autorzy obserwowali również podobne struktury w nieuszkodzonych hepatocytach szczura i linii komórkowej DT40 uzyskanej z kurzych limfocytów B, zarówno w przypadku gładkiej, jak i szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, jednak z powodu większego „zagęszczenia" ośrodków w nieuszkodzonych komórkach były one o wiele słabiej widoczne (Ryc. 1.30, B). Obserwacje wskazują, że struktury spinające w przypadku gładkiej siateczki śródplazmatycznej mają średnią długość 9–16 nm, natomiast w przypadku szorstkiej siateczki śródplazmatycznej minimum 19–30 nm. Dlatego też w pracy tej autorzy sugerują, iż zróżnicowanie odległości między organellami może być jednym z mechanizmów kontroli propagacji sygnału wapniowego z ER do mitochondrium.

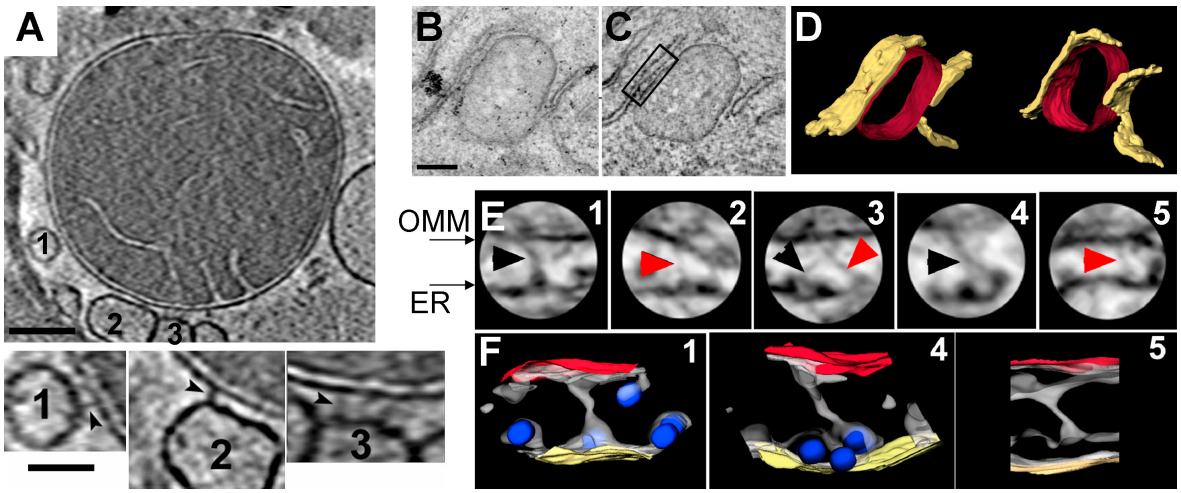
W celu osłabienia połączeń Mit–ER, Csordás i współpracownicy [52] zastosowali ograniczoną proteolizę. Badanie uwalniania jonów wapnia z kanałów IP_3R w komórkach poddanych wcześniej ograniczonej proteolizie, wykazały że proteoliza wpływa na



Rycina 1.31: **A)** Trójwymiarowe obrazy połączeń mitochondriów z ER, uzyskane za pomocą tomografii elektronowej, ukazane w powiększeniu na panelach Aa oraz Ab. ER kolor zielony, mitochondrium kolor fioletowy w komórkach drożdży. **B)** Mikrografia połączeń mitochondrium (kolor czerwony) oraz ER (kolor żółty) z tomografii cryo-EM (Ba) i zbudowany na jej podstawie model 3-D (Bb) w komórkach kurzych z linii DT40 z dezaktywowanym genem *ip3r*. **C)** Tomografia elektronowa hepatocytów szczura, ukazujących w powiększeniu elementy spinające (theters) ER i mitochondria. **D)** Barwienie przyżyciowe za pomocą białek fluorescencyjnych: dsRED (znakuje mitochondria na czerwono) oraz GFP (pokazuje retikulum endoplazmatyczne, a dokładnie kompleks transportujący Sec61β, na zielono). **E)** powiększone miejsce kontaktu z panelu D, w dwóch krokach czasowych (0 i 30 sekund) wskazują, że ER porusza się wraz z mitochondrium. Znacznik odległości dla **A** wynosi 200nm, **B** wynosi 250nm, **C** wynosi 50nm, **D** wynosi 10μm oraz **E** wynosi 1 μm [236].

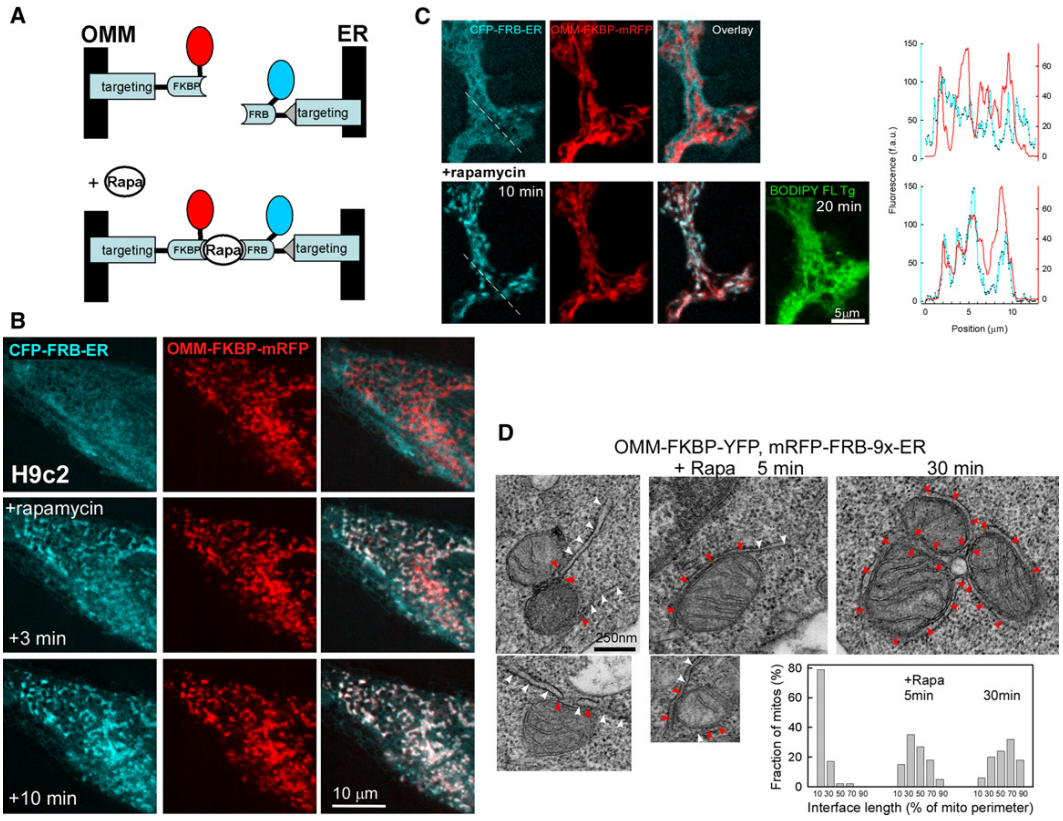
poziom akumulacji jonów wapniowych w mitochondriach. W grupie kontrolnej podanie 8 μM IP_3 powodował wyrzut jonów wapnia z ER do cytozolu, co skutkowało wzrostem stężenia tych jonów w mitochondriach. Po zastosowaniu enzymu proteolitycznego - proteinazy K - wyrzut jonów wapnia z ER nie powodował wzrostu stężenia jonów wapnia w mitochondriach [52].

Dodatkowo w [54] Csordás i współpracownicy zsyntetyzowali indukowane rapamycyna sztuczne miejsca połączeń ER-mitochondrium (Ryc. 1.33). Doświadczenie polegało na uzyskaniu mutantów linii komórek RBL-2H3, z genami białek hybrydowych, które symulowały obecność protein spinających na powierzchni ER i mitochondrium - tzw. linkery ER-OMM. Jedno z białek fuzyjnych składało się z fragmentu białka AKAP1 (ang. ***A**-**k**inase **a**nchor **p**rotein **1***), który stanowiła jego sekwencja sygnałowa (reszty od 34-63), kierująca białko do OMM i białka wiążącego rapamycynę (FKBP12)



Rycina 1.32: **A)** Mikrografie cry-ET izolatów mitochondriów z hepatocytów szczura, ukazujących szereg połączonych pęcherzyków z mitochondriami (znacznik odległości 100 nm), pokazanych w powiększeniu na dolnych panelach A (znacznik odległości 50 nm). **B,C)** mikrografie kurzych komórek DT40, pokazujących połączenie Mito-ER. **D)** trójwymiarowy model połączenia, gdzie ER oznaczono kolorem żółtym, natomiast mitochondria kolorem czerwonym. **E)** skany obszaru kontaktu o średnicy 130 nm z zaznaczonymi strukturami spinającymi (kolorem czarnym wyróżniono struktury spinające kończące się na rybosomach). **F)** modele regionów prezentowanych na panelach w sekcji **E**. OMM kolorowane na czerwono, ER na żółto, struktury spinające na szaro. Rybosomy oznaczono kolorem niebieskim [52].

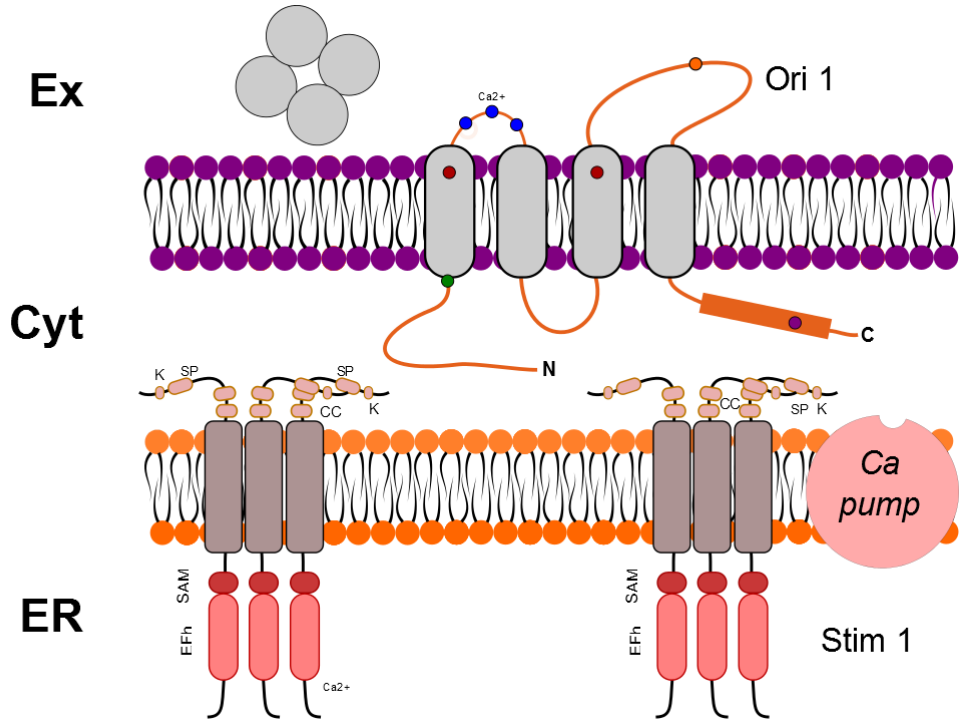
z czerwonym białkiem fluorescencyjnym (mRFP1 - ang. ***m****itochondrial* ***r****ed* ***f****luorescent* ***p****rotein 1*). Drugie białko fuzyjne skierowane było z kolei do ER i składało się z: sekwencji kierunkowej do ER (wziętej z białka SAC1), białka wiążącego rapamycynę (FRB) oraz niebieskiego białka fluorescencyjnego (CFP - ang. ***c****yan* ***f****luorescent* ***p****rotein*) [54]. Podanie rapamycyny powodowało dimeryzacje białek FKBP12 i FRB, co „zszywało" ze sobą błony ER i OMM, zbliżając je znacznie do siebie. W publikacji autorzy nie ograniczyli się jedynie do wizualizacji połączeń między ER i mitochondriami. Konstruując kolejne białka, które łączyły linkery ER-OMM z „ratiometric-pericam" uzyskali białko pomostowe, wrażliwe na obecność jonów wapnia, czyli most OMM-pericam-FKBP-FRB-ER, który pozwalał na pomiar stężenia jonów wapnia w interfejsie ER-OMM.



Rycina 1.33: Schemat opisujący eksperyment ukazujący połączenia powstające pomiędzy zewnętrzną błoną mitochondrialną (OMM) oraz błona ER. (**A**) Zdjęcie ilustrujący indukowane rapamycyną mostki białkowe. (**B**) Zdjęcia wykonane pod mikroskopem konfokalnym, ukazujące pojedyncze komórki RBL-2H3 ze wzbudzoną nadekspresją mostków OMM-ER, ukazujące rozmieszczenie powiązanych z nimi barwników 1, 3 oraz 15 minut po potraktowaniu 100 nM roztworem rapamycyny. (**C**) Zdjęcia spod mikroskopu konfokalnego komórek H9c2 z wywołana nadekspresją mostków OMM-ER, przed i po 10 minutach ekspozycji na rapamycynę (100nM) [54].

1.7.2 PAM

Uwalnianie jonów wapnia z ER do cytoplazmy prowadzi do częściowego opróżnienia magazynów wapniowych w świetle siateczki śródplazmatycznej. Spadek stężenia jonów wapnia w ER aktywuje napływ Ca^{2+} ze środowiska zewnątrzkomórkowego do cytoplazmy poprzez zlokalizowane w błonie komórkowej kanały wapniowe typu SOCEC (ang. **s**tore **o**perated **c**alcium **c**hannel), zapewniające przepływ jonów określany mianem **CRAC** (ang. Ca^{2+} Release Activated Ca^{2+} Current). Wprowadzone w ten sposób do komórki jony wapnia mogą zostać wykorzystane do uzupełnienia magazynów wapniowych w świetle ER, na drodze aktywności ATPazy SERCA. Zjawisko to określa się mianem pojemnościowego napływu jonów wapniowych lub napływu regulowanego przez magazyny wapniowe (CCE/SOCE, ang. **c**apacitative **c**alcium **e**ntry/**s**tore **o**perated **c**alcium **e**ntry). Sposób, w jaki funkcjonalnie powiązane są ze sobą magazyny wapniowe w ER z kanałami SOC w błonie komórkowej jest w ostatnich latach przedmiotem intensywnych badań. Momentem przełomowym owych studiów było niedawne



Rycina 1.34: PAM - kompleks białkowy, przez który odbywa się pojemnościowy napływ wapnia. **Ex** - środowisko zewnątrzkomórkowe; **Cyt** - cytozol; **ER** - retikulum endoplazmatyczne. **EFh** - domeny EF-hand.

odkrycie, że białka **STIM1** i **Orai1/CRACM1** są niezbędne dla przebiegu SOCE, co wykazano stosując m.in. technikę interferencji RNA. Co więcej, naturalnie występująca w białku Orai1 mutacja R91W prowadzi do zniesienia CCE w limfocytach T, co klinicznie manifestuje się ciężkim, złożonym niedoborem odporności (SCID, ang. **s**evere **c**ombined **i**mmunodeficiency). Wykazano również, że równoczesna nadekspresja białek STIM1 i Orai1 prowadzi do znacznego nasilenia pojemnościowego napływu wapnia.

Orai1 to zlokalizowane w błonie komórkowej białko zawierające cztery segmenty błonowe, którego zarówno N- jak i C-koniec znajdują się w cytoplazmie. Choć białko to przez długi czas nie było uznawane za kanał SOC, to jednak niedawne badania wykazały, że Orai1 nie tylko posiada wszystkie cechy takich kanałów, ale rzeczywiście stanowi drogę pojemnościowego napływu wapnia do komórki. Oprócz białka Orai1 w komórkach kręgowców stwierdzono obecność białek Orai2 i Orai3. Wszystkie trzy białka wykazują wysoki stopień podobieństwa i nie wyklucza się możliwości, że mogą tworzyć w błonie komórkowej funkcjonalne heterooligomery.

Białko STIM1 zostało odkryte jako cząsteczka zaangażowana w proliferację komórek prekursorowych dla limfocytów B w szpiku kostnym. Manji i wsp. [181], stosując metody immunofluorescencyjne oraz biotynylację białek powierzchniowych, wykazali obecność STIM1 w błonie komórkowej. Badacze określili również masę cząsteczkową tego białka na ok. 90 kDa na podstawie jego migracji w żelu poliakryloamidowym.

Stwierdzili także, że STIM1 ulega fosforylacji na resztach serynowych i treoninowych oraz wykazali, że białko to jest N-glikozylowane.

Wkrótce odkryto białko STIM2, wykazujące bardzo duże podobieństwo do białka STIM1, które w zależności od stopnia glikozylacji migruje w żelu poliakryloamidowym w postaci podwójnego prążka na wysokości 100 i 115 kDa. Zarówno STIM1, jak i STIM2 są białkami błonowymi typu I, zawierającymi pojedynczą domenę SAM (ang. Sterile Alpha-Motif) oraz wiążącymi wapń poprzez motyw dłoni (EF-hand), zlokalizowany w N-końcowej części cząsteczki. W części C-końcowej obydwu białek znajdują się domeny CC (ang. Coiled-Coil) oraz regiony bogate w prolinę. Dodatkowo, w przeciwieństwie do STIM1, białko STIM2 zawiera sygnał zatrzymujący je w błonie ER (KKXX), który sprawia, że podczas gdy STIM1 występuje zarówno w błonie komórkowej, jak i w błonie ER, to STIM2 lokuje się jedynie w siateczce śródplazmatycznej [78].

Rozdział 2

Modelowanie deterministyczne

2.1 Modelowanie przepływów przez pompy

Pompy wapniowe działają podobnie jak enzymy, hydrolizując ATP wykonują pracę użyteczną komórce - mianowicie przenoszą określone cząsteczki w poprzek błony komórkowej. Podobnie jak enzymy, pompy podlegają wielopoziomowej kontroli z miejscami inhibitorowymi i aktywatorowymi, które tworzą skomplikowaną sieć sprzężeń zwrotnych dodatnich i ujemnych. Podobnie jak w przypadku reakcji enzymatycznych, transport z udziałem pompy wapniowej odbiega od prawa działania mas. Dokładniej, prędkość przepływu jonów wapnia V w poprzek błony biologicznej opisuje się najczęściej wzorem Michaelisa-Menten:

$$V = V_{max} \cdot \frac{[Ca^{2+}]}{K_m + [Ca^{2+}]} \tag{2.1}$$

gdzie $[Ca^{2+}]$ jest stężeniem jonów wapnia w odpowiednim kompartmencie, a K_m stałą charakteryzującą pompę, nazywaną również stałą Michaelisa.

Przypadek 1: $[Ca^{2+}] \ll K_m$
Jeżeli jony wapnia występują w niewielkim stężeniu, dużo mniejszym od K_m, to tempo transportu wapnia opisane wzorem (2.1) jest w przybliżeniu liniowo proporcjonalne do $[Ca^{2+}]$. Dokładniej:

$$V \sim \frac{V_{max} \cdot [Ca^{2+}]}{K_m} = k \cdot [Ca^{2+}] \tag{2.2}$$

gdzie $k = \frac{V_{max}}{K_m}$.

Przypadek 2: $[Ca^{2+}] = K_m$

Gdy stężenie substratu równe jest stałej Michelisa, prędkość przepływu wynosi dokładnie połowę prędkości maksymalnej:

$$V = \frac{V_{max} \cdot [Ca^{2+}]}{[Ca^{2+}] + [Ca^{2+}]} = \frac{V_{max} \cdot [Ca^{2+}]}{2 \cdot [Ca^{2+}]} = \frac{V_{max}}{2} \tag{2.3}$$

Zależność tę wykorzystuje się do wyznaczania stałej K_m, która jest również miarą powinowactwa białka transportującego do wapnia - im mniejsza, tym powinowactwo jest większe, natomiast duża wartość tej stałej mówi o małym powinowactwie.

Przypadek 3: $[Ca^{2+}] \gg K_m$

$$V \sim \frac{V_{max} \cdot [Ca^{2+}]}{[Ca^{2+}]} = V_{max} \tag{2.4}$$

2.2 Modelowanie przepływów przez kanały i wymienniki

Modelowanie transportu przez kanały i wymienniki również odbiega od klasycznej kinetyki Michaelisa-Menten stosowanej do opisu dynamiki reakcji enzymatycznych. Modelowanie tych przepływów oparte jest na funkcji Hilla, która bierze pod uwagę możliwość wiązania cząsteczek substratu (wapnia) i cząsteczek regulatorowych (regulacja allosteryczna) i opisuje pośrednio oddziaływanie pomiędzy nimi [149, 197]. Funkcja ta ma następującą postać:

$$H(x) = V_{max} \frac{x^n}{K_d^n + x^n}, \quad n > 0 \tag{2.5}$$

gdzie stała n nazywana jest współczynnikiem Hilla i może być dowolną liczbą rzeczywistą, natomiast współczynniki V_{max} i K_d określają odpowiednio: wartość maksymalną i stałą pół-aktywacji. Mimo, iż wykładnik funkcji Hilla może przyjąć dowolną wartość, jest on z reguły wyznaczany empirycznie, a jego wartość zależy od ilości miejsc wiążących substrat/ligand oraz typu interakcji między nimi. Dla $n = 1$ miejsca wiązania substratu i ligandu działają niezależnie, jeżeli $n > 1$ miejsca są „kooperatywne", to znaczy, że związanie ligandu w powoduje zwiększenie prawdopodobieństwa przyłączenia się substratu w pozostałych. W ten sposób funkcja Hilla specyficznie opisuje reakcje biologiczne oparte na mechanizmie ON/OFF. Wykładnik Hilla decyduje o tym jaki kształt przyjmie krzywa. Im większe n (i dostatecznie duże), tym szybsze zmiany w punkcie $x_p = K_d \left(\frac{n-1}{n+1}\right)^{1/n}$ przegięcia funkcji, w którym pochodna przyjmuje wartość maksymalną. Z tego względu funkcja Hilla o dużym n nazywana jest również funkcją przełączeniową [117]. Uwagi odnoszące się do Przypadków 1-3 poprzedniego podrozdziału pozostają w mocy również dla funkcji Hilla opisanej wzorem (2.5).

Prostymi przykładami kanałów związanych z transportem wapnia, często opisywanych funkcją Hilla (2.5) są receptory: rianodynowy (RyR) i receptor IP_3 (IP_3R), znajdujące się w błonach siateczki sródplazmatycznej.

Bardziej skomplikowanymi kanałami wapniowymi są transportery przenoszące jednocześnie dwa substraty. Przykładem takiego białka jest wymiennik sodowo-wapniowy (NCX), znajdujący się na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Białko to przenosi jon wapnia do przestrzeni międzybłonowej i trzy jony sodu do wnętrza mitochondrium. Transport tego typu modelowany jest poprzez iloczyn dwóch funkcji Hilla:

$$J_{NCX} = V_{NCX} \frac{Ca_{Cyt}^n}{K_{Ca}^n + Ca_{Cyt}^n} \quad \frac{Na_{Cyt}}{K_{Na} + Na_{Cyt}} \tag{2.6}$$

gdzie Ca_{Cyt} to stężenie wolnego wapnia w cytozolu, K_{Ca} określa stałą pół-aktywacji dla jonów wapnia, natomiast K_{Na} określa stałą pół-aktywacji dla jonów sodu.

Uwaga: We wzorze (2.6) oznaczenie stężenia jonów wapnia w cytozolu $[Ca^{2+}]_{Cyt}$ zostało uproszczone do Ca_{Cyt}. Podobna konwencja stosowana będzie również w dalszym ciągu pracy do stężenia jonów wapnia w pozostałych kompartmentach, to znaczy $[Ca^{2+}]_{Mit}$ będzie oznaczane symbolem Ca_{Mit}, natomiast $[Ca^{2+}]_{ER}$ symbolem Ca_{ER}.

Modelowanie uniportera jest jeszcze bardziej złożone, ponieważ istotną rolę w jego funkcji odgrywa potencjał transbłonowy $\Delta\Psi_m$, wprowadzony w Rozdz. 1.6.4.
Już w 1990 roku Gunter i Pfeifer [117] wykorzystali równanie Nernsta do odtworzenia potencjału błonowego w mitochondriach, który jest siłą napędową działania MICU. Pobieranie wapnia przez mitochondria z uwzględnieniem $\Delta\Psi_m$ opisuje się równaniem:

$$J_{uni} = V_{uni} \frac{ZF\Delta\psi}{RT} \, e^{ZF\Delta\psi/RT} \quad sinh\left(\frac{ZF\Delta\psi}{RT}\right) \quad \frac{Ca_{cyt}^2}{K_{Ca}^2 + Ca_{cyt}^2} \tag{2.7}$$

(por. formuła (33) w [84]), gdzie $\Delta\psi$ jest efektywnym potencjałem transbłonowym, R - stałą gazową, Z stechiometria ładunków, F - stałą Faradaya, natomiast T to temperatura mierzona w skali Kelvina. Efektywny potencjał transbłonowy określa się poprzez potencjał transbłonowy $\Delta\Psi_m$ za pomocą równania:

$$\Delta\psi = b(\Delta\Psi_m - \Delta\Psi_{m0})$$

gdzie $\Delta\Psi_{m0}$ oraz b są parametrami empirycznymi. Parametry te odzwierciedlają fakt, że potencjał $\Delta\Psi_m$ nie jest stały wzdłuż błony mitichondrialnej.

Równocześnie Magnus i Keizer stworzyli całościowy model aktywności elektrycznej mitochondriów [179]. Model ten zadany jest przez równania różniczkowe zwyczajne opisujące m.in. ewolucję czasową $J_{H,res}$ (wypływ H^+ indukowany przez łańcuch oddechowy); $J_{H,F1}$ (napływ jonów H^+ poprzez syntezę ATP); J_{ant} (wymiennik nukleotydów adeninowych - Adenin Nucleotide Translocator - wymieniający ATP na ADP), J_{uni} (przepływ jonów wapnia do macierzy w wyniku działania uniportera mitochondrialnego) oraz efektywny potencjał transbłonowy $\Delta\psi$ [84] zmieniający się zgodnie z równaniem:

$$C_{mit} \frac{d\Delta\psi}{dt} = -\left(-J_{H,res} + J_{H,F1} + J_{ant} + J_{Hleak} + 2J_{uni}\right) \tag{2.8}$$

Przepływ przez uniporter mitochondrialny J_{uni} w powyższej pracy ma postać:

$$J_{uni} = V_{uni} \frac{\frac{Ca_{cyt}}{K_{trans}} \left(1 + \frac{Ca_{cyt}}{K_{trans}}\right)^3}{\left(1 + \frac{Ca_{cyt}}{K_{trans}}\right)^4 + \frac{L}{\left(1 + \frac{Ca_{cyt}}{K_{act}}\right)^{na}}} \quad \frac{\frac{(ZF(\Delta\phi - 91mV))}{RT}}{1 - e^{-(ZF(\Delta\phi - 91mV))/(RT)}} \tag{2.9}$$

gdzie Ca_{cyt} określa stężenie wolnych jonów wapnia w cytozolu, $n = 2.8$, natomiast stałe K_{trans} i K_{act} to stałe dysocjacji jonów wapnia dla miejsca transportującego i miejsca aktywującego. Przedstawione powyżej modele były bardzo pomocne w pomiarach maksymalnej prędkości transportu jonów wapnia do mitochondrium, oznaczanej jako V_{uni}.

Wypływ wapnia z mitochondrium poprzez wymiennik mNCX (Rozdz. 1.6.2) opisane zostało w pracy [179] wyrażeniem:

$$J_{NCX} = V_{NCX} \quad \frac{e^{(bF(\Delta\phi - 91\,mV)/RT)}}{\left(1 + \frac{K_{Na}}{[Na]}\right)^n \left(1 + \frac{K_{Ca}}{Ca_{Mit}}\right)} \tag{2.10}$$

gdzie V_{NCX} to maksymalna prędkość transportu jonów wapnia, Ca_{Mit} to stężenie wolnych jonów wapnia w mitochondrium. Stałe n i b określają charakter wymiany jonów Na^+ na jony Ca^{2+}. Tak więc $n = 2$ i $b = 0$, jeżeli wymieniane są 2 jony sodu na jeden jon wapnia, to znaczy, że jest ona neutralna elektrycznie. Jeśli natomiast trzy jony Na^+ wymieniane są na jeden jon Ca^{2+} ($n = 3$) i $b > 0$. Z pracy [224] wynika, że proporcje wymiany jonów dla mNCX to 3:1 dla par jonów sód:wapń [224].

2.3 Szczegółowy model uniportera mitochondrialnego

Innym interesującym zjawiskiem, badanym *in silico* był tzw. mechanizm RaM (ang. calcium rapid uptake mode), który został zaproponowany w pracy [260] w roku 1995. Praca ta sugeruje, że w warunkach ekspozycji na stężenie mniejsze niż 0.5-0.8 μM wapnia aktywny jest tzw. szybki mechanizm pobierania jonów wapniowych RaM. W tych warunkach mitochondria pobierają wapń znacznie wydajniej, jednak przez stosunkowo krótki okres czasu. Przepływ do mitochondriów składa się zatem z dwóch części. Pierwsza z nich uwzględnia wspomniany powyżej szybki mod RaMowy, druga opisuje prace uniportera mitochondrialnego w trybie standardowym. Istnienie szybkiego mechanizmu typu RaM zostało potwierdzone dzięki badaniom Buntinasa i współpracowników, którzy badali mitochondria wyizolowane z kardiomiocytów szczura. W eksperymentach tych mechanizm RaM został zidentyfikowany jako różny od regularnej działalności uniportera. Zachodzi na początku pulsu wapniowego i wyłącza się gdy stężenie wapnia na zewnątrz mitochondriów przekracza pewną wartość progową (co do rzędu wielkości równą 0.5-0.8μM). W obu rodzajach mitochondriów (wyizolowanych z hepatocytów i kardiomiocytów) dezaktywacja RaM zachodziła w czasie krótszym niż 0.75 s [33]. Przez ponad dekadę RaM postrzegany był jako nowy mechanizm poboru wapnia przez mitochondria, nie związany z białkiem uniportera mitochondrialnego. Dopiero badania przeprowadzone przez Guntera i współpracowników wykazały, że może on mieć związek z tym uniporterem i stanowi dodatkowy sposób transportu jonów wapnia przez to białko [118].

Matematyczny model mechanizmu RaM zaproponowali Dash i Basil [17, 57]. Założyli oni, że uniporter może znajdować się w 5 różnych dyskretnych stanach, które opisują zmiany zachodzące w białku uniportera o związaniu jonów wapnia. Te stany to: R, O, I_1 oraz I_2 i dodatkowo S, którym odpowiadają kolejno następujące stany mitochondrialnego uniportera: stan spoczynkowy (**r**esting), otwarty (**o**pen), stany obniżonej aktywności 1 i 2 (**i**nhibited 1,2), powolny powrót do stanu wyjściowego (**S** - slow recovery state). Eksperymenty numeryczne Basil i Dash przeprowadzali na zredukowanym modelu, który obejmował dwa różne stany: R-O oraz I_1I_2, które odpowiadały stanom: spoczynkowo - otwartym i sumie stanów o obniżonej aktywności. Podczas symulacji stwierdzono, że podczas cyklu pobierania wapnia około 1/4 białek bardzo szybko przechodziło ze stanu RaM do stanu spoczynkowego, dla pozostałych uniporterów przejście zajmowało około 90 s. Dane te interpretowano jako przejście większości uniporterów w stan wolnego pobierania jonów wapnia.

Stosunek białek znajdujących się w stanie spoczynkowym, do białek znajdujących się w stanie otwartym opisywało wyrażenie:

$$f_{Ca} = \frac{\left[Ca^{2+}\right]^n}{\left[Ca^{2+}\right]^n + {K_0}^n} \tag{2.11}$$

Stosunek pomiędzy pierwszym i drugim stanem I wyliczana jest podobnie:

$$g_{Ca} = \frac{\left[Ca^{2+}\right]^n}{\left[Ca^{2+}\right]^n + {K_1}^n} \tag{2.12}$$

Tempo wymiany jonów wapniowych poprzez RaM dane jest następującym wyrażeniem:

$$J_{RaM} = X_{RaM} O \frac{e^{z_{Ca}\Delta\psi F/2RT}\left[Ca^{2+}\right]/K_{Ca}}{1 + \left[Ca^{2+}\right]/K_{Ca}} \tag{2.13}$$

W powyższych równaniach n jest współczynnikiem funkcji Hilla charakteryzujący dynamikę wymiany; $[Ca^{2+}]$ oznacza stężenie wolnych jonów wapnia; K_0 - stężenie progowe wapnia, które jest w stanie uruchomić mechanizm wymiany; K_1 - stężenie progowe stabilizujące mechanizm wymiany w stanie inhibitorowym, K_{Ca} - powinowactwo kompleksu RaM do jonów Ca^{2+}; X_{RaM} aktywność RaM.

Wykorzystując dane uzyskane z eksperymentów, Basil and Dash byli w stanie odtworzyć główne cechy transportu RaM. Symulacje wierne odtwarzały profile poboru jonów Ca^{2+} dla stymulacji ciągłych i odtwarzały wzrost efektywności poboru w przypadku zastosowania wielokrotnych stymulacji w stosunku do pojedynczego, przedłużonego pulsu.

2.4 Bufory wapniowe

Około 99 % jonów wapnia w komórce związana jest z białkami buforowymi (Tab. 1.5) lub buforami nieorganicznymi (cytryniany, fosforany). Do buforów cytoplazmatycznych

należą m.in. kalbindyna, kalretynina i parvalbumina, w retikulum endoplazmatycznym do białek buforujących należą np. kalsekwestryna i kalretikulina. Stężenie białek buforowych jest głównym, ale nie jedynym czynnikiem kształtującym zdolność buforowania wapnia w komórce. Do innych równie istotnych należą kinetyka wiązania i dysocjacji Ca^{2+}, czy też mobilność samych buforów.

Reakcja chemiczna wiązania jonów wapnia przez bufor białkowy Pr:

$$\mathrm{Pr} + \mathrm{Ca}^{2+} \underset{k_-}{\overset{k_+}{\rightleftharpoons}} \mathrm{PrCa} \tag{2.14}$$

gdzie Pr to białka buforujące, natomiast $PrCa$ oznacza zbuforowany wapń.

Powyższa reakcja pozwala na utworzenie prostego modelu buforowania wapnia. Czasoprzestrzenne zmiany stężenia wolnych jonów wapnia w cytozolu, przy uwzględnieniu zjawisk buforowania opisuje się często w sposób przybliżony za pomocą następującego układu równań typu reakcji-dyfuzji:

$$\frac{\partial Ca_{Cyt}}{\partial t} = D_{Ca_{Cyt}} \nabla^2 Ca_{Cyt} + f(c) + \sum (k_{i-} Pr_i Ca - k_{i+} Ca_{Cyt} (Pr_{i\,tot} - Pr_i Ca)) \tag{2.15}$$

$$\frac{\partial Pr_i Ca}{\partial t} = D_{Pr_i Ca} \nabla^2 Pr_i Ca - \sum (k_{i-} Pr_i Ca + k_{i+} Ca_{Cyt} (Pr_{i\,tot} - Pr_i Ca)) \tag{2.16}$$

$$Pr_{i\,tot} = Pr_i + Pr_i Ca \tag{2.17}$$

w którym Pr_iCa oznacza stężenie buforu z przyłączonymi jonami wapnia, Ca_{Cyt} wolne jony wapnia w cytozolu, f(c) to wszystkie reakcje, które określają przepływy jonów wapnia (np. uwolnienie jonów poprzez receptory IP_3R, transport przez pompy wapniowe i inne). Pr_{tot} oznacza całkowite stężenie buforów. Wielkości:

$$K_{di} := \frac{[k_i+]}{k_{i-}} \tag{2.18}$$

nazywane są stałymi równowagi reakcji buforowania lub też stałymi dysocjacji. Wartości stałych dysocjacji dla niektórych buforów podano w Tab. 1.5.

2.4.1 Modelowanie kompleksów błonowych

Kompleksy błonowe zyskały na znaczeniu w ciągu ostatniej dekady, kiedy możliwe było wykorzystanie nowo-otrzymanych wskaźników jonów wapnia w postaci białek transgenicznych [6, 32, 47, 62, 142, 291]. Metody te pozwoliły na pomiar stężeń jonów wapnia w stosunkowo niewielkich przestrzeniach ograniczonych kompleksami błonowymi. Powstały specjalne konstrukty sensorów aequorynowych i białek strukturalnych wschodzących w skład danego kompleksu błonowego, które pozwoliły na oszacowanie zjawiska.

Niewielka ilość danych eksperymentalnych na temat mechanizmu powstawania kompleksów błonowych i ich roli w procesach fizjologicznych komórki spowodowały, że jest

to temat mało popularny dla naukowców związanych z biologią obliczeniową. Jedyny model, który dotyczył aspektu bliskiej apozycji różnego rodzaju struktur komórkowych w kontekście sygnalizacji wapniowej był model trój-kompartmentowy Marhla [183]. Inne podejście zaprezentował Mazel [188], który stworzył stochastyczny model przestrzenny w geometrii trójwymiarowej, uzyskanej ze zdjęć komórek RBL-2H3 wykonanych mikroskopem konfokalnym. Mazel zwrócił szczególną uwagę na odległości pomiędzy poszczególnymi strukturami komórkowymi, jednak w przedstawionym przez niego modelu nie uzyskano oscylacji stężenia jonów wapnia.

2.5 Oscylacje wapniowe

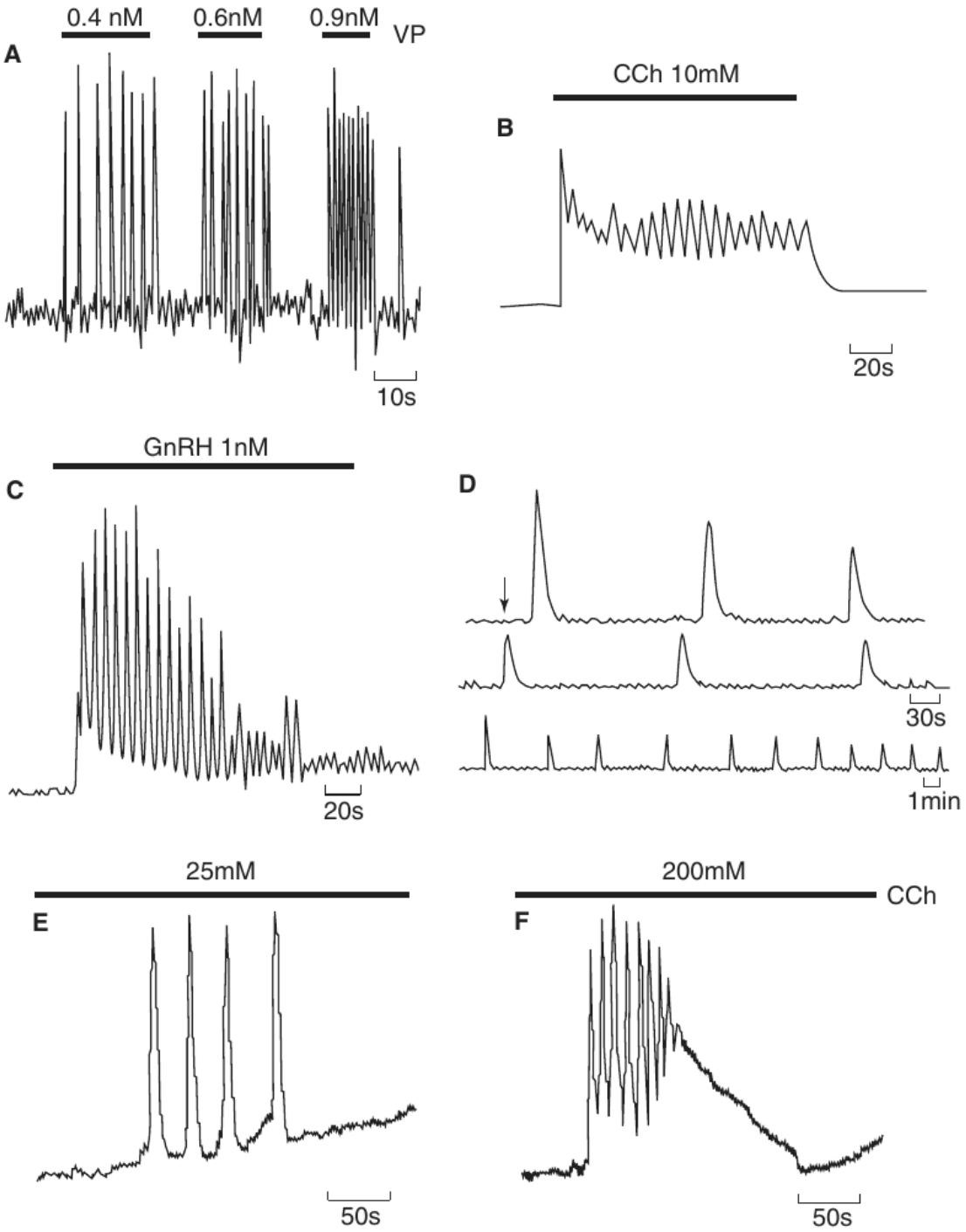
Zmiany stężenia jonów wapnia w poszczególnych kompartmentach komórki, występują w sposób naturalny w wielu rodzajach komórek. Pojawiają się spontanicznie w kardiomiocytach, hepatocytach, komórkach wydzielniczych trzustki lub neuronach. Oscylacje wapniowe pojawiają się również w odpowiedzi na różnego rodzaju bodźce, np. oscylacje w komórkach nabłonka płaskiego wyścielającego (komórkach endotelialnych), w odpowiedzi na infekcję bakteryjną lub zmiany stężenia Ca^{2+} w komórkach czuciowych skóry (w ciałkach Pacciniego oraz w ciałkach Ruffiniego) w odpowiedzi na bodziec mechaniczny [176, 283].

Zastosowanie metod pozwalających badanie zmian stężenia wapnia w pojedynczych komórkach lub nawet kompartmentach, pozwoliło odkryć różnego rodzaju oscylacje wapniowe o bardzo złożonym charakterze. W zależności od komórki okres tych oscylacji może wynosić od 1 sekundy do 10 minut. Przebiegi czasowe tych oscylacji mogą przyjmować różne kształty od ostrych pików z gwałtownym wzrostem („bursting"), do łagodnych o prawie sinusoidalnym przebiegu, z dużą gamą form pośrednich Ryc. 2.1.

Wzbudzenie oscylacji wapniowych w komórce oparte jest na mechanizmie „wszystko albo nic", tzn. pojawiają się dopiero po osiągnięciu pewnego progu pobudzenia. Dalszy wzrost stymulacji może prowadzić do zwiększenia częstotliwości oscylacji, ale nie ma wpływu na amplitudę [149].

W ciągu ostatnich 30 lat powstało wiele modeli matematycznych, które wyjaśniały powstawanie i charakter oscylacji wapniowych. Modele te różniły się pod względem precyzji opisu i zależne były od szeregu założeń, które leżały u podstaw konstrukcji danego modelu. Opisywały oscylacje wapniowe z różnej perspektywy. Uproszczona klasyfikacja modeli przestawiona została wraz z przykładami w Tablicy 2.1 [76].

Schemat przepływów jonów wapnia w modelu dwu-kompartmentowym (two-pool), ograniczający się do przepływów pomiędzy retikulum endoplazmatycznym a cytozolem oraz wymianę ze środowiskiem zewnątrzkomórkowym przedstawiony został na Ryc. 2.2. Przyjmując, że ilość jonów wapnia jest stała w układzie, schemat ten można przedstawić za pomocą równań:



Rycina 2.1: Rożne rodzaje oscylacji jonów wapnia w wielu typach komórek eukariotycznych. A: hepatocyty stymulowane wazopresyną; B: komórki ślinianek aktywowane karbacholem (CCh); C: komórki gonadotropowe tylnego płata przysadki mózgowej stymulowane gonadoliberyną (GnRH); D: oocyty chomika tuż po zapłodnieniu; E, F: komórki nowotworowe wywodzące się z limfocytów typu B, stymulowane dwoma różnymi stężeniami karbacholu [149], str. 277.

$$\frac{dc}{dt} = J_{ch} - J_{pump} + J_{in} - J_{PMCA} \tag{2.19}$$

$$\frac{dc_{ER}}{dt} = \gamma(J_{pump} - J_{ch}) \tag{2.20}$$

W równaniach tych c oznacza stężenie jonów wapnia w cytozolu uśrednione po jego objętości. c_{ER} oznacza natomiast stężenie jonów wapnia w retikulum endoplazmatycznym. γ to stosunek objętości cytozolu do objętości kompartmentu:

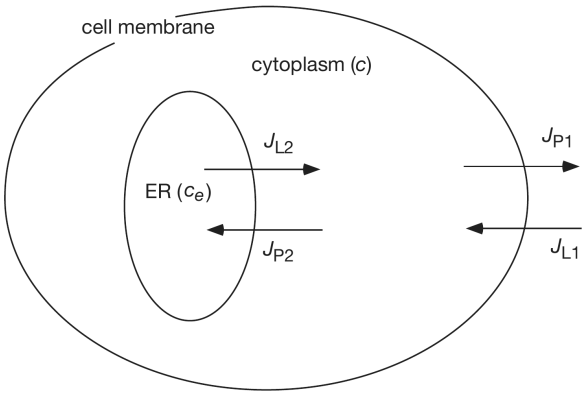
$$\gamma = \frac{V_{Cyt}}{V_{ER}} \tag{2.21}$$

J_{ch} to wypływ jonów wapnia przez kanały wapniowe z ER do cytozolu, J_{pump} napływ jonów wapnia do ER z cytozolu, oraz analogiczne prądy wapniowe realizowane przez kanały i pompy wapniowe na powierzchni błony komórkowej (J_{in} wpływ jonów Ca^{2+} do cytozolu, J_{PMCA} usuwanie jonów Ca^{2+} z cytozolu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej). Takie modele nazywane są **modelami otwartymi**, gdyż wapń może przepływać pomiędzy przestrzenią zewnątrzkomórkowa, a cytozolem [149, 258]. Oscylacje wynikające z powyższego modelu widoczne są na Ryc. 2.3.

W niektórych modelach zakłada się, ze względu na niewielką wymianę jonów Ca^{2+} ze środowiskiem zewnętrznym, że ilość jonów wapnia w komórce pozostaje stała:

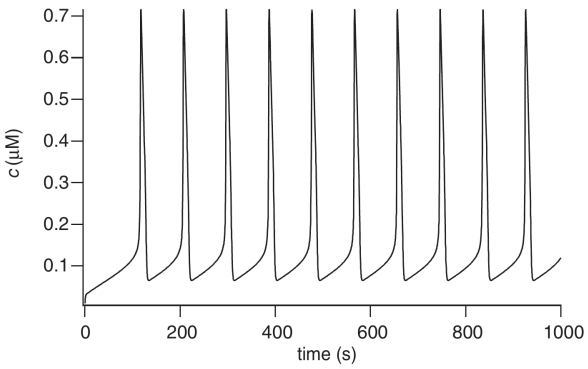
$$\gamma c + c_{ER} = constans \tag{2.22}$$

Takie modele nazywają się **modelami zamkniętymi** [149].



Rycina 2.2: Diagram przedstawiający typowe przepływy jonów wapnia w prostym modelu CICR w neuronach żaby ryczącej [149].

Zauważmy, że przedstawiony powyżej model dwu-kompartmentowy jest często redukowany do modelu jednokompartmentowego, w którym rozważa się jedynie stężenie wolnych jonów wapnia w cytozolu, a przepływy jonów wapnia pomiędzy cytozolem a retikulum realizowany jest poprzez dodanie odpowiedniej funkcji źródłowej. Z drugiej strony możliwe jest rozszerzenie modelu na dodatkowe kompartmenty (np. mitochondria [183], jądro komórkowe [4] oraz uwzględnienie dodatkowych zjawisk np. przemian zachodzących na powierzchni błony komórkowej [131]). Można również uwzględnić obecność białek buforujących w każdym z kompartmentów poprzez wprowadzenie odpowiedniej stałej skalującej przed przepływami z danego kompartmentu [183]. W przypadku modeli przestrzennych obecność buforów uwzględnia się poprzez modyfikację funkcji źródłowych, jak również poprzez wprowadzenie efektywnego współczynnika dyfuzji wapnia (istotnie mniejszego od średnicy komórki).



Rycina 2.3: Typowe oscylacje reprodukowane w modelu prostych oscylacji jonów wapnia. Dla $c_0 = 1000$ µM [149].

W wielu przypadkach oscylacje wapniowe nie są zjawiskiem regularnym, lecz pojawiają się w sposób chaotyczny i posiadają stochastyczny charakter [84]. Spowodowane to jest stochastyczną naturą zjawiska otwierania i zamykania się kanałów wapniowych (np.IP_3R/RyR). Może się zdarzyć, że w wiele obserwowanych oscylacji, mimo swojej regularności powstała w wyniku procesów stochastyczny, a nie deterministycznych mechanizmów oscylacyjnych.

Tablica 2.1: Uproszczona klasyfikacja modeli oscylacji wapniowych - przekrój.

Autor	**Rok**	**Opis**	**Referencje**
		Deterministyczne	
Mayer	1988	Model oscylacji indukowanych receptorem na powierzchni komórki	[192]
Goldbeter	1990	Zamknięty, mechanizm CICR	[105]
Semogyi	1990	Otwarty, oscylacje wapnia w hepatocytach, uwzględniał regulator białkowy - kalmodulinę	[259]
DeYong	1992	Ośmiostanowy model receptora IP_3	[63]
Atri	1993	Jednokompartmentowy, opisuje oscylacje Ca^{2+} w cytozolu oocytu	[13]
Tang	1994	Model oscylacji w miocytach	[270]
Keizer	1996	Model kanału RyR	[151]
Borghans	1997	Otwarty, 2kompartmenty	[29]
Marhl	2000	Trzy kompartmenty: Ca, ER, Mit	[183]
Bindschadler	2001	Międzykomórkowy, 2 kompartmenty	[26]
Sneyd	2002	Model kanału IP_3R	[256]
Fridlyand	2003	Zamknięty 2 kompartmenty, oscylacje wapnia w komórkach trzustki	[91]
Oxhamre	2005	Zamknięty, 2 kompartmenty, oscylacje indukowane infekcją bakteryjną	[207]
Wang	2007	Oscylacje wapniowe wzbudzone ATP	[289]
Dash	2008	Model wymienników mitochondrialnych	[56]
Dash	2009	„Mechanistyczny” model uniportera mitochondrialnego, który uwzględnia rolę potencjału transbłonowego i zmiany konformacji uniportera	[57]

Kontynuacja na następnej stronie...

Tablica 2.1 – *Uproszczona klasyfikacja modeli oscylacji wapniowych - kontynuacja...*

Autor	**Rok**	**Opis**	**Referencje**
Zeng	2009	Spontanicznie indukowane oscylacje wapniowe w astrocytach	[307]
Dyzma	2012	Trój-kompartmentowy model uwzględniający mikrodomeny ER-Mit	[77]
		Stochastyczne	
Magnus	1998	Model oscylacji Ca^{2+} w komórkach trzustki (β) z uwzględnieniem właściwości elektrycznych komórek (transport pozostałych jonów)	[178, 179]
Coombes	2004	Model "iskier"powstających podczas otwierania się kanałów wapniowych w magazynach komórkowych	[50]
Kummer	2005	Porównanie modelu stochastycznego w stosunku do modeli deterministycznych	[157]
Keener	2006		[150]
Dupont	2008	Model oscylacji wapniowych w hepatocytach	[74]
		Mieszane	
Bazil	2011	Model mechanizmu RaM	[17]
		Przestrzenne	
Wagner	1994	Rola szybkich buforów w modelach dyfuzji i oscylacji jonów wpania	[287]
Dawson	1999	Model fal wapniowych w postaci serii pulsów wapniowych wzdłuż ER	[58]
Falcke	2000	Fale spiralne w oocycie	[85]
Fink	2000	Fale wapniowe wywołane bradykininą w komórkach neuroblastomy, geometria bazująca na zdjęciach mikroskopowych komórek	[87]
Falcke	2003	Stochastyczny, przestrzenny	[83]
Falcke	2003	Model dyfuzji buforów wapniowych	[82]
Higgins	2007	Model mikrodomen pomiędzy sarkomerami w kardiomiocycie	[133]
Thul	2008	Model dyfuzji seryjnych wyładowań jonów wapnia z magazynów ER w postaci fal	[273]
Kaźmierczak	2010	Fale biegnące w komórkach o zróżnicowanej geometrii	[147]

Rozdział 3

Modelowanie przestrzenne

3.1 Równania reakcji-dyfuzji w modelach ciągłych

Najprostszy przestrzenny model dynamiki wapnia w komórce zadany jest przez jedno równanie typu reakcji-dyfuzji na stężenie jonów wapniowych w cytozolu:

$$\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = D\Delta c(x,t) + f(c(x,t)) \tag{3.1}$$

W równaniu powyższym $c = c(x,t)$ oznacza stężenie niezwiązanych jonów wapnia w punkcie $x \in \Omega$ i czasie $t \geq 0$. Ω *jest tutaj otwartym (i prezwartym) obszarem modelującym rozpatrywany obszar komórki*, $f(c)$ jest funkcją charakteryzującą przepływ wapnia między cytozolem a zewnętrzem komórki oraz wewnątrzkomórkowymi magazynami wapniowymi.

W modelu zadanym równaniem (3.1) zaniedbujemy również procesy przyłączania wapnia przez molekuły buforujące. Uwzględnienie tego zjawiska prowadzi do układu równań na ewolucję stężenia wapnia w cytozolu c, stężenie molekuł buforujących, które przyłączyły wapń $b_i = [Ca^{2+}\, B_i]$ oraz stężenie samych molekuł buforujących B_i, które nie przyłączyły jonów wapnia. Układ ten ma następującą postać:

$$\begin{aligned}
\frac{\partial c}{\partial t} &= D_c\Delta c + \sum_{i=1}^{n}[k_i^- b_i - k_i^+ cB_i] + f(c) \\
\frac{\partial b_i}{\partial t} &= D_i\Delta b_i - [k_i^- b_i - k_i^+ cB_i], \quad i = 1,\ldots,n \geq 1 \\
\frac{\partial B_i}{\partial t} &= D_{Bi}\Delta B_i + [k_i^- b_i - k_i^+ cB_i], \quad i = 1,\ldots,n \geq 1.
\end{aligned} \tag{3.2}$$

Stałe $k_i^- > 0, k_i^+ > 0$ oznaczają tutaj współczynniki kinetyczne odłączania i przyłączania jonów wapnia, D_c jest współczynnikiem dyfuzji dla wolnych jonów wapnia, D_i współczynnikiem dyfuzji dla „uwapniowanych" buforów i-tego rodzaju a D_{B_i} współczynnikiem dyfuzji dla molekuł buforujących i-tego rodzaju.

Naturalnym, powszechnie czynionym założeniem, jest założenie o równości współczynników dyfuzji Di oraz D_{Bi}. W tym przypadku łatwo dowieść (poprzez dodanie równań na b_i oraz B_i), że jeśli w chwili początkowej $t = 0$ stężenie całkowite molekuł buforujących i-tego rodzaju $b_i(x,0) + B_i(x,0)$ jest jednorodne przestrzennie, to pozostanie takie również dla wszystkich czasów $t > 0$. Tak więc $b_i(x,t) + B_i(x,t) = b_0^i =$

const, b_0^i oznacza tutaj całkowite stężenie i-tego rodzaju molekuł buforujących, tzn. $b_0^i = [B_i] + [Ca^{++}\, B_i]$. W tym przypadku $B_i(x,t) = b_0^i - b_i(x,t)$ i możemy ograniczyć się do układu postaci:

$$\begin{aligned} \frac{\partial c}{\partial t} &= D_c \Delta c + \sum_{i=1}^{n} [k_i^- b_i - k_i^+ c(b_i^0 - b_i)] + f(c) \\ \frac{\partial b_i}{\partial t} &= D_i \Delta b_i - [k_i^- b_i - k_i^+ c(b_i^0 - b_i)], \quad i = 1, \ldots, n \geq 1. \end{aligned} \tag{3.3}$$

Uwaga

W istocie rzeczy, wskaźnik i w równaniach (3.3) powinien numerować raczej miejsca wiązania wapnia, np. miejsca typu EF-hand, a nie poszczególne rodzaje molekuł buforujących. Tak więc, jednemu rodzajowi molekuł buforujących powinna odpowiadać liczba wskaźników równa liczbie miejsc typu EF-hand w molekule. Jeśli jednak przyłączanie kolejnych jonów wapnia nie zmienia istotnie fizycznych własności molekuły, w szczególności jej współczynnika dyfuzji, to opis dany układem (3.3) jest wystarczający. □

Bardziej złożonym i dokładnym opisem jest model, w którym podobnie do „cytozolicznego" rozważa się trzy kompartmenty komórkowe: cytozol, retikulum oraz kompartment mitochondrialny.

Niech Ω_{Cyt}, Ω_{Ret} oraz Ω_{Mit} oznaczają podobszary komórki odpowiadające powyższym kompartmentom. Tak więc

$$\Omega_{Cyt},\, \Omega_{Ret},\, \Omega_{Mit} \subset \Omega$$

Zakładamy również, że zbiory Ω_{Ret} oraz Ω_{Mit} są rozłączne - $\overline{\Omega}_{Ret} \cap \overline{\Omega}_{Mit} = \emptyset$ oraz, że $\partial\Omega \cap (\partial\Omega_{Ret} \cup \partial\Omega_{Mit}) = \emptyset$, tzn. że organelle retikularne i mitochondrialne są odseparowane od membrany komórkowej. (Ostatnie założenie jest nie do końca słuszne z uwagi na istnienie obszarów bezpośredniej bliskości obszarów retikularnych i membrany komórkowej). Oczywiście, z racji swojej struktury geometrycznej, zbiory Ω_{Ret}, Ω_{Mit} mogą być w ogólności zbiorami **niejednospójnymi**.

Przyjmujemy, że w kompartmencie Ω_γ, $\gamma \in \{Cyt,\, Ret, Mit\}$, dynamika wapnia dana jest poprzez równania analogiczne do układu (3.3), tj.

$$\frac{\partial c_\gamma}{\partial t} = D_c \Delta c_\gamma + \phi(c)\delta_{\gamma;Cyt} + \sum_{i=1}^{n} [k_{i\gamma}^- b_{i\gamma} - k_{i\gamma}^+ c(b_{i\gamma}^0 - b_{i\gamma})] \tag{3.4}$$

$$\frac{\partial b_{i\gamma}}{\partial t} = D_{i\gamma} \Delta b_{i\gamma} - [k_{i\gamma}^- b_{i\gamma} - k_{i\gamma}^+ c(b_{i\gamma}^0 - b_{i\gamma})], \quad i = 1, \ldots, n_\gamma \geq 1 \tag{3.5}$$

W powyższym układzie $\phi(c)$ oznacza możliwe strumienie jonów wapniowych między wnętrzem komórki a przestrzenią miedzykomórkową, gdzie $\delta_{\gamma;Cyt}$ oznacza deltę Kroneckera (równą 1 dla $\gamma = Cyt$ oraz 0 w przeciwnym przypadku). Układ powyższy uzupełniony jest wyrażeniami na dyfuzyjne prądy miedzykompartmentalne, dokładniej

$\Phi_{Ret-Cyt}$ pomiędzy retikulum a cytozolem oraz $\Phi_{Mit-Cyt}$ pomiędzy mitochondriami a cytozolem. Tak więc, układ (3.4)-(3.5) uzupełniamy na granicach cytozolicznych warunkami typu Robina postaci:

$$D_c \boldsymbol{n}(x) \cdot \nabla c(x,t) = \Phi_{Ret-Cyt}(x,t) \quad na \quad \Gamma_{Ret-Cyt} \tag{3.6}$$

oraz

$$D_c \boldsymbol{n}(x) \cdot \nabla c(x,t) = \Phi_{Mit-Cyt}(x,t) \quad na \quad \Gamma_{Mit-Cyt} \tag{3.7}$$

oraz warunkami wyrażającymi fakt, że molekuły buforujące (z przyłączonymi jonami wapnia) nie przechodzą przez błony rozgraniczające, tzn. dla $i = 1, \ldots, n_{Cyt}$

$$D_{iRet} \boldsymbol{n}(x) \cdot \nabla b_{iCyt}(x,t) = 0 \quad na \quad \Gamma_{Ret-Cyt} \tag{3.8}$$

oraz dla $i = 1, \ldots, n_{Mit}$

$$D_{iMit} \boldsymbol{n}(x) \cdot \nabla b_{iMit}(x,t) = 0 \quad na \quad \Gamma_{Mit-Cyt} \tag{3.9}$$

gdzie $\Gamma_{Ret-Cyt}$ oznacza zbiór granic cytozoliczno-retikularnych a $\Gamma_{Mit-Cyt}$ oznacza zbiór granic cytozoliczno-mitochondrialnych. $\mathbf{n}(x)$ jest tutaj wektorem normalnym do granicy w punkcie x skierowanym w stronę zewnętrzną, tzn. „od cytozolu", ∇ jest operatorem gradientu. Tak więc $\mathbf{n}(x) \cdot \nabla$ jest pochodną wzdłuż wektora prostopadłego do granicy skierowanego od kompartmentu cytozolicznego. Przy tej konwencji
$\Phi_{Ret-Cyt}(x,t) > 0$ oznacza, że przepływ jonów wapniowych następuje od retikulum do cytozolu a $\Phi_{Mit-Cyt}(x,t) > 0$ oznacza, że przepływ jonów wapniowych następuje od mitochondrium do cytozolu w punkcie x rozpatrywanej granicy oraz czasie t. Faktycznie, zakłada się, że $\Phi_{Ret-Cyt}(x,t)$ zależy (w sposób algebraiczny) od wartości stężeń $c_{Cyt}(x,t)$ oraz $c_{Ret}(x,t)$ po obu stronach granicy $\Gamma_{Ret-Cyt}$:

$$\Phi_{Ret-Cyt}(x,t) = \Phi_{Ret-Cyt}\left(c_{Cyt}(x,t), c_{Ret}(x,t)\right)$$

a $\Phi_{Mit-Cyt}(x,t)$ od wartości stężeń $c_{Cyt}(x,t)$ oraz $c_{Mit}(x,t)$ po obu stronach granicy $\Gamma_{Mit-Cyt}$:

$$\Phi_{Mit-Cyt}(x,t) = \Phi_{Mit-Cyt}\left(c_{Cyt}(x,t), c_{Mit}(x,t)\right).$$

Za prawdziwością takiego założenia przemawia fakt, że przepływy pomiędzy kompartmentami zależą głównie od stanu od receptorów znajdujących się na powierzchniach granicznych błon międzykompartmentalnych (receptorów IP_3R na błonie retikularnej oraz uniporterów mitochondrialnych na IMM). Należy jednak pamiętać, że przekazywanie jonów wapniowych między kompartmentami może mieć charakter nielokalny (w czasie i przestrzeni) i zależeć od wielu dodatkowych, często trudnych do uwzględnienia czynników. Konkretne postaci tych przepływów zależą od rozpatrywanego modelu,

który powinien uwzględniać rodzaj komórek, ich aktualny stan, jak również zewnętrzne warunki, w jakich się znajdują.

Mimo, iż układ (3.4)-(3.5) wraz z warunkami (3.6)-(3.7) ma stosunkowo prostą strukturę, jednak jego analiza jest trudna, nawet z numerycznego punktu widzenia. Jeśli nie jesteśmy zainteresowani szczegółowym rozkładem przestrzennym jonów wapniowych i „uwapniowanych" buforów, a tylko ich stężeniami uśrednionymi po odpowiednich kompartmentach, to możemy rozpatrywać odpowiadający układ równań różniczkowych zwyczajnych. Przy pewnych dodatkowych warunkach tego typu dopasowanie może być częściowo usprawiedliwione.

Dla ustalenia uwagi, załóżmy, że przepływy wapnia między wnętrzem a zewnętrzem komórki są zerowe oraz, że aktywność wszystkich cząsteczek buforujących może być zastąpiona poprzez jeden reprezentatywny dla danego kompartmentu bufor. W kontekście układu (3.4)-(3.5) oznacza to, że $\phi(c) \equiv 0$ oraz, że $n_\gamma = 1$ dla wszystkich kompartmentów γ.

Równania na ewolucję stężenia wapnia wewnątrz kompartmentu retikularnego oraz mitochondrialnego ($\gamma = Ret$, $\gamma = Mit$) mogą być zapisane w postaci:

$$\frac{\partial c_\gamma}{\partial t} = D_c \nabla^2 c_\gamma - E_\gamma(c_\gamma, b_\gamma) \tag{3.10}$$

$$\frac{\partial b_\gamma}{\partial t} = D_{\gamma b} \nabla^2 b_\gamma + E_\gamma(c_\gamma, b_\gamma) \tag{3.11}$$

gdzie $E_\gamma(c_\gamma, b_\gamma) = -k_\gamma^- b_\gamma + k_\gamma^+ c_\gamma (b_\gamma^0 - b_\gamma)$.

Całkując po rozważanym kompartmencie ($\gamma = Ret, Mit$) otrzymujemy po zastosowaniu prawa Gaussa-Ostrogradskiego i warunków brzegowych (3.6),(3.7)

$$\frac{\partial \int_{\Omega_\gamma} c_\gamma dV_\gamma}{\partial t} = -\int_{\Gamma_{\gamma-Cyt}} \Phi_{\gamma-Cyt}(c_{Cyt}, c_\gamma) dS_{\gamma,Cyt} - \int_{\Omega_\gamma} E_\gamma(c_\gamma, b_\gamma) dV_\gamma \tag{3.12}$$

$$\frac{\partial \int_{\Omega_\gamma} b_\gamma dV_\gamma}{\partial t} = \int_{\Omega_\gamma} E_\gamma(c_\gamma, b_\gamma) dV_\gamma \tag{3.13}$$

Dodając powyższe równania otrzymujemy ogólne prawo zachowania na całkowitą zawartość wapnia w kompartmencie γ:

$$\frac{\partial \int_{V_\gamma} (c_\gamma + b_\gamma) dV_\gamma}{\partial t} = -\int_{\Gamma_{\gamma-Cyt}} \Phi_{\gamma-Cyt}(c_{Cyt}, c_\gamma) \tag{3.14}$$

Jeśli założyć, że współczynniki dyfuzji wolnych jonów wapnia są dostatecznie duże w stosunku do wymiarów kompartmentu (a raczej każdej z jego spójnych składowych, np. pojedynczych mitochondriów), to możemy założyć, że przestrzenny rozkład stężeń

c_γ oraz b_γ jest jednorodny w kompartmencie γ. W konsekwencji $c_\gamma = c_\gamma(t)$, $b_\gamma = b_\gamma(t)$, tzn. zależą jedynie od czasu a nie zależą od zmiennej przestrzennej x. Równania (3.12),(3.13) stają się równaniami różniczkowymi zwyczajnymi postaci

$$\frac{\partial c_\gamma}{\partial t} = -S_{\gamma,Cyt} V_\gamma^{-1} \Phi_{\gamma - Cyt}(c_{Cyt}, c_\gamma) - E_\gamma(c_\gamma, b_\gamma) \tag{3.15}$$

$$\frac{\partial b_\gamma}{\partial t} = E_\gamma(c_\gamma, b_\gamma) \tag{3.16}$$

gdzie $S_{\gamma,Cyt}$ jest powierzchnią granicy rozdzielającej cytozol od kompartmentu γ. Dodatkowe założenia odnośnie współczynników kinetycznych wewnątrz kompartmentu γ implikują kolejne istotne uproszczenia. Przyjmijmy zatem, że:

1. k_γ^- oraz k_γ^+ są dostatecznie duże

2. stężenie b_γ^0 jest dużo większe od całkowitego stężenia jonów wapniowych (związanych i niezwiązanych), w szczególności $b_\gamma^0 >> b_\gamma$

Z założenia 1. wynika, że:

$$E_\gamma(c_\gamma, b_\gamma) \cong 0$$

a z założenia 2.

$$-k_\gamma^- b_\gamma + k_\gamma^+ c_\gamma (b_\gamma^0 - b_\gamma) \cong -k_\gamma^- b_\gamma + k_\gamma^+ c_\gamma b_\gamma^0$$

W konsekwencji

$$b_\gamma \cong k_\gamma^+ (k_\gamma^-)^{-1} c_\gamma b_\gamma^0$$

oraz

$$\frac{c_\gamma}{c_\gamma + b_\gamma} \cong \frac{1}{1 + \frac{k_\gamma^+}{k_\gamma^-} b_\gamma^0} := \beta_\gamma \tag{3.17}$$

Zatem, przy powyższych założeniach, stosunek stężeń jonów wolnych wapniowych w kompartmencie γ do całkowitego stężenia jonów wapniowych (wolnych i związanych) jest w przybliżeniu stały. Z równania (3.14) otrzymujemy zatem

$$\frac{\partial c_\gamma}{\partial t} = \frac{\beta_\gamma}{\rho_\gamma} \left[\frac{S_{\gamma,Cyt}}{V_{Cyt}} \Phi_i(c_{Cyt}, c_\gamma) \right] \tag{3.18}$$

gdzie

$$\rho_\gamma := \frac{V_\gamma}{V_{Cyt}}$$

a $\gamma = \{Ret, Mit\}$.

Tego rodzaju założenia leżą u podstaw całokomórkowych, w szczególności wykorzystywanego przez nas w pracy trój-kompartmentowego modelu Marhla [183], stanowiąc o jego względnej prostocie. O ile jednak założenie jednorodności rozkładu stężenia wolnych jonów wapniowych i uwapniowanych kompleksów może być częściowo usprawiedliwione małymi wymiarami pojedynczych składowych kompartmentów niecytozolicznych, o tyle założenia jednorodności rozkładów w kompartmencie cytozolicznym są już bardziej problematyczne ze względu na jego jednospójność (brak podziału na mniejsze podkompartmenty, jak w przypadku składowej mitochondrialnej i retikularnej).

Całkując po kompartmencie cytozolicznym, po zastosowaniu prawa Gaussa - Ostrogradskiego i warunków brzegowych (3.6),(3.7) otrzymujemy, jak poprzednio

$$\frac{\partial \int_{\Omega_{Cyt}} c_{Cyt} dV_{Cyt}}{\partial t} = \sum_{\gamma=Ret,\,Mit} \int_{\Gamma_{\gamma-Cyt}} \Phi_{\gamma-Cyt}(c_{Cyt}, c_\gamma) dS_{\gamma,Cyt} - \int_{\Omega_{Cyt}} E_{Cyt}(c_{Cyt}, b_{Cyt}) dV_{Cyt} \tag{3.19}$$

$$\frac{\partial \int_{\Omega_{Cyt}} b_{Cyt} dV_{Cyt}}{\partial t} = \int_{\Omega_{Cyt}} E_{Cyt}(c_{Cyt}, b_{Cyt}) dV_{Cyt} \tag{3.20}$$

Dodając powyższe równania, otrzymujemy prawo zachowania dla składowej cytozolicznej, analogiczne do (3.18):

$$\frac{\partial \int_{\Omega_{Cyt}} (c_{Cyt} + b_{Cyt}) dV_{Cyt}}{\partial t} = \sum_{\gamma=Ret,\,Mit} \int_{\Gamma_{\gamma-Cyt}} \Phi_{\gamma-Cyt}(c_{Cyt}, c_\gamma) dS_{\gamma,Cyt} \tag{3.21}$$

Dodając stronami równania (3.18) dla $\gamma = Ret$, $\gamma = Mit$ i równanie (3.18) otrzymujemy globalne prawo zachowania ilości jonów wapniowych:

$$\sum_{\gamma=Cyt,Ret,Mit} \frac{\partial \int_{\Omega_\gamma} (c_\gamma + b_\gamma) dV_\gamma}{\partial t} = 0$$

Przy założeniach prowadzących do relacji (3.17) równanie to przekształca się do postaci:

$$\frac{\partial \int_{\Omega_{Ret}} c_{Ret} \beta_{Ret}^{-1} dV_{Ret}}{\partial t} + \frac{\partial \int_{\Omega_{Mit}} c_{Mit} \beta_{Mit}^{-1} dV_{Mit}}{\partial t} + \frac{\partial \int_{\Omega_{Cyt}} (c_{Cyt} + b_{Cyt}) dV_{Cyt}}{\partial t} = 0$$

Zakładając dalej przestrzenną jednorodność c_γ oraz b_γ, $\gamma \in \{Cyt, Ret, Mit\}$, otrzymujemy:

$$c_{Ret} \frac{\rho_{Ret}}{\beta_{Ret}} + c_{Mit} \frac{\rho_{Mit}}{\beta_{Mit}} + (c_{Cyt} + b_{Cyt}) = C_c V_c^{-1} \tag{3.22}$$

gdzie C_c jest całkowitą ilością jonów wapniowych w układzie. Co więcej, wielkość możemy interpretować jako stężenie „całkowite" odniesione do objętości cytozolu V_c.

Założenie jednorodności przestrzennej we wszystkich kompartmentach prowadzi, na podstawie (3.19) oraz (3.18) do układu równań zwyczajnych postaci:

$$\frac{\partial c_{Cyt}}{\partial t} = \sum_{\gamma=Ret,\,Mit} \frac{S_{\gamma,Cyt}}{V_{Cyt}} \Phi_{\gamma-Cyt}(c_{Cyt}, c_\gamma) - \tilde{E}_{Cyt}(c_{Cyt}, b^0_{Cyt}) \tag{3.23}$$

$$\frac{\partial c_{Ret}}{\partial t} = -\frac{\beta_{Ret}}{\rho_{Ret}} \left[\frac{S_{Ret,Cyt}}{V_{Cyt}} \Phi_{\gamma_C yt}(c_{Cyt}, c_{Ret}) \right] \tag{3.24}$$

$$\frac{\partial c_{Mit}}{\partial t} = -\frac{\beta_{Mit}}{\rho_{Mit}} \left[\frac{S_{Mit,Cyt}}{V_{Cyt}} \Phi_{\gamma_C yt}(c_{Cyt}, c_{Mit}) \right] \tag{3.25}$$

gdzie

$$\tilde{E}_{Cyt}(c_{Cyt}, b^0_{Cyt}) = E(c_{Cyt}, \tilde{b}_{Cyt})$$

oraz, na podstawie (3.22),

$$\tilde{b}_{Cyt} = C_c V_c^{-1} - c_{Ret}\frac{\rho_{Ret}}{\beta_{Ret}} - c_{Mit}\frac{\rho_{Mit}}{\beta_{Mit}} - c_{Cyt}$$

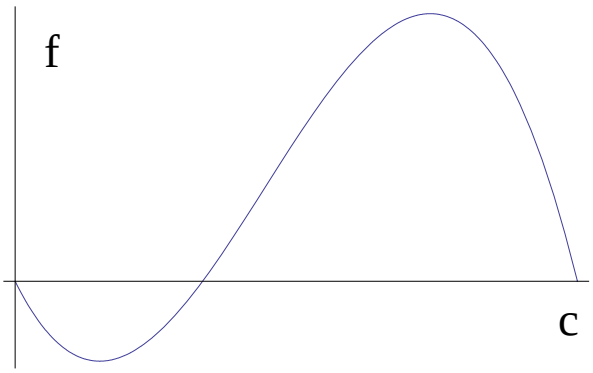
3.2 Fale biegnące stężenia wapnia. Sprzężenia mechanochemiczne związane z obecnością jonów wapniowych w cytozolu

W wielu sytuacjach skończona dyfuzyjna prędkość wyrównywania stężeń wapnia wewnątrz danego kompartmentu może być źródłem dodatkowych efektów. Do efektów takich może należeć rozchodzenie się sygnału wapniowego (w postaci zmieniającego się stężenia) między poszczególnymi punktami komórki, np. między membraną a poszczególnymi organellami, czy też między jednym a drugim końcem długiej komórki, np. komórki mięśniowej. W tym ostatnim przypadku możemy, oczywiście z pewnym przybliżeniem, traktować propagację sygnału wapniowego jak falę biegnącą. Taka matematyczna idealizacja upraszcza znacznie analizę zjawiska i jest w wielu sytuacjach dość dobrze usprawiedliwiona. W pierwszym przybliżeniu fale biegnące można opisać pojedynczym równaniem typu reakcji dyfuzji postaci (3.1). Człon źródłowy $f(c)$ w tym równaniu jest najczęściej modelowany w postaci funkcji bistabilnej 3.1.

$$f(c) = Ac(c-a)(1-c)$$

gdzie $A > 0$.

Oprócz kluczowego wpływu na inicjację wielu ścieżek sygnałowych wewnątrz komórki, podwyższone stężenie wolnych jonów wapniowych może generować naprężenia



Rycina 3.1: Wykres autokatalitycznej funkcji źródłowej w równaniu (3.1). Po przekroczeniu pewnej wartości progowej $[Ca^{2+}]$ następuje autokatalityczny wypływ jonów wapnia z magazynów retikularnych. Takie zachowanie związane jest z własnościami kanałów retikularnych, których przewodnictwo zadane jest stanem receptorów IP_3/RyR.

mechaniczne [196]. Co więcej, zgodnie z klasycznymi prawami termodynamiki, zjawisko powyższe ma swoje lustrzane odbicie: mechaniczne naprężenia wewnątrz komórki lub na membranie komórkowej mogą być źródłem lokalnych zmian stężenia wolnych jonów wapniowych.

W najprostszym modelu [196] równania opisujące ewolucję stężenia jonów wapniowych oraz towarzyszące jej zjawiska mechaniczne w ośrodkach biologicznych (komórkach lub tkankach) mają następującą postać:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_{eff}\nabla^2 c + f(c) + \gamma\theta, \tag{3.26}$$

$$\nabla \cdot \boldsymbol{\sigma} = 0, \tag{3.27}$$

gdzie $\theta = \nabla \cdot \boldsymbol{u}$ jest tzw. dylatacją a $\boldsymbol{u}$ jest wektorem przemieszczenia w punkcie. Tensor ciśnień $\boldsymbol{\sigma} \equiv \sigma_{ij}$, gdzie

$$\sigma_{ij} = \theta\lambda\delta_{ij} + 2G\varepsilon_{ij} + \nu_1\theta_{,t}\delta_{ij} + \nu_2\varepsilon_{ij,t} + \tau_{ij}. \tag{3.28}$$

ν_1 i ν_2 są tutaj odpowiednimi współczynnikami lepkości „materiału" komórki rozpatrywanej jako ośrodek mechaniczny. Jak poprzednio, w równaniu (3.26) c oznacza stężenie wolnych jonów wapnia w cytozolu, D_{eff} dla jonów wapnia jest ich efektywnym współczynnikiem dyfuzji, $f(c)$ funkcją opisującą transport jonów wapniowych do- oraz z- cytozolu (tzn. ich przepływ między cytozolem a pozostałymi kompartmentami oraz ewentualnie przestrzenią międzykomórkową). W równaniu (3.28) ε_{ij} są składowymi tensora deformacji $\boldsymbol{\varepsilon} = 1/2(\nabla\boldsymbol{u} + \nabla\boldsymbol{u}^T)$, λ oraz G oznaczają współczynniki Lame'a ν_1 i ν_2 są współczynnikami lepkości. τ_{ij} są składowymi tzw. aktywnego tensora sił trakcji $\boldsymbol{\tau}$. Siły te związane są z oddziaływaniami aktyno-miozynowymi, dokładniej

z tworzeniem się mostków miozynowych pomiędzy włóknami aktynowymi prowadzącymi do kontrakcji ośrodka. Częstym założeniem nakładanym na tensor trakcji, które będzie przyjęte poniżej, jest jego diagonalność:

$$\boldsymbol{\tau} = \mathrm{d}iag(\tau_{11}, \tau_{22}, \tau_{33}).$$

W równaniu (3.27), zostały pominięte człony inercjalne, tj. $\frac{\partial \rho \boldsymbol{w}}{\partial t} + \frac{1}{2}\nabla \cdot (\rho\, \boldsymbol{w} \otimes \boldsymbol{w})$,gdzie ρ jest (uśrednioną) gęstością ośrodka a w jego lokalną prędkością, ponieważ towarzyszące dynamice wapniowej zjawiska mechaniczne indukują przemieszczenia punktów ośrodka odbywające się ze stosunkowo niewielkimi prędkościami. Poniżej, założymy również, że dywergencja tensora napięć jest równa zeru. Jest to równoważne założeniu, że nie ma żadnych zewnętrznych więzów na ekspansję lub też kontrakcję poszczególnych elementów ośrodka. (Z założenia tego zrezygnujemy w ostatnim rozważanym przez nas przypadku.) Liniowa forma członu mechanochemicznego ($\gamma\theta$) w równaniu została zapostulowana w książce [196], tom 2, równanie 6.72.

Dynamika lokalnego stężenia wapnia wewnątrz komórki lub grupy komórek koordynuje szereg procesów fizjologicznych. Odgrywa kluczową rolę w przekazywaniu bodźców do wnętrza komórki oraz uczestniczy w procesie tworzenia się mostków miozynowych pomiędzy włóknami aktyno-miozynowymi. Proces ten jest szczególnie ważny w długich komórkach mięśniowych, gdyż prowadzi do ich kontrakcji. Z drugiej strony, lokalne deformacje komórki, wpływają na dynamikę wapnia poprzez ich mechaniczne oddziaływanie na wewnątrzkomórkowe magazyny wapniowe (głównie retikulum). Jak wspomnieliśmy, oddziaływanie to opisuje się za pomocą wyrażenia $\gamma\theta$.

W pracy [147] byliśmy zainteresowani dokładnymi rozwiązaniami w postaci fali biegnącej dla układu równań (3.26)-(3.28). Tak więc, poszukiwaliśmy dokładnych (tj. zadanych jawnie) funkcji $c(x, y, z, t)$ oraz $\theta(x, y, z, t)$, $x, y, z \in \mathbb{R}$, $t \in \mathbb{R}$ spełniających warunek w postaci:

$$c(x, y, z, t) = c(x - vt, y, z), \quad \theta(x, y, z, t) = \theta(x - vt, y, z) \tag{3.29}$$

gdzie v jest tutaj prędkością przesuwania się frontu falowego. Zakładamy zatem, że front ten propaguje się wzdłuż ustalonego kierunku, który dla uproszczenia utożsamiamy z osią x-ów. Zakładamy też, że asymptotycznie w x (tzn. dla ustalonego t i $x \to \pm\infty$) wartości $c(x, t)$ dążą do jednego ze stabilnych stanów równowagi (pierwsze i trzecie miejsce zerowe na Ryc. 3.1). Ze względu na możliwość liniowego przeskalowania, bez straty ogólności, możemy założyć, że stany te odpowiadają wartościom $c = 0$ lub $c = 1$.

Rozwiązania takie opisują sytuację, w której obszar podwyższonego stężenia wapnia rozszerza się z pewną stałą prędkością. Jednocześnie, stan naprężeń mechanicznych ośrodka również zmienia się w czasie i przestrzeni, podążając za zmieniającym się stężeniem wapnia.

Dla bistabilnej funkcji źródłowej f w postaci wielomianu trzeciego stopnia $Ac(c-a)(1-c)$ dokładna postać dla czysto chemicznych fal biegnących stężenia wapnia (tzn. dla $\gamma = 0$) jest dobrze znana. Natomiast, dokładne rozwiązania w postaci fal biegnących $c(x-vt)$, $\theta(x-vt)$, przy uwzględnieniu oddziaływania mechano-chemicznego i niezerowych (choć dostatecznie małych współczynników lepkości ν_1 i ν_2), nie zostały dotychczas znalezione.

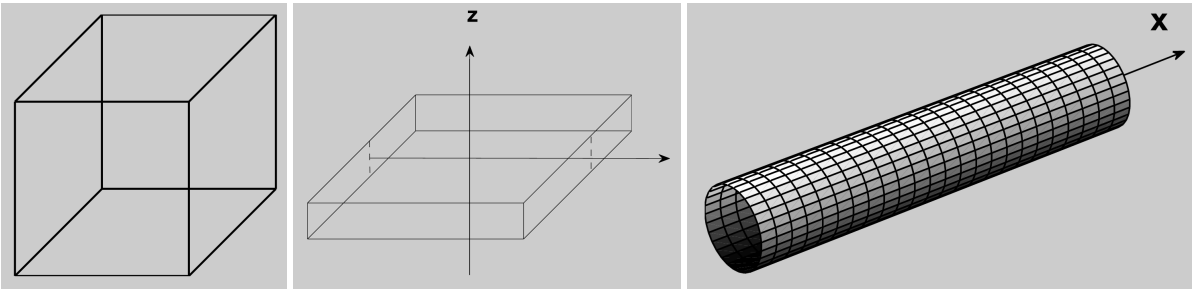
Uwaga

- Zakładając, że rozwiązanie ma postać fali biegnącej, dokonaliśmy matematycznej idealizacji problemu. Idealizacja taka jest usprawiedliwiona, jeśli rozpatrywane komórki możemy w istocie przybliżać poprzez bardzo długie i cienkie struktury cylindryczne z dobrze określoną ustaloną osią. Określenie 'bardzo długie' nakłada zarówno warunek na stosunek długości do liniowych wymiarów przekroju poprzecznego, jak i na stosunek szerokości frontu falowego do drogi jaką przebywa on w jednostkowym czasie.

- Przyjmując postać funkcji źródłowej w postaci $Ac(c-a)(1-c)$, założyliśmy, że stężenie wapnia c zostało liniowo przeskalowane tak, że poziom nieobudzony (stan spoczynkowy komórki) odpowiada wartości $c = 0$, a poziom pobudzony wartości $c = 1$ (aktywacja komórki). Powyższa bistabilna postać funkcji f opisuje autokatalityczny wypływ jonów wapniowych z magazynów retikularnych. Zakładamy zatem, że lokalne podwyższenie stężenia jonów wapniowych w cytozolu powoduje wypływ wapnia z retikulum, jeśli przekracza ono pewien poziom krytyczny i ustaje, gdy osiąga pewną dostatecznie dużą wartość [149] - Rozdz. 7.4.1, tom 2,[196] - Rozdz. 6, tom 2. □

W pracy [147] znalezione zostały jawne rozwiązania w postaci fal biegnących dla układu (3.26)-(3.27). Rozwiązania takie mogą dać nam pewien wgląd w makroskopowy charakter oddziaływań chemiczno-mechanicznych. Rozważania nasze przeprowadziliśmy w trzech przypadkach geometrycznych, pokazanych na Ryc. 3.2. Tak wiec, rozważyliśmy fale wapniowe w całej przestrzeni, cienkiej nieskończenie rozciągłej warstwie, która w swojej niezdeformowanej mechanicznie postaci jest płaszczyzną oraz nieskończenie długie struktury cylindryczne o dostatecznie małej średnicy modelujące długie komórki. Przypadki te zostały przeanalizowane również przy uwzględnieniu równań opisujących dynamikę białek buforujących w pracach [143] oraz [148].

Jak zauważyliśmy dynamika wapnia w komórce jest bardzo skomplikowanym zjawiskiem. Jony wapnia mogą być magazynowane nie tylko w ER, ale i innych organellach komórkowych (Tab. 1.4), w których związane są z wieloma ścieżkami sygnałowymi. W poszukiwaniu ścisłych postaci mechanochemicznych fal biegnących ograniczyliśmy



Rycina 3.2: Struktury geometryczne rozważane w pracy [147]. Od lewej do prawej: a. cała przestrzeń b. nieskończona płaska warstwa o dostatecznie małej grubości $2d$. c. nieskończony cylinder o dostatecznie małym promieniu

	$K(\lambda, G)$	$K(E, \nu)$	μ	τ
CAŁA PRZESTRZEŃ	$\lambda + 2G$	$\frac{E(1-\nu)}{(1+\nu)(1-2\nu)}$	$\nu_1 + \nu_2$	τ_{11}
CIENKA WARSTWA	$2\lambda + 2G$	$\frac{E}{(1+\nu)(1-2\nu)}$	$2\nu_1 + \nu_2$	$\tau_{11} + \tau_{33}$
WŁÓKNO	$3\lambda + 2G$	$\frac{E}{1-2\nu}$	$3\nu_1 + \nu_2$	$\tau_{11} + 2\tau_{33}$

Tablica 3.1: Współczynniki K, μ, τ w równaniu (3.30) dla rozpatrywanych geometrii

się jedynie do procesów uwalniania wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów retikularnych do cytozolu. Zakładamy przy tym, że możemy zaniedbać niejednorodność przestrzenną rozmieszczenia struktur retikularnych oraz możliwy wpływ więzów mechanicznych wpływających na położenie komórki w przestrzeni, czy też elementów cytoszkieletu, utrzymujących swoisty typ kształtu komórki.

Analiza równania mechanicznego

Poszukując rozwiązań w postaci fal biegnących (3.29), uprościliśmy układ równań różniczkowych cząstkowych (3.27)-(3.28) opisujący efekty mechaniczne do jednego równania różniczkowego zwyczajnego postaci [147, 143, 148]:

$$K\theta + \mu\theta_{,t} + \tau = 0. \qquad K, \mu, \tau = const. \tag{3.30}$$

Współczynniki K, μ oraz τ zależą od rozpatrywanego przypadku geometrycznego i są podane w Tab. 3.1. τ jest odpowiednią funkcją składowych tensora $\boldsymbol{\tau}$.

W trzeciej kolumnie tabeli znajdują się wyrażenia wyrażające stałą K poprzez częściej używane współczynniki mechaniczne, moduł Younga E oraz współczynnik Poissona ν. Zależności między E i ν oraz λ i G są następujące:

$$\lambda = \frac{E\nu}{(1+\nu)(1-2\nu)},\ G = \frac{E}{2(1+\nu)}$$

oraz

$$E = \frac{G(2G+3\lambda)}{\lambda+G},\ \nu = \frac{\lambda}{2(\lambda+G)}$$

Fale biegnące

Oprócz założenia (3.29), przyjmiemy również, że lokalne przemieszczenie punktów ośrodka wywołane przez zmiany stężenia wapnia ma również postać fali biegnącej w kierunku x

$$\boldsymbol{u}(x,y,z,t) = \boldsymbol{u}(x-vt,y,z). \tag{3.31}$$

Dla rozwiązań w postaci fal biegnących układ (3.26)-(3.30) przechodzi w układ zwyczajnych równań różniczkowych postaci:

$$Dc'' + vc' + f(c) + \gamma\theta = 0. \tag{3.32}$$

$$-v\mu\theta' + K\theta + \tau = 0. \tag{3.33}$$

$'$ oznacza tutaj pochodną względem zmiennej falowej $\xi = x - vt$. Poszukujemy zatem rozwiązań heteroklinicznych układu (3.32)-(3.33), tzn. funkcji c oraz θ klasy C^2 spełniających warunki brzegowe w $\pm\infty$: $\lim_{\xi\to-\infty} c(\xi) = c_1$, $\lim_{\xi\to\infty} c(\xi) = c_3$ oraz $\lim_{|\xi|\to\infty} \theta(\xi) = 0$, gdzie c_1 i $c_3 > c_1$ oznaczają stabilne stężenia jonów wapniowych w cytozolu. Rozważając układ (3.26)-(3.27), zakładamy również, że

$$\tau(c_1) = \tau(c_3) = 0, \quad oraz \quad \tau(c) \geq 0. \tag{3.34}$$

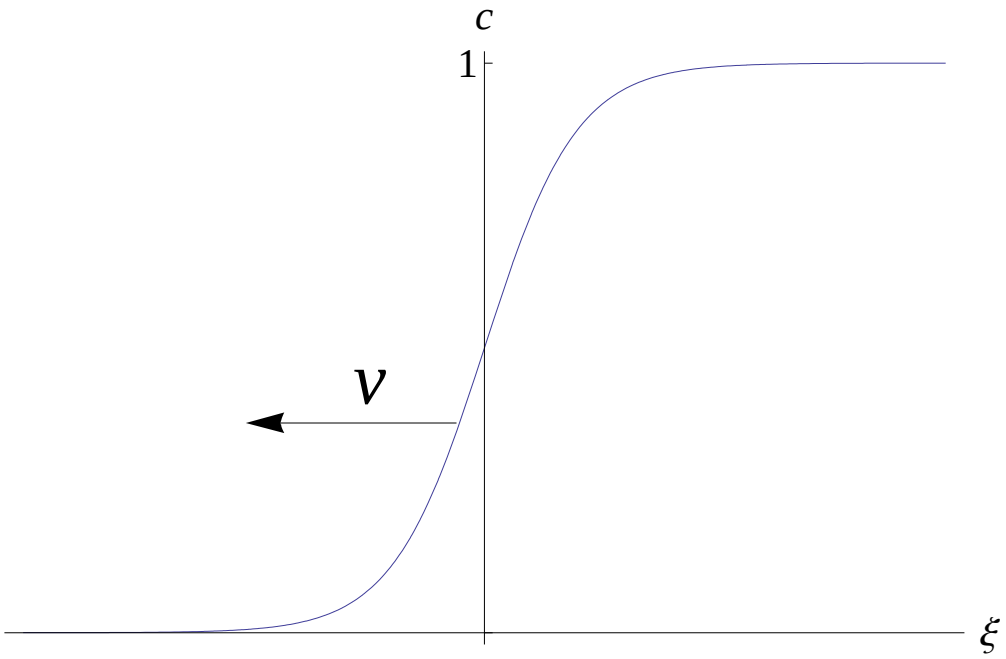
Jak sugerowaliśmy w punkcie drugim Uwag, poprzez zastosowanie liniowej transformacji zmiennej do c, możemy przyjąć bez straty ogólności, że

$$c_1 = 0, \quad c_3 = 1$$

Warunki brzegowe przyjmują wtedy postać

$$\lim_{\xi\to-\infty} c(\xi) = 0,\ \lim_{\xi\to\infty} c(\xi) = 1, \quad \lim_{|\xi|\to\infty} \theta(\xi) = 0$$

Dla ustalenia uwagi ograniczymy się również do rozpatrywania sytuacji, w których obszar zajmowany przez wyższe stężenie rozszerza się z czasem. Tak więc, rozpatrujemy fale, których profil ma postać pokazaną na Ryc. 3.3.
Z postaci (3.29) wynika, że pociąga to za sobą warunek $v < 0$. Jeśli przyjąć, że



Rycina 3.3: Przykładowy profil fali biegnącej stężenia wapnia c. Fala porusza się w lewo z prędkością v, przy czym profil zachowuje swój kształt w czasie. ξ jest tutaj zmienną falową: $\xi = x - vt$. $v < 0$, tak więc fala porusza się w lewo.

$$f(c) = Ac(c-a)(1-c)$$

to dla dostatecznie małych wartości funkcji opisujących sprzężenie mechano-chemiczne sytuacja taka będzie zagwarantowana warunkami:

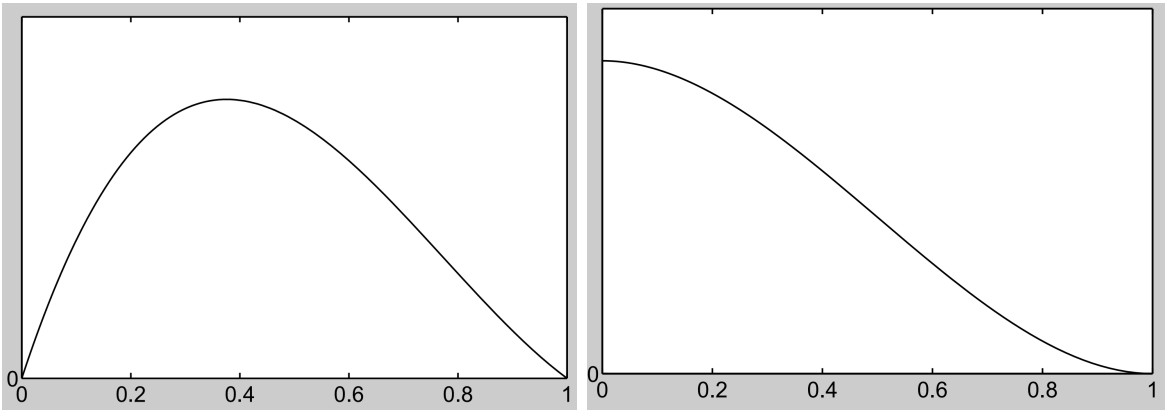
Założenie 1. $(1-2a) > 0$.

Rozważania dotyczące 'fizycznych' wartości A oraz efektywnych wartości współczynnika D można znaleźć np. w [148] oraz [149] - Rozdz. 7.4.1, tom 2.

Założenie 2. *Współczynniki γ, λ, G, ν_1, ν_2 są stałymi, podczas gdy $\tau = \tau(c)$.*

Założenie 3. *Wartości współczynników lepkości ν_1, ν_2, a więc i współczynnika μ są dostatecznie małe.*

Uwaga dotycząca postaci funkcji $\tau(c)$
Ponieważ nie jesteśmy w stanie znaleźć jawnych rozwiązań w przypadku ogólnym, postać $\tau = \tau(c)$ będzie dostosowana do postaci funkcji θ. W zasadzie zależy ona od rodzaju komórek. $\tau = \tau(c)$ powinno być jednak dodatnie dla wszystkich niezerowych wartości c. W naszym rozważaniach przyjęliśmy, że $\tau = \tau(c)$ zachowuje się w przybliżeniu jak $c(1-c)$, a zatem że znika dla niskiego stężenia równowagowego przeskalowanego do wartości $c = 0$ (lewy panel na Ryc. 3.4). Rozważyliśmy również przypadek pokazany



Rycina 3.4: Postaci funkcji $\tau(c)$ dla $c \in [0,1]$.

na prawym panelu Ryc. 3.4, w którym $\tau(0) > 0$. Takie postaci zgodne są z jakościową charakteryzacją funkcji trakcji np. w książce [196] - Rozdz. 6, tom 2.

Wiadomo, że dla $\theta = 0$, równanie (3.32) ma rozwiązanie heteroklinicze łączące jego stany stałe $c = 0$ i $c = 1$ dla dokładnie jednej wartości parametru v równej:

$$v = -(AD/2)^{1/2}(1-2a).$$

Rozwiązanie równania (3.32) ma postać:

$$c(\xi) = \frac{1}{1+\exp(-(\frac{A}{2D})^{1/2}\xi)}.$$

Udowodnimy, że funkcja o podobnej strukturze, jest również rozwiązaniem układu (3.32)-(3.33) uwzględniającego sprzężenie mechano-chemiczne. Załóżmy:

$$c = \frac{1}{1+\exp(-s\xi)}, \tag{3.35}$$

$s \geq 0$. Powyższa funkcja spełnia tożsamość:

$$c' = sc(1-c) \tag{3.36}$$

oraz $c(0) = 1/2$. Załóżmy również, że

$$\theta(\xi) = -qc(\xi)(1-c(\xi)) \tag{3.37}$$

dla pewnego $q \in IR^1$. Tak więc

$$\theta' = -sqc(1-c)(1-2c) \tag{3.38}$$

Wstawiając (3.37) do równania (3.32) określającego profil fali, otrzymujemy:

$$Dc'' + vc' + Ac(c-a)(1-c) - \gamma qc(1-c) = 0$$

i w konsekwencji

$$Dc'' + vc' + Ac(c - a + \gamma q A^{-1})(1 - c) = 0.$$

Powyższe równanie posiada rozwiązanie heteroklinicze

$$c(\xi) = \frac{1}{1 + \exp(-(\frac{A}{2D})^{1/2}\xi)} \tag{3.39}$$

spełniające warunek $c(0) = 1/2$ **wtedy i tylko wtedy**, gdy

$$v = -(AD/2)^{1/2}\left(1 - 2(a + \gamma q A^{-1})\right). \tag{3.40}$$

W szczególności, $s = \sqrt{\frac{A}{2D}}$. Zatem, zgodnie z (3.35), (3.39) oraz (3.40),

$$vs = -\frac{A}{2}\left(1 - 2(a + \gamma q A^{-1})\right). \tag{3.41}$$

Założenie 4. *Załóżmy,że dla τ i μ zdefiniowanych w Tabeli 1, $\tau = \tau(c)$ spełniona jest tożsamość*

$$qc(1 - c)\left[K + \frac{A}{2}\left(1 - 2(a + \gamma q A^{-1})\right)\mu(1 - 2c)\right] = \tau(c) \tag{3.42}$$

Zauważmy, że tożsamość (3.42) może być spełniona, z uwagi na fakt, że, zgodnie z Założeniem 4, wartość współczynnika μ jest mała.

Zgodnie z (3.41), lewa strona wyrażenia (3.42) może być zapisana w postaci $qc(1 - c)\left[K - vs\mu(1 - 2c)\right]$, tak więc Eq.(3.33) jest spełnione.

W rezultacie naszych rozważań udowodniliśmy, że dokonując Założenia 4 (zgodnego jakościowo z lewym panelem Ryc. 3.4 fala biegnąca $(c(\xi), \theta(\xi))$ o profilu c danym przez (3.39) oraz profilu θ danym przez (3.37), poruszająca się z prędkością (3.40) spełnia układ (3.32)-(3.33).

Lokalne przemieszczenia ośrodka

Dla uproszczenia ograniczymy się do ostatecznych wzorów na przemieszczenia $u_1(x, y, z, t)$ oraz $u_3(x, y, z, t)$ w przypadkach całej przestrzeni i nieskończonej cienkiej warstwy. Ich wyprowadzenie można znaleźć w pracy [148]. W przypadku nieskończonego cylindra zamiast wzorów analitycznych przedstawimy przemieszczenia u_1 i u_3 (Ryc. 3.5 oraz Ryc. 3.6).

Cała przestrzeń

$$u_1(x, y, z, t) = -qc(x, y, z, t)\sqrt{\frac{2D}{A}} \quad u_3 \equiv 0$$

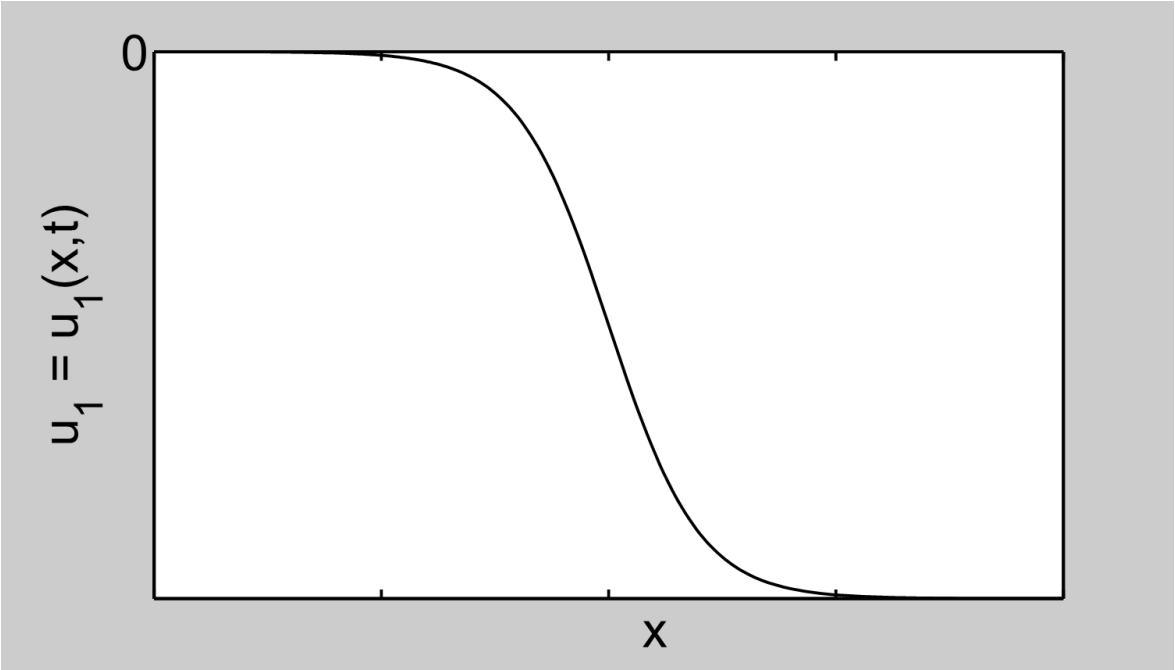
Nieskończona cienka warstwa

$$u_1(x,y,z,t) = -qc(\xi)\sqrt{\frac{D}{2A}}\left[1 - A\frac{\nu_2}{2G}(1-2(a+\gamma qA^{-1}))(1-c(\xi))\right]$$

$$u_3(x,y,z,t) = -qc(\xi)(1-c(\xi))\left[\frac{1}{2} + \frac{A}{2G}(1-2(a+\gamma q))\frac{\nu_2}{2}(1-2c(\xi))\right] z$$

Nieskończony cylinder

Jakościowe zachowanie się przemieszczeń u_1 i u_3 od współrzędnych ξ oraz z, dla ustalonej chwili czasu t, przedstawione jest na Ryc.(3.5) oraz Ryc.(3.6).

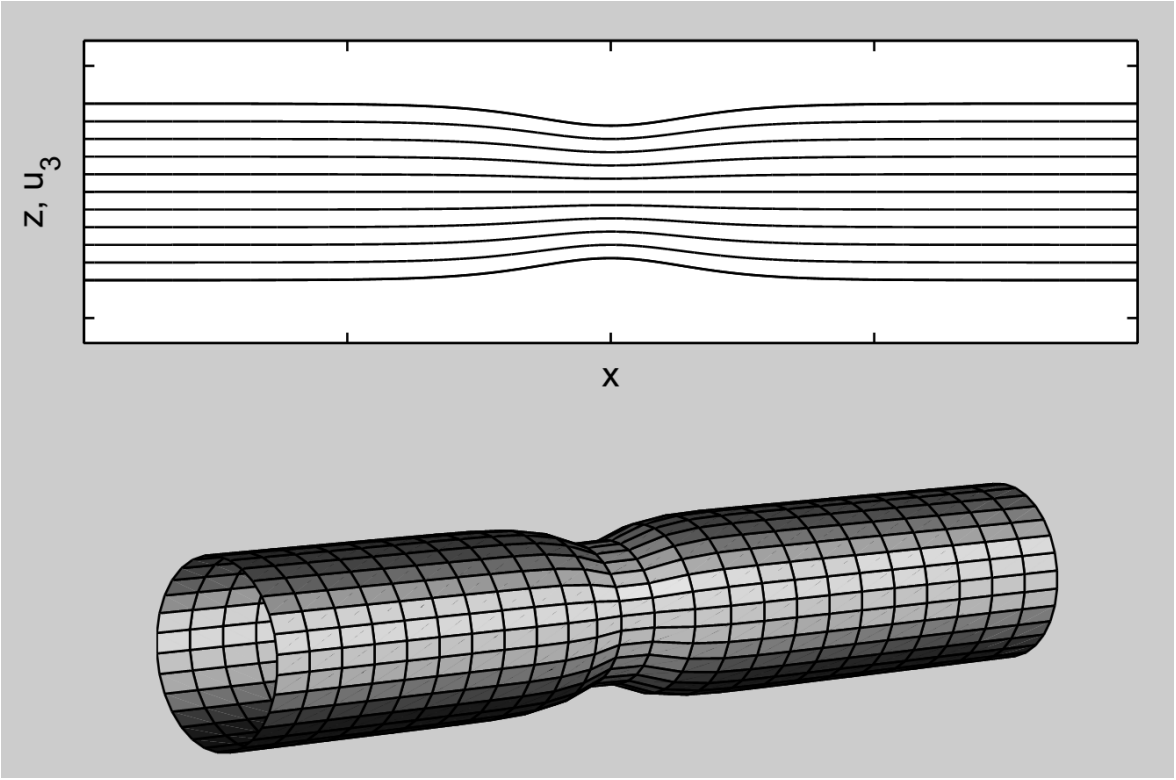


Rycina 3.5: Przemieszczenia w kierunku x. Wektory przemieszczenia $u_1(x,t)$ są skierowane w lewo. $u_1(x,t) \to 0$ jeśli $x \to -\infty$ oraz $u_1(x,t) \to u_{10} < 0$ jeśli $x \to \infty$.

Podaliśmy zatem szkic następującego twierdzenia:

Twierdzenie 1. *Niech spełnione będą założenia (1), (2), (3). Wtedy dla wszystkich $q > 0$, układ (3.32),(3.33) ma rozwiązanie heterokliniczne (v, c, θ), gdzie v określone jest równaniem (3.40), $c(\xi)$ równaniem (3.39) a $\theta(\xi)$ zależnością (3.37). Rozwiązanie jest jednoznacznie określone z dokładnością do translacji funkcji c w kierunku osi ξ.* □

Szczegóły dowodu można znaleźć w pracy [147].



Rycina 3.6: Przemieszczenia w kierunku z. Górny panel: cienka warstwa. Dolny panel: długi cylinder.

Mechanochemiczne fale biegnące z więzami mechanicznymi

W pracy [148] rozważono również istnienie i własności fal biegnących dla układu równań:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_c \nabla^2 c + f(c) + \gamma\theta, \tag{3.43}$$

$$\nabla \cdot \boldsymbol{\sigma} = k\boldsymbol{u}, \tag{3.44}$$

gdzie $k = const > 0$. Tak więc w podejściu tym uwzględniamy możliwość istnienia więzów mechanicznych przeciwdziałających ruchowi punktów ośrodka. Specyficzna forma takich więzów, dana prawą stroną równania (3.44), implikowana jest tzw. modelem Winklera. Dla ustalenia uwagi i prostoty rozważań skoncentrowaliśmy się na przypadku całej przestrzeni. Wykorzystując jawną postać rozwiązania w formie (3.35), poszukiwaliśmy rozwiązania rozpatrywanego układu poprzez odpowiedni dobór funkcji $\tau(c)$. Analiza składowych tensora ε_{ij} w tym przypadku doprowadza nas do następujących relacji:

$$\theta = \varepsilon_{11}, \quad \boldsymbol{u} = (u_1, 0, 0) =: (u, 0, 0)$$

skąd wynika, że

$$\theta = u_{,x} = u',$$

gdzie $'$ oznacza różniczkowanie względem zmiennej $\xi = x - vt$. W przeciwieństwie jednak do analizowanego powyżej przypadku, w którym $\nabla \cdot \boldsymbol{\sigma} = 0$, zakładamy, że $u(\xi) \to 0$ dla $\xi \to \pm\infty$ żądając, aby

$$u(\xi) = -\zeta c'(\xi),$$

gdzie $\zeta = const$. Wynika stąd, że $\theta(\xi) = u'(\xi) = -\zeta c''(\xi)$. Na podstawie (3.35) wynika, że

$$\theta = -s\zeta c(1-c)(1-2c). \tag{3.45}$$

Tak więc na podstawie równania (3.36) θ' jest wielomianem czwartego stopnia względem c znikającym dla $c = 0$ i $c = 1$. Równanie (3.44) może być zatem zapisane w postaci

$$v\mu\theta' + Ks\zeta c(1-c)(1-2c) - k\zeta c + \eta = \tau(c). \tag{3.46}$$

gdzie η jest stałą całkowania.

Rozdział 4

Modele

W rozdziale tym przedstawione zostały całokomórkowe modele uwzględniające obecność mitochondrialnych magazynów wapniowych ze szczególnym uwzględnieniem obszarów ich bliskiego sąsiedztwa z retikulum endoplazmatycznym (Mitochondria Associated Membrane Complexes - Rozdz. 1.7). Modele te stanowią rozwinięcie prac [183, 245] wprowadzając dodatkowe przepływy retikulkarno-mitochondrialne oraz zmodyfikowane przepływy cytozoliczno-mitochondrialne.

4.1 Opis modeli całokomórkowych

W niniejszym rozdziale przedstawione zostaną dwa modele ewolucji uśrednionego stężenia jonów wapnia w trój-kompartmentowym opisie komórki eukariotycznej (**cytozol**, **siateczka śródplazmatyczna** i **mitochondria**). Jak już wspominaliśmy, celem obydwu modeli jest uwzględnienie połączeń między siateczką śródplazmatyczną a mitochondriami, których istnienie pozwala na prawie bezpośredni przepływ jonów wapnia pomiędzy tymi organellami [77, 267]. W drugim modelu [267] zostały wzięte dodatkowo pod uwagę dwa tryby pracy białka transportującego wapń do wnętrza mitochondriów: tryb RaMowy (RaM - Rapid Uptake Mode) oraz tryb normalny (Rozdz. 1.6.4).

Ze względu na wspomnianą powyżej bezpośrednią bliskość retikulum endoplazmatycznego i mitochondriów, kompleksy MAM spełniają niezwykle ważną rolę w homeostazie i dynamice wapnia w komórce (Rozdz. 1.7.1). Ułatwiony przepływ wapnia pomiędzy powyższymi kompartmentami komórkowymi może wpływać istotnie np. na stany równowagowe wapnia oraz na oscylacje stężeń wolnych jonów wapnia w poszczególnych częściach komórki. Oscylacje takie są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórki. Mogą być m.in. odpowiedzialne za szereg istotnych procesów fizjologicznych, takich jak kontrola cyklu komórkowego, skurcz mięśni szkieletowych, wzmocnienie synaptyczne. Stabilne oscylacje wapniowe stanowią również istotny czynnik będący częścią sieci sygnałowej, sprawdzający, czy komórka jest w dobrej kondycji i utrzymujący ją przy życiu. Cykliczne wahanie poziomu wapnia w mitochondriach (w modelach matematycznych odpowiada im stabilny cykl graniczny) powoduje aktywację dehydrogenaz poprzez allosteryczne związanie jonów Ca^{2+} i wzrost produkcji ATP. Zatem z jednej strony lokalne w czasie i przestrzeni zmiany stężenia wolnego

wapnia cytozolicznego są jednym ze sposobów przenoszenia informacji w komórce i inicjacji szeregu ścieżek sygnałowych będących odpowiedzią na zmieniające się warunki zewnętrzne, z drugiej zaś zbyt wysoka koncentracja wolnych jonów wapnia w cytozolu jest bardzo szkodliwa i może doprowadzić do śmierci komórki. (Wiadomo np., że wapń jest jednym z kilku czynników zapoczątkowujących apoptozę – kontrolowaną śmierć komórki [101]). Zasadniczo badanie wpływu kompleksów MAM na dynamikę wapnia w komórce należałoby przeprowadzić na gruncie modelu przestrzennego opisywanego układem równań różniczkowych cząstkowych przy uwzględnieniu informacji dotyczących rozmieszczenia i rozmiarów zbiorników retikularnych i mitochondrialnych w komórce. Zadanie takie jest jednak bardzo skomplikowane, zarówno z teoretycznego, jak i numerycznego punktu widzenia. Co więcej, dla tego typu układów, ze skomplikowana geometrią, olbrzymia ilością podobszarów i nieliniowymi przepływami miedzy nimi, niezwykle trudno znaleźć (numerycznie) rozwiązanie opisujące oscylacje w czasie (i przestrzeni).

W naszych rozważaniach zdecydowaliśmy się zatem na pozostanie w ramach tzw. modeli całokomórkowych („whole cell models" [149]), które abstrahują od przestrzennego rozkładu retikulum i mitochondriów wewnątrz komórki i analizują jedynie zależność od czasu stężeń wolnego wapnia uśrednionych przestrzennie po odpowiedniej składowej kompartmentalnej (cytozolicznej, retikularnej i mitochondrialnej) przy założeniu dostatecznie szybkiej dyfuzji wapnia. W tym podejściu opis zmienności czasowej wapnia opisuje się układem nieliniowych równań różniczkowych zwyczajnych. Ponieważ dokonujemy przestrzennego uśrednienia stężenia (a nawet zakładamy przestrzenną jednorodność stężeń), istnienie kompleksów MAM uwzględniamy poprzez wprowadzenie dodatkowego bezpośredniego przepływu wapnia pomiędzy retikulum a mitochondriami. (W modelach całokomórkowych nie biorących pod uwagę istnienia obszarów MAM, przepływ pomiędzy tymi kompartmentami odbywa się pośrednio przez cytozol.) Kompleksy MAM stanowią jedynie około 6-7 procent powierzchni zewnętrznej błony mitochondrialnej. Mimo tego, ich obecność może istotnie wpływać na szybkość wymiany wolnych jonów wapnia pomiędzy powyższymi organellami, gdyż przeważająca część receptorów IP_3 oraz kanałów VDAC, odpowiedzialnych za przepływ wapnia z retikulum endoplazmatycznego do mitochondrium znajduje się w ich rejonie [115].

Podsumowując, zgodnie z konwencją modeli całokomórkowych rozważamy sytuację, w której rozmieszczenie jonów Ca^{2+} jest przestrzennie jednorodne w każdym z rozpatrywanych przedziałów, może natomiast zmieniać się w czasie. Jony wapnia mogą przepływać pomiędzy trzema kompartmentami: siateczką śródplazmatyczną, mitochondriami i cytozolem. Wiązane są również przez białka buforujące obecne w każdym z wymienionych kompartmentów. Istnienie mikrodomen uwzględniamy poprzez wprowadzenie dodatkowego przepływu jonów wapnia pomiędzy ER i mitochondriami (Ryc. 4.1).

Przedstawione modele zadane są układami równań różniczkowych zwyczajnych, opisujących zmiany stężenia wolnego i zbuforowanego wapnia w poszczególnych kompartmentach komórki. Modele te są modelami zamkniętymi - zakładamy, że wymiana wapnia cytozolicznego z macierzą pozakomórkową odbywa się na tyle wolno, że można ją zaniedbać w rozpatrywanej przez nas skali czasu. Założenie to jest uzasadnione, ponieważ w normalnych warunkach wymiana jonów wapnia między komórką a przestrzenią międzykomórkową jest o wiele wolniejsza, niż procesy przepływu wapnia pomiędzy kompartmentami wewnątrzkomórkowymi [258]. Dodatkowo, zgodnie z [258], możliwe są „prawidłowe" oscylacje wapniowe nawet w przypadku całkowitego zablokowania transportu wapnia przez błonę komórkową.

Jak zwykle, w przypadku stosowania modeli całokomórkowych, pojawia się pytanie o zasadność pominięcia efektów przestrzennych. Dla stosunkowo małych komórek (o średnicy nieprzekraczającej 6 μm) dyfuzyjne wyrównywanie stężeń zachodzi na tyle szybko, iż można się spodziewać, że niejednorodności przestrzenne stężenia wapnia nie wpływają zarówno na istnienie, jak i na okres oscylacji. Szybkość dyfuzyjnego wyrównywania się stężenia wapnia można oszacować w przybliżeniu korzystając z klasycznego wzoru na zależność średniego kwadratu odległości, jaką cząstka Brownowska pokonuje w czasie Δt:

$$R^2 = D_{eff} \cdot \Delta t, \tag{4.1}$$

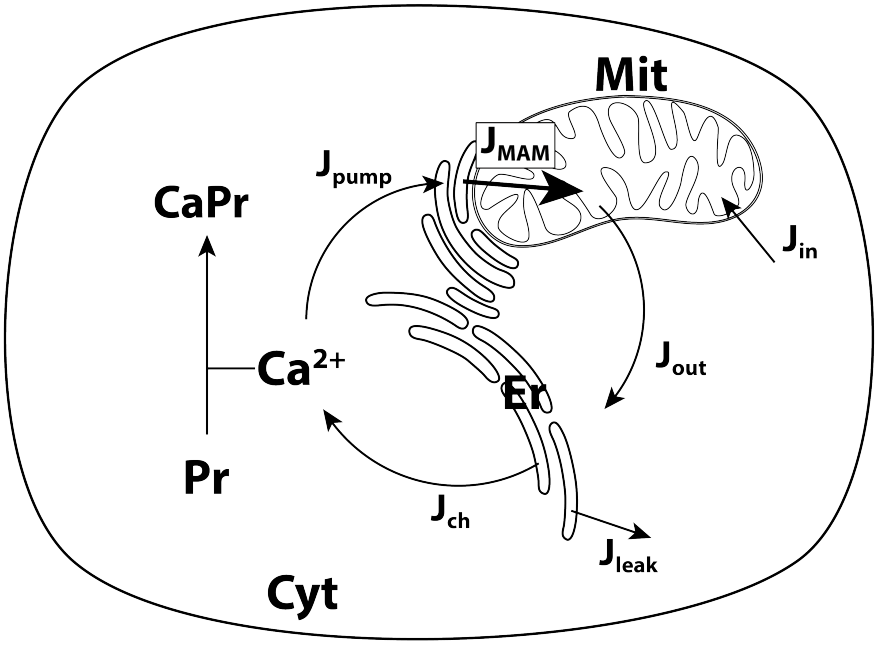
gdzie D_{eff} oznacza efektywny współczynnik dyfuzji dla wapnia w obecności buforów (tj. biorący pod uwagę procesy odłączania i przyłączania jonów wapnia do molekuł buforujących). Współczynnik ten trudno oszacować analitycznie, głównie ze względu na dużą różnorodność molekuł buforujących o nieznanych parametrach k_-, k_+ oraz współczynnikach dyfuzji. Jeśli jednak ograniczyć się do jednego reprezentatywnego rodzaju buforów oraz założyć, że k_-, k_+ są relatywnie duże, to można podać przybliżony wzór na D_{eff}. Wielkość D_{eff} nie jest stałą, zależy od stężeń wolnego wapnia, jak i stężenia wapnia zbuforowanego (por. równania (7.76) oraz (7.77) w książce [149]). Dla charakterystycznych buforów endogennych można oszacować $D_{eff} \cong 20 - 30\,\mu m^2/s$, co jest wielkością o rząd mniejszą niż współczynnik dyfuzji wapnia w cytozolu wynoszący około $300\mu m^2/s$. Przyjmując zatem $D_{eff} = 20\mu m^2/s$ wnioskujemy, że jony wapniowe przesuną się średnio na odległość równą $6\mu m$ po czasie $\Delta t \cong 1.68\,s$, co stanowi około 1/10 okresu znalezionych oscylacji. Dla stosunkowo małych komórek założenie jednorodności przestrzennej stężeń jonów wapnia w cytozolu (i innych kompartmentach) jest zatem dość dobrze usprawiedliwione. Dla większych komórek założenie to może być poddane w wątpliwość, jest jednak bardzo często stosowane. Należy bowiem wziąć pod uwagę fakt, że oscylacje wapniowe mogą mieć charakter quasi-lokalny, tzn. mogą odbywać się prawie niezależnie w pewnych dostatecznie małych podobszarach komórki.

Innym problemem pojawiającym się przy próbach stosowania modeli opartych na deterministycznych równaniach różniczkowych zwyczajnych jest stochastyczna natura aktywności pojedynczych kanałów wapniowych, która przybiera formę nieregularnych w czasie wydarzeń polegających na ich otwieraniu i zamykaniu. (Otwarcie kanału połączone z wypływem wapnia na zewnątrz zbiornika w języku angielskim nosi nazwę „blip".) Takie pojedyncze otwarcie może generować stochastyczne pobudzenie całego pojedynczego klastra kanałów [254]. (Wypływ wapnia z klastra kanałów w języku angielskim określany jest mianem „puff".) Opis deterministyczny nieprzestrzenny może być jednak usprawiedliwiony z uwagi na fakt, że wypływy wapnia z poszczególnych klastrów mogą zachodzić w sposób zsynchronizowany, jeśli są wynikiem dostatecznie silnej stymulacji zewnętrznej. Taka sytuacja ma miejsce nawet w dużych komórkach, takich jak hepatocyty [75].

4.1.1 Model #1

Punktem wyjścia do budowy pierwszego modelu (zwanego dalej **Modelem #1**) był model zaproponowany przez Marhla i współpracowników z roku 2000 [183] oraz [245]. Jest to jeden z nielicznych modeli, który uwzględnia aktywny wpływ mitochondriów na dynamikę sygnału wapniowego w komórce i nie traktuje ich jedynie jak olbrzymich cząsteczek buforujących. W Modelu #1, wymiana wapnia pomiędzy ER a mitochondrium odbywa się poprzez cytozol oraz bezpośrednio z magazynów retikularnych do mitochondriów w miejscach ich bliskiego kontaktu, tzn. wewnątrz obszarów MAM. Prędkość przepływu jonów wapnia w tych obszarach oznaczana symbolem J_{MAM} (Ryc. 4.1), zależy od stężenia jonów wapnia w miejscach uwalniania ich ze światła retikulum endoplazmatycznego. Stężenie to jest porównywalne ze stężeniem tych jonów wewnątrz retikulum ($[Ca^{2+}]_{ER}$) i średnio rzecz biorąc wyższe niż stężenie jonów wapnia w cytozolu ($[Ca^{2+}]_{Cyt}$) [77].

Jak wspomniano w Rozdz. 1.7 koncepcja istnienia wyizolowanych przestrzeni wewnątrz cytozolu, w których stężenie jonów wapniowych przewyższa znacznie stężenie jonów wapniowych w innych obszarach cytozolu, pojawiła się już w latach 80. XX-go wieku [234] i była naturalnym wnioskiem z prac eksperymentalnych [12, 25, 219, 223]. Nie została ona jednak uwzględniona *explicite* w żadnym z dotychczasowych całokomórkowych modeli opisujących ewolucję wapnia w komórce eukariotycznej. Uwzględnienie tego typu obszarów jest właśnie przedmiotem modyfikacji modelu Marhla, których efektem są zaproponoponowane przez nas modele: Model #1 oraz Model #2. Wprowadzenie bezpośredniego przepływu jonów wapnia J_{MAM} nie wynika *jedynie* z faktu niemożności odzwierciedlenia bliskości struktur retikularnych i mitochondrialnych w modelu nieprzestrzennym, ale ma również *istotne usprawiedliwienie biologiczne* wynikające z istnienia mikrodomen typu MAM. Ten specyficzny interfejs, który tworzy się pomiędzy



Rycina 4.1: Schematyczna reprezentacja przepływów rozpatrzonych w modelach: **ER** – siateczka śródplazmatyczna, **Mit** – mitochondrium, **Cyt** – cytozol; **CaPr** – wapń zbuforowany; $\boldsymbol{J}_{pump}$ – przepływ wapnia przez pompę w błonie retikulum; $\boldsymbol{J}_{MAM}$ – bezpośredni przepływ z retikulum do mitochondrium; $\boldsymbol{J}_{in}$ – pobieranie wapnia prze mitochondrium poprzez VDAC-MCU; $\boldsymbol{J}_{out}$ – wypływ jonów wapnia z mitochondrium przez wymiennik NCX; $\boldsymbol{J}_{ch}$ - wypływ jonów wapnia z ER; $\boldsymbol{J}_{leak}$ – niespecyficzny wypływ z ER przez błony białkowo-lipidowe.

retikulum i mitochondriami jest w znacznej mierze przestrzenią odizolowaną od pozostałej części cytozolu. Specyficzne białka stabilizujące apozycje błon mitochondrium-ER (np. mitofuzyna-2, lub grp75) ograniczają przestrzeń pomiędzy błonami formując swoisty „tunel" dla jonów wapnia. We wcześniejszych pracach autorzy sugerowali wprawdzie istnienie mikrodomen, ale jedynie poprzez zmniejszanie stałej półaktywacji dla uniportera mitochondrialnego [183, 184]. Zaproponowane przez nas modele pozwalają również na rozróżnienie dwóch populacji białek transportujących wapń do mitochondrium. Jedna - związana z „obszarem MAM" eksponowana jest na stężenie Ca^{2+} obecne w retikulum endoplazmatycznym, druga na stężenie jonów wapnia w cytozolu.

Układ równań różniczkowych zwyczajnych opisujący Model #1

Stężenie wolnych jonów wapnia w cytozolu (Ca_{Cyt}), retikulum endoplazmatycznym (Ca_{ER}) i mitochondriach (Ca_{Mit}), stężenie „uwapniowanych" miejsc wiązania $CaPr$ w cytozolu oraz stężenie miejsc wiązania cytozolicznych białek buforujących (Pr) w czasie opisują równania:

$$\frac{dCa_{Cyt}}{dt} = J_{ch} + J_{leak} - J_{pump} + J_{out} - J_{in} + k_{-}CaPr - k_{+}Ca_{Cyt}Pr, \tag{4.2}$$

$$\frac{dCa_{ER}}{dt} = \frac{\beta_{ER}}{\rho_{ER}}\left(J_{pump} - J_{ch} - J_{leak} - J_{MAM}\right), \tag{4.3}$$

$$\frac{dCa_{Mit}}{dt} = \frac{\beta_{Mit}}{\rho_{Mit}}\left(J_{in} + J_{MAM} - J_{out}\right), \tag{4.4}$$

$$\frac{dCaPr}{dt} = k_{+}Ca_{Cyt}Pr - k_{-}CaPr, \tag{4.5}$$

$$\frac{dPr}{dt} = -k_{+}Ca_{Cyt}Pr + k_{-}CaPr. \tag{4.6}$$

W powyższych równaniach ρ_i oznacza objętościowy współczynnik skalujący dla i-tego kompartmentu, $i \in \{ER, Mit\}$. Tak więc

$$\rho_i = \frac{V_i}{V_{Cyt}} \tag{4.7}$$

gdzie V_i oznacza objętość i-tego kompartmentu. β_i oznacza stosunek stężeń wolnych jonów wapnia do stężenia całkowitego wapnia w i-tym kompartmencie, $i \in \{ER, Mit\}$. Tak więc

$$\beta_i = \frac{Ca_i}{Ca_i + Ca_iPr} \tag{4.8}$$

gdzie Ca_iPr - stężenie uwapniowanych miejsc wiązania buforów w i-tym kompartmencie (por. Rozdz. 2.4).

Dodając równania (4.2)-(4.6) otrzymujemy zależność:

$$Ca_{Cyt}(t) + \frac{\rho_{ER}}{\beta_{ER}}Ca_{ER}(t) + \frac{\rho_{Mit}}{\beta_{Mit}}Ca_{Mit}(t) + CaPr(t) = const := Ca_{tot} \tag{4.9}$$

Równanie to wyraża prawo zachowania całkowitej ilości wapnia w układzie. Możemy się o tym przekonać mnożąc je przez objętość cytozolu V_{Cyt}. Otrzymujemy bowiem wtedy równanie:

$$\begin{aligned} &V_{Cyt}Ca_{Cyt}(t) + V_{Cyt}CaPr(t) + \\ &V_{ER}\tfrac{1}{\beta_{ER}}Ca_{ER}(t) + V_{Mit}\tfrac{1}{\beta_{Mit}}Ca_{Mit}(t) = V_{Cyt}Ca_{tot} = const, \end{aligned} \tag{4.10}$$

w którym lewa strona w sposób oczywisty przedstawia sumę całkowitej ilości jonów wapniowych w poszczególnych kompartmentach.

Dodając równania (4.5) i (4.6) otrzymujemy $\frac{d}{dt}(CaPr + Pr) = 0$, co pozostaje w zgodzie z faktem, że całkowite stężenie miejsc wiązania jonów wapnia przez bufory (tj. miejsc ze związanymi jonami wapnia oraz miejsc niezwiązanych) Pr_{tot} jest stałe w czasie:

$$Pr_{tot}(t) := Pr(t) + CaPr(t) = Pr(0) + CaPr(0) =: Pr_{tot}. \tag{4.11}$$

Tak więc, dzięki prawom zachowania (4.9) i (4.11) układ równań (4.2)–(4.6) może zostać zredukowany do układu trzech równań różniczkowych zwyczajnych:

$$\begin{aligned}
\frac{dCa_{Cyt}}{dt} &= J_{ch} + J_{leak} - J_{pump} + J_{out} - J_{in} \\
&\quad + k_{-}CaPr - k_{+}Ca_{Cyt}(Pr_{tot} - CaPr), && (4.12)\\
\frac{dCa_{ER}}{dt} &= \frac{\beta_{ER}}{\rho_{ER}}\left(J_{pump} - J_{ch} - J_{leak} - J_{MAM}\right), && (4.13)\\
\frac{dCa_{Mit}}{dt} &= \frac{\beta_{Mit}}{\rho_{Mit}}\left(J_{in} + J_{MAM} - J_{out}\right). && (4.14)
\end{aligned}$$

gdzie ilość wapnia związanego przez bufory możemy wyliczyć ze wzoru (4.9):

$$CaPr = Ca_{tot} - Ca_{Cyt} - \frac{\rho_{ER}}{\beta_{ER}}Ca_{ER} - \frac{\rho_{Mit}}{\beta_{Mit}}Ca_{Mit}. \tag{4.15}$$

Poszczególne przepływy realizowane przez pompy, kanały wapniowe i wymienniki opisane są poprzez prądy wapniowe $J_{()}$. Aktywny transport jonów Ca^{2+} do światła retikulum endoplazmatycznego J_{pump} realizowany jest przez białka SERCA, natomiast wypływ jonów wapnia z ER realizowany jest przez kanały wapniowe IP_3R/RyR (przepływ J_{ch}) oraz niespecyficzny wypływ J_{leak}. Przepływy te opisywane są wyrażeniami:

$$J_{pump} = k_{pump}Ca_{Cyt}, \tag{4.16}$$

$$J_{ch} = k_{ch}\frac{Ca_{Cyt}^2}{K_1^2 + Ca_{Cyt}^2}\left(Ca_{ER} - Ca_{Cyt}\right), \tag{4.17}$$

$$J_{leak} = k_{leak}\left(Ca_{ER} - Ca_{Cyt}\right). \tag{4.18}$$

J_{pump} zależy bezpośrednio od stężenia Ca^{2+} w cytozolu. Stała k_{pump} określa tempo przepływu. Wypływ jonów wapnia z ER zależy od gradientu jonów wapnia pomiędzy cytozolem, a światłem ER $(Ca_{ER} - Ca_{Cyt})$. Stała k_{ch} określa maksymalną przepuszczalność kanału wapniowego, natomiast K_1 jest stałą półaktywacji. Funkcja Hilla w wyrażeniu J_{ch} (4.17) opisje mechanizm CICR. Niespecyficzny wypływ jonów wapnia (J_{leak}) zależy od różnicy stężeń jonów wapnia w poprzek błony retikulum, k_{leak} określa tempo wypływu jonów wapnia z ER.

Dynamika wapnia w mitochondrium zadana jest następującymi przepływami:

$$J_{MAM} = k_{MAM}\frac{Ca_{ER}^8}{K_4^8 + Ca_{ER}^8}, \tag{4.19}$$

$$J_{in} = k_{in2}\frac{Ca_{Cyt}^8}{K_2^8 + Ca_{Cyt}^8}, \tag{4.20}$$

$$J_{out} = \left(k_{out}\frac{Ca_{Cyt}^2}{K_3^2 + Ca_{Cyt}^2} + k_m\right)Ca_{Mit}. \tag{4.21}$$

J_{MAM} opisuje bezpośredni przepływ jonów wapnia z ER do mitochondriów, implikowany faktem istnienia mikrodomen MAM. Stała k_{MAM} określa maksymalną przepustowość interfejsu MAM, a K_4 stałą półaktywacji. Z drugiej strony, J_{in} opisuje napływ jonów wapnia do mitochondrium przez białka transportowe położone poza obszarami MAM. Powolny wypływ jonów wapnia z mitochondrium odbywa się poprzez wymienniki Na^+/Ca^{2+} (NCX) i H^+/Ca^{2+} (HCX). Ze względu na to, że przepływ ten ma jedynie nieznaczny wpływ na potencjał transbłonowy mitochondrium $\Delta\Psi_m$ ([14], Rozdz. 3.4 w [84]), zmiany $\Delta\Psi_m$ w powyższym modelu zostały pominięte. Całkowity przepływ jonów wapnia z mitochondrium do cytozolu określa zatem wyrażenie J_{out}, w którym k_m jest stałą określającą wypływ niespecyficzny, a k_{out} oznacza maksymalny przepływ jonów wapnia przez wymienniki NCX/HCX. K_3 jest stałą półaktywacji.

4.1.2 Model #2

Układ równań różniczkowych zwyczajnych opisujący zmiany stężenia wolnych jonów wapnia w Modelu #2, jest tożsamy z układem (4.2)-(4.6). Różnice dotyczą jedynie konkretnych postaci funkcji J_{MAM} (wyrażenia (4.19) i (4.33)), J_{in} (wyrażenia (4.20) i (4.34)) oraz J_{out} (wyrażenia (4.21) i (4.35)). Rozpatrywany układ ma zatem postać:

$$\frac{dCa_{Cyt}}{dt} = J_{ch} + J_{leak} - J_{pump} + J_{out} - J_{in} + k_{-}CaPr - k_{+}Ca_{Cyt}Pr, \tag{4.22}$$

$$\frac{dCa_{ER}}{dt} = \frac{\beta_{ER}}{\rho_{ER}}\left(J_{pump} - J_{ch} - J_{leak} - J_{MAM}\right), \tag{4.23}$$

$$\frac{dCa_{Mit}}{dt} = \frac{\beta_{Mit}}{\rho_{Mit}}\left(J_{in} + J_{MAM} - J_{out}\right), \tag{4.24}$$

$$\frac{dCaPr}{dt} = k_{+}Ca_{Cyt}Pr - k_{-}CaPr, \tag{4.25}$$

$$\frac{dPr}{dt} = -k_{+}Ca_{Cyt}Pr + k_{-}CaPr. \tag{4.26}$$

Jak w przypadku Modelu #1 słuszne są prawa zachowania (4.9) oraz (4.11). W konsekwencji układ (4.22)-(4.26) można zredukować do trzech równań postaci (4.12)-(4.14):

$$\frac{dCa_{Cyt}}{dt} = J_{ch} + J_{leak} - J_{pump} + J_{out} - J_{in} + k_{-}CaPr - k_{+}Ca_{Cyt}Pr, \tag{4.27}$$

$$\frac{dCa_{ER}}{dt} = \frac{\beta_{ER}}{\rho_{ER}}\left(J_{pump} - J_{ch} - J_{leak} - J_{MAM}\right), \tag{4.28}$$

$$\frac{dCa_{Mit}}{dt} = \frac{\beta_{Mit}}{\rho_{Mit}}\left(J_{in} + J_{MAM} - J_{out}\right). \tag{4.29}$$

Przepływy retikularno-cytozoliczne: J_{pump} (aktywność pompy retikularnej), J_{ch} (wypływ poprzez kanały wapniowe IP_3R/RyR) oraz J_{leak} (niespecyficzny przepływ Ca^{2+} przez błony biologiczne) dane są jak w przypadku Modelu #1 następującymi wyrażeniami:

$$J_{pump} = k_{pump} Ca_{Cyt}, \tag{4.30}$$

$$J_{ch} = k_{ch} \frac{Ca_{Cyt}^2}{K_1^2 + Ca_{Cyt}^2} \left(Ca_{ER} - Ca_{Cyt}\right), \tag{4.31}$$

$$J_{leak} = k_{leak} \left(Ca_{ER} - Ca_{Cyt}\right). \tag{4.32}$$

Różnice pomiędzy Modelem #2 i Modelem #1

W Modelu #2 uwzględniono nie tylko aktywny udział mitochondriów, ale również właściwości białka transportującego wapń do wnętrza mitochondrium – uniportera mitochondrialnego (MICU). Uniporter w warunkach ekspozycji na nanomolowe (do 200 nM) stężenia wapnia aktywuje tzw. szybki mechanizm pobierania jonów wapniowych RaM (ang. rapid uptake mode). Doświadczenia przeprowadzone przez Vinogradova [285] oraz Guntera i współpracowników [116, 260] sugerują, że w tych warunkach mitochondria pobierają wapń znacznie wydajniej. Przepływ do mitochondrium składa się zatem z dwóch części. Pierwsza z nich uwzględnia wspomniany powyżej szybki tryb RaM-owy, druga opisuje pracę uniportera mitochondrialnego w trybie standardowym. Rozróżnienie takie odzwierciedla się w wyrażeniach na prądy J_{MAM} oraz J_{in} opisujące odpowiednio wpływ jonów wapnia do mitochondriów w obszarze interfejsu MAM oraz na pozostałej wewnętrznej powierzchni mitochondriów. Tak więc w Modelu #2 wyrażenia na J_{MAM} i J_{in} mają postać:

$$J_{MAM} = J_{MAM2} + J_{MAM8} := k_{MAM2} \frac{Ca_{ER}^2}{K_{4,2}^2 + Ca_{ER}^2} + k_{MAM8} \frac{Ca_{ER}^8}{K_{4,8}^8 + Ca_{ER}^8}, \tag{4.33}$$

$$J_{in} = J_{in2} + J_{in8} := k_{in2} \frac{Ca_{Cyt}^2}{K_{2,2}^2 + Ca_{Cyt}^2} + k_{in8} \frac{Ca_{Cyt}^8}{K_{2,8}^8 + Ca_{Cyt}^8}. \tag{4.34}$$

W przeciwieństwie do Modelu #1, w Modelu #2 nie uwzględniono wpływu stężenia jonów wapnia w cytozolu na jego wypływ z mitochondriów poprzez czynnik

$$k_{out} \frac{Ca_{Cyt}^2}{K_3^2 + Ca_{Cyt}^2} \cdot Ca_{Mit}$$

Z drugiej strony zamiast liniowej proporcjonalności wypływu do Ca_{Mit} przepływ ten modelowany jest za pomocą funkcji Hilla pierwszego rzędu. Zatem:

$$J_{out} = k_{out} \frac{Ca_{Mit}}{K_3 + Ca_{Mit}} \tag{4.35}$$

gdzie pominęliśmy dodatkowo niespecyficzny wypływ wapnia z mitochondrium $k_m \cdot Ca_{Mit}$.

Zmiana wyrażenia na J_{out} w stosunku do Modelu #1 implikuje znaczące różnice w jakościowym zachowaniu się układu. Najważniejszym przejawem różnic jest niewystępowanie rozwiązań chaotycznych, występujących dla odpowiedniego zestawu parametrów w Modelu #1.

4.2 Parametry i skalowanie

W przypadku obu modeli przyjęliśmy wartość parametru $\mathrm{Ca}_{tot} = 90\ \mu\mathrm{M}$. Jak widać z postaci równań na ewolucję stężeń jonów wapnia w kompartmentach retikularnym i mitochondrialnym, zależą one jedynie od stosunków $\frac{\beta_{ER}}{\rho_{ER}}$ oraz $\frac{\beta_{Mit}}{\rho_{Mit}}$ a nie od konkretnych wartości współczynników β i ρ. Z tego też powodu w pracach [77] oraz [267] wartości tych współczynników mają przypisane wartości zgodne z pracą [183], ponieważ istotny jest jedynie stosunek obu wartości. Współczynniki β_{ER} oraz β_{Mit} są określone jedynie w przybliżeniu, chociaż uważa się, że ich fizjologiczne wartości powinny być mniejsze niż ok. 0.05. Z drugiej strony wartości współczynników ρ są stosunkowo dobrze określone, chociaż zależą od rodzaju komórek. Dla większości komórek ρ_{ER} oraz ρ_{Mit} są rzędu około 0.1 (chociaż w pracy Marhla [183] współczynniki te zostały wybrane jako 0.01). Ustalając wartości stosunków $\frac{\beta_{ER}}{\rho_{ER}} = 1/4$ oraz $\frac{\beta_{Mit}}{\rho_{Mit}} = 1/4$ zapewniające występowanie oscylacji w rozpatrywanym układzie, otrzymujemy przybliżone wartości współczynników β równe w przybliżeniu 0.025.

Parametry kinetyczne określają maksymalne przepływy jonów wapnia przez dany transporter. Nazwy stałych pochodzą od nazw własnych poszczególnych przepływów. Wartości te (przedstawione małymi literami) oparte są na danych eksperymentalnych [183]. Dużymi literami przedstawione zostały z kolei stale półaktywacji poszczególnych białek transportujących wapń. Wszystkie parametry zgromadzone zostały w Tab. 4.1 oraz Tab. 4.2.

Parametr	Wartość		Parametr	Wartość	
Stężenia			*Parametry kinetyczne*		
Ca_{tot}	90	μM	k_{ch}	4100	s^{-1}
Pr_{tot}	120	μM	k_{pump}	20	s^{-1}
			k_{leak}	0.05	s^{-1}
Stałe objętościowe			k_{in}	300	$\mu\mathrm{Ms}^{-1}$
ρ_{ER}	0.01		k_{out}	125	s^{-1}
ρ_{Mit}	0.01		k_{MAM}	1200	$\mu\mathrm{Ms}^{-1}$
			k_m	0.00625	s^{-1}
Stałe buforujące			k_+	0.1	$\mu\mathrm{M}^{-1}\mathrm{s}^{-1}$
β_{ER}	0.0025		k_-	0.01	s^{-1}
β_{Mit}	0.0025		K_1	5	μM
			K_2	0.8	μM
			K_3	5	μM
			K_4	2.8	μM

Tablica 4.1: Parametry użyte w **Modelu #1**.

Dla większości symulacji wykonanych w ramach prac [77] (Model #1) oraz [267] (Model #2) wykorzystywano zestawy parametrów przedstawione w tabelach 4.1 oraz

Parametr	**Wartość**		**Parametr**	**Wartość**	
Stężenia			*Wartości 'β/ρ'*		
Ca_{tot}	90	μM	$\beta_{ER}(\rho_{ER})^{-1}$	0.25	
Pr_{tot}	120	μM	$\beta_{Mit}(\rho_{Mit})^{-1}$	0.25	
Parametry kinetyczne			*Stałe półaktywacji*		
k_{ch}	4200	s^{-1}	K_1	5	μM
k_{pump}	20	s^{-1}	$K_{2,2}$	20	μM
k_{leak}	0.05	s^{-1}	$K_{2,8}$	0.8	μM
k_{in2}	20	μMs^{-1}	K_3	3.1	μM
k_{in8}	80	μMs^{-1}	$K_{4,2}$	20	μM
k_{MAM2}	50	μMs^{-1}	$K_{4,8}$	1.8	μM
k_{MAM8}	200	μMs^{-1}			
k_+	0.1	$\mu M^{-1}s^{-1}$			
k_-	0.01	s^{-1}			
k_{out}	1.9	μMs^{-1}			

Tablica 4.2: Parametry użyte w **Modelu #2**.

4.2. Jeśli któryś z parametrów ulegał zmianie lub stawał się parametrem bifurkacyjnym było to wyraźnie zaznaczone.

Rozdział 5

Wyniki i ich analiza

5.1 Istnienie rozwiązań

Podstawowym pytaniem matematycznym, na jakie należy odpowiedzieć przy rozpatrywaniu układu (4.2)-(4.6) jest pytanie o istnienie rozwiązań. Ponieważ zainteresowani jesteśmy rozwiązaniami periodycznymi w czasie, istnienie rozwiązań musi mieć charakter globalny w czasie. Ze względu na interpretację biologiczną musimy również pokazać, że składowe rozwiązania są funkcjami nieujemnymi. Zagadnienie nieujemności rozwiązań może być rozważone w oparciu o następujące twierdzenie.

Twierdzenie 2. *(Propozycja 1.1 z [45]) Podzbiór $\mathbb{R}^N$ (zbiór punktów o nieujemnych składowych przestrzeni $\mathbb{R}^N$) jest niezmienniczy względem przepływu opisanego równaniem*

$$\frac{du}{dt} = F(u),$$

wtedy i tylko wtedy, gdy dla każdego $i = 1, \ldots, N$ funkcja $F(u) : \mathbb{R}^N_+ \to \mathbb{R}^N_+$, $N \geq 1$, $u := (u_1, \ldots, u_N)$, spełnia warunek:

$$F_i(u_1, \ldots, 0, \ldots, u_N) \geq 0, \tag{5.1}$$

gdzie 0 przypisane jest składowej u_i a $u_j \geq 0$ dla $j \neq i$.

Używając powyższego twierdzenia oraz prawa zachowania danego równaniem (4.9) udowodnimy istnienie nieujemnych rozwiązań dla układów niezredukowanych (4.2)–(4.6) i (4.22)–(4.26), a co za tym idzie układów zredukowanych (4.12)–(4.14) oraz (4.27)–(4.29).

Twierdzenie 3. *Załóżmy, że warunki początkowe $Ca_{Cyt}(0)$, $Ca_{ER}(0)$, $Ca_{Mit}(0)$, $CaPr(0)$ oraz $Pr(0)$ są nieujemne. Wtedy rozwiązania równań (4.2)–(4.6) istnieją globalnie w czasie, są jednoznacznie określone i nieujemne.*

Dowód. Wykażemy najpierw, że prawe strony układu (4.2)–(4.6) spełniają warunki (5.1). Mamy zatem:

$$
\begin{aligned}
F_1(0, Ca_{ER}, Ca_{Mit}, CaPr, Pr) &= k_{leak} Ca_{ER} + k_m Ca_{Mit} + K_CaPr, \\
F_2(Ca_{Cyt}, 0, Ca_{Mit}, CaPr, Pr) &= \frac{\beta_{ER}}{\rho_{ER}} \left(k_{pump} Ca_{Cyt} + k_{ch} \frac{Ca_{Cyt}^3}{K_1^2 + Ca_{Cyt}^2} + k_{leak} Ca_{Cyt} \right), \\
F_3(Ca_{Cyt}, Ca_{ER}, 0, CaPr, Pr) &= \frac{\beta_{Mit}}{\rho_{Mit}} \left(k_{in} \frac{Ca_{Cyt}^8}{K_2^8 + Ca_{Cyt}^8} + k_{MAM} \frac{Ca_{ER}^8}{K_4^8 + Ca_{ER}^8} \right), \\
F_4(Ca_{Cyt}, Ca_{ER}, Ca_{Mit}, 0, Pr) &= k_+ Ca_{Cyt} Pr, \\
F_5(Ca_{Cyt}, Ca_{ER}, Ca_{Mit}, CaPr, 0) &= k_CaPr.
\end{aligned}
$$

Prawe strony powyższych równości są nieujemne dla Ca_{Cyt}, Ca_{Mit}, Ca_{ER}, $CaPr$ oraz Pr nieujemnych. Tak więc, rozwiązania, o ile istnieją, są nieujemne. Stąd i z równania (4.9) wynika, że Ca_{Cyt}, Ca_{Mit}, Ca_{ER} i $CaPr$ ograniczone są z góry przez całkowitą ilość wapnia w układzie Ca_{tot}, natomiast Pr przez całkowitą ilość buforów Pr_{tot}. Funkcje $F_1, \ldots, F_5$ są funkcjami wymiernymi, w których mianownik jest oddzielony od 0, spełniają więc lokalnie warunek Lipschitza. Z tego wynika, że rozwiązania dla układu równań (4.2)–(4.6) są globalne w czasie i jednoznaczne. □

Dokładnie w ten sam sposób możemy udowodnić istnienie globalnych rozwiązań układu (4.22)–(4.26).

Twierdzenie 4. *Załóżmy, że warunki początkowe $Ca_{Cyt}(0)$, $Ca_{ER}(0)$, $Ca_{Mit}(0)$, $CaPr(0)$ oraz $Pr(0)$ są nieujemne. Wtedy rozwiązania równań (4.22)–(4.26) istnieją globalnie w czasie, są jednoznacznie określone i nieujemne.*

Ponieważ teoretyczna analiza rozpatrywanych układów w kontekście istnienia i własności rozwiązań oscylacyjnych i quasi-oscylacyjnych jest praktycznie niemożliwa, skoncentrowaliśmy się głównie na ich analizie numerycznej. Z uwagi na fakt, że naszym zasadniczym celem było uwzględnienie istnienia struktur typu MAM i ich wpływ na czasoprzestrzenny rozkład stężenia wapnia w komórce interesowały nas przede wszystkim następujące zagadnienia:

- wpływ struktur typu MAM na profile czasowe rozwiązań periodycznych i quasi-periodycznych
- wpływ struktur MAM na okres rozwiązań oscylacyjnych
- wpływ struktur MAM na średnią zawartość wapnia w poszczególnych kompartmentach
- istnienie i własności punktów stacjonarnych układów w zależności od efektywności transferu wapnia przez struktury typu MAM

- możliwe scenariusze apoptozy wywołane powstawaniem struktur MAM „*de novo*" wywołanych czynnikami stresogennymi

Mówiąc o wpływie struktur MAM, mamy oczywiście na myśli zależność rozwiązań od wielkości współczynnika k_{MAM}.

Jak już stwierdziliśmy oscylacje wapniowe w komórkach spełniają istotną, choć w wielu przypadkach nie do końca wyjaśnioną, rolę fizjologiczną. Ich jakościowy i ilościowy charakter związany jest zarówno z rodzajem komórek, ich stanem i historią, warunkami zewnętrznymi, jak również rodzajem bodźca, który je zapoczątkował.

Wspomniana różnorodność oscylacji wapniowych obserwowanych doświadczalnie znajduje swoje odpowiedniki w różnorodności rozwiązaniach oscylacyjnych otrzymywanych w modelach matematycznych ewolucji stężeń wapnia w poszczególnych kompartmentach komórki. Istnieją modele, w których w zależności od parametrów, mogą występować różne typy rozwiązań oscylacyjnych: od prostych (o stosunkowo regularnych profile czasowe), do bardziej złożonych, określanych literaturze mianem „bursting oscilations". Możliwe są również rozwiązania chaotyczne.

Wszystkie wyróżnione powyżej typy oscylacji zostały zaobserwowane w zaproponowanym przez nas Modelu #1 dla odpowiednio dobranych kombinacji parametrów. Model #2 okazał się pod tym względem bardziej jednoznaczny, gdyż nie zaobserwowaliśmy żeby generował on rozwiązania chaotyczne. Własność ta sugeruje, że warunkiem „sine qua non" istnienia rozwiązań chaotycznych w analizowanych przez nas równaniach jest zależność intensywności wpływu jonów wapniowych do mitochondriów od ich stężenia w cytozolu.

Oczywiście różnice w zachowaniu się rozwiązań układów równań w obydwu rozpatrywanych przez nas modelach nie ograniczają się jedynie jakościowych (i ilościowych) charakterystyk rozwiązań periodycznych, ale uwidaczniają się również w innych aspektach. Dlatego też poniżej, dla większej jasności, opiszemy najpierw rezultaty uzyskane dla Modelu #1, następnie zaś rezultaty uzyskane dla Modelu #2 .

5.2 Analiza Modelu #1

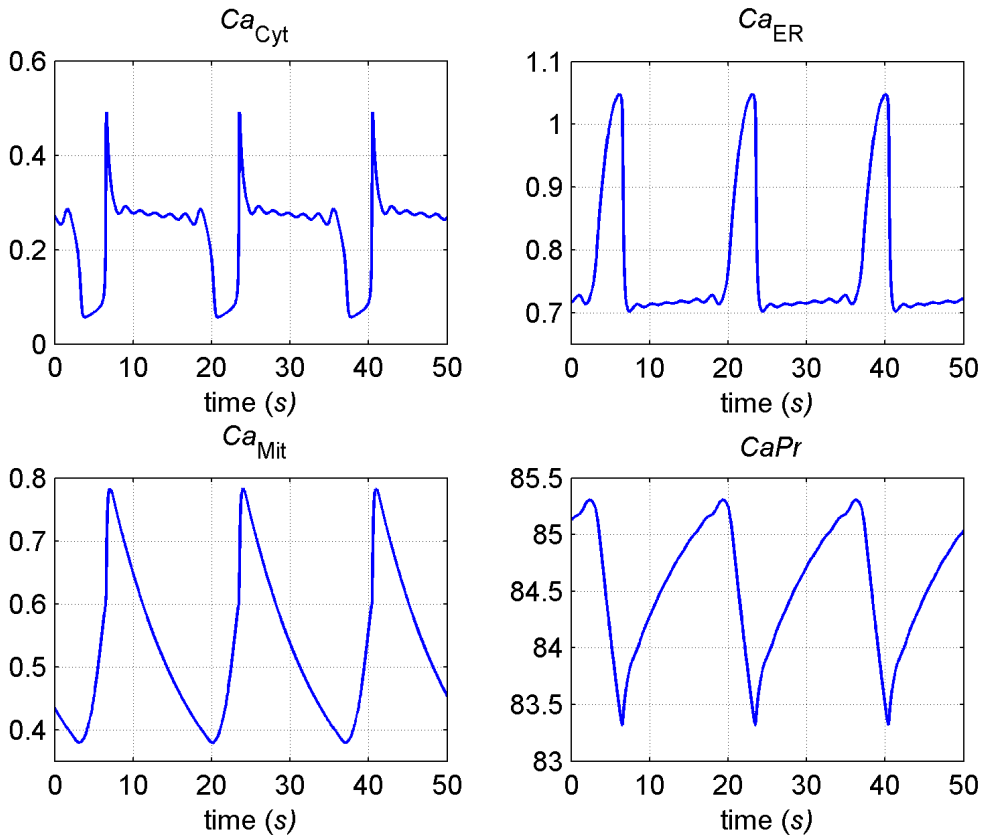
Jak już wspomniano powyżej w modelu tym, w zależności od wybranych parametrów pojawiają się wszystkie wspomniane rozwiązania oscylacyjne i quasioscylacyjne. Stabilne rozwiązania oscylacyjne, odpowiadające stabilnym cyklom granicznym, mają dla większości rozpatrywanych kombinacji parametrów stosunkowo duży basen przyciągania, jednak, wraz ze wzrostem współczynnika k_{MAM}, dla prawie wszystkich przypadków trajektorie analizowanego układu są przyciągane przez stabilny punkt stacjonarny układu równań, charakteryzujący się wysokim stężeniem jonów wapnia w przedziale mitochondrialnym. Przejście układu biologicznego do stanu odpowiadającego takiej

sytuacji matematycznej może być utożsamiane z wejściem komórki na ścieżkę apoptotyczną, kiedy to dochodzi do sekwestracji dużych ilości jonów wapnia w mitochondrium i uruchomienia wewnętrznego szlaku apoptozy [68, 96, 122]. Symulacje numeryczne, których wyniki zostały przedstawione w Rozdz. 5.2 w większości przypadków zostały wykonane dla parametrów w Tab. 4.1. Jeśli wartości któregoś z parametrów były inne niż w Tab. 4.1, zostało to explicite zaznaczone.

5.2.1 Analiza przebiegów czasowych

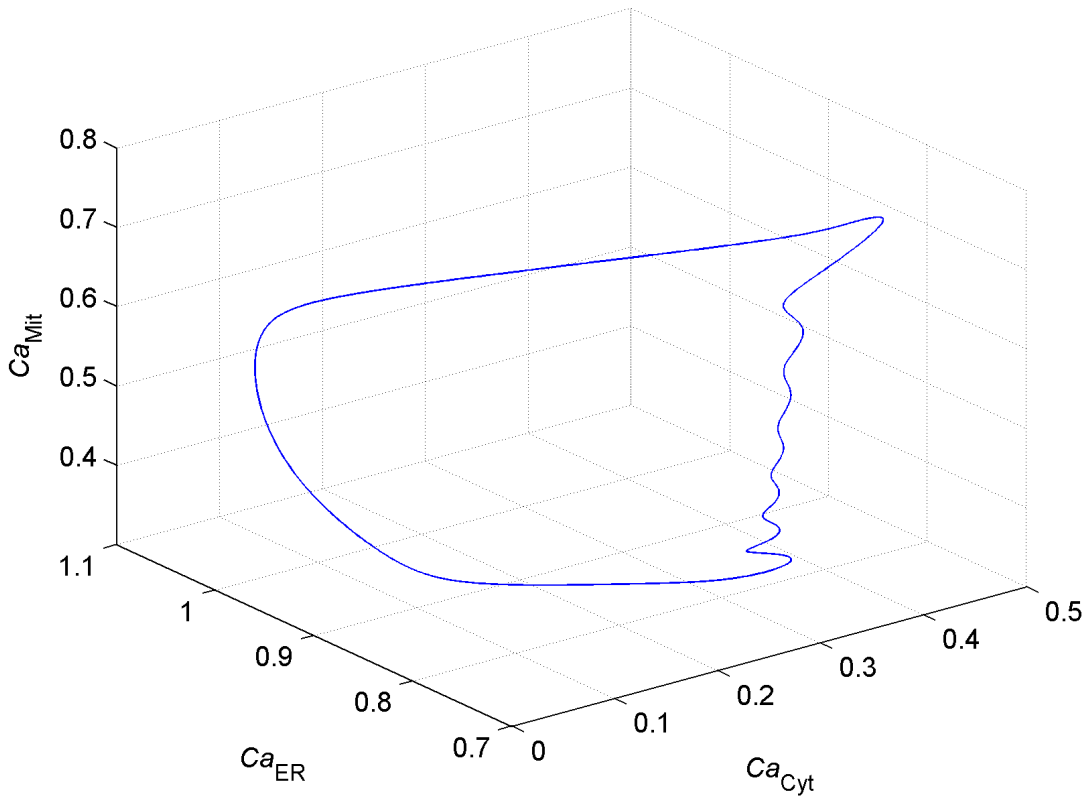
Oscylacje typu „bursting"

Oscylacje stężeń wolnych jonów wapnia w poszczególnych kompartmentach oraz czasowy przebieg stężenia uwapniowanych buforów w cytozolu ($CaPr$) zostały przedstawione na Ryc. 5.1. Odpowiadający tym oscylacjom portret fazowy w przestrzeni Ca_{Cyt}, Ca_{Mit}, Ca_{ER} pokazany jest na Ryc. 5.2.



Rycina 5.1: Przebiegi czasowe stężeń wolnych jonów wapnia w poszczególnych kompartmentach dla parametrów tak jak w Tab. 4.1.

Jak widać na Ryc. 5.1 oscylacje te mają nieregularny charakter. Dla tego typu oscylacji charakterystyczna jest obecność dwóch składowych w ramach jednego okresu: nagły skok stężenia jonów wapnia (tzw. pik) oraz następujący po nim szereg oscylacji o wyższej częstotliwości i znacznie mniejszej amplitudzie, niż poprzedzający je wyrzut



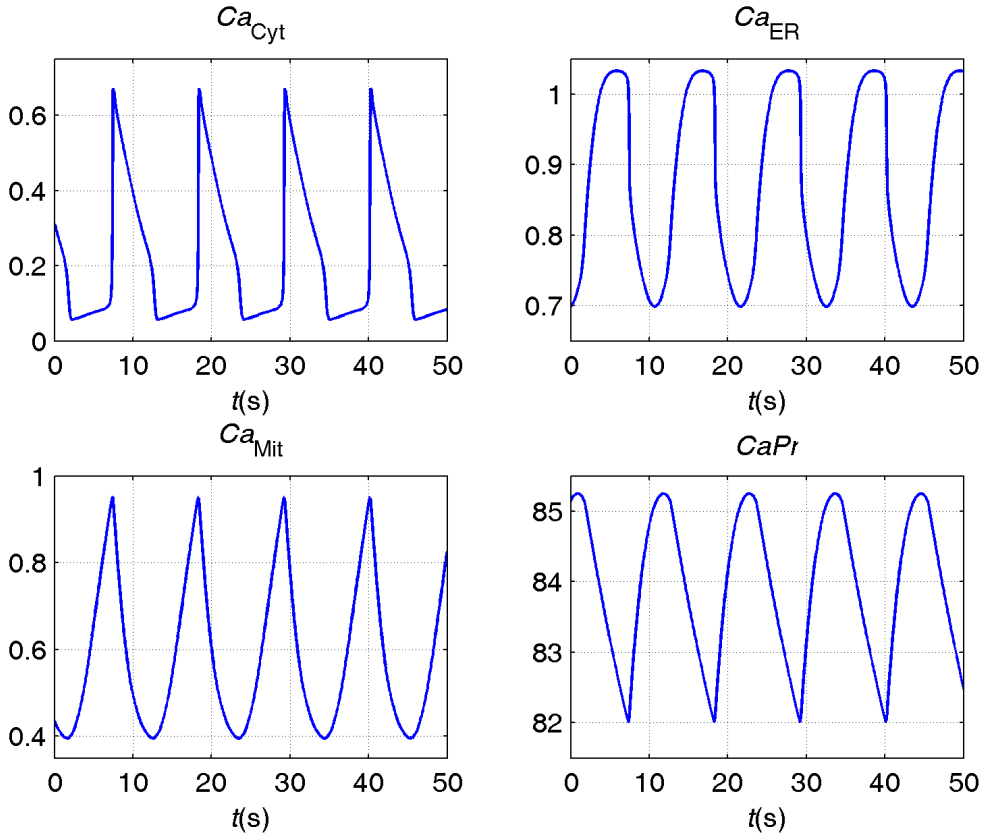
Rycina 5.2: Portret fazowy oscylacji typu „bursting". Wszystkie parametry tak jak w Tab. 4.1

jonów wapnia. Całkowity okres powyższych oscylacji wynosi $T = 17.1$ s. Stężenia jonów wapnia (w μM) w poszczególnych kompartmentach zawierają się w przedziałach: (0.057, 0.49) dla Ca_{Cyt}, (0.38, 0.78) dla Ca_{Mit} oraz (0.7, 1.05) dla Ca_{ER}. Stężenie wapnia zbuforowanego $CaPr$ zawiera się w przedziale (83.3, 85.3). Przebiegi czasowe stężeń wolnych jonów wapnia w kompartmentach (pierwsze 3 panele na Ryc. 5.1) mogą być odzwierciedlone w zwarty sposób w postaci zamkniętej krzywej w przestrzeni fazowej. Krzywa ta sparametryzowana jest czasem i nosi nazwę stabilnego cyklu granicznego. Cykl graniczny widoczny na Ryc. 5.2 posiada wyraźny element o helikalnym kształcie obrazujący, wspomnianą powyżej, drugą składową oscylacji typu „bursting". Składowa ta (o wysokiej częstotliwości i niskiej amplitudzie) jest wynikiem powolnego wypływu jonów wapnia z przedziału mitochondrialnego oraz szybkich procesów wymiany jonów wapnia pomiędzy cytozolem i ER wraz z reakcjami buforowania jonów wapnia przez białka cytozoliczne i retikularne. Okazuje się jednak, że dla innych wartości parametrów (w szczególności dla innych wielkości współczynnika k_{MAM} określającego wielkość prądu przez interfejs MaM) oscylacje opisywane układem równań (4.12)–(4.14) mogą zmienić swój charakter.

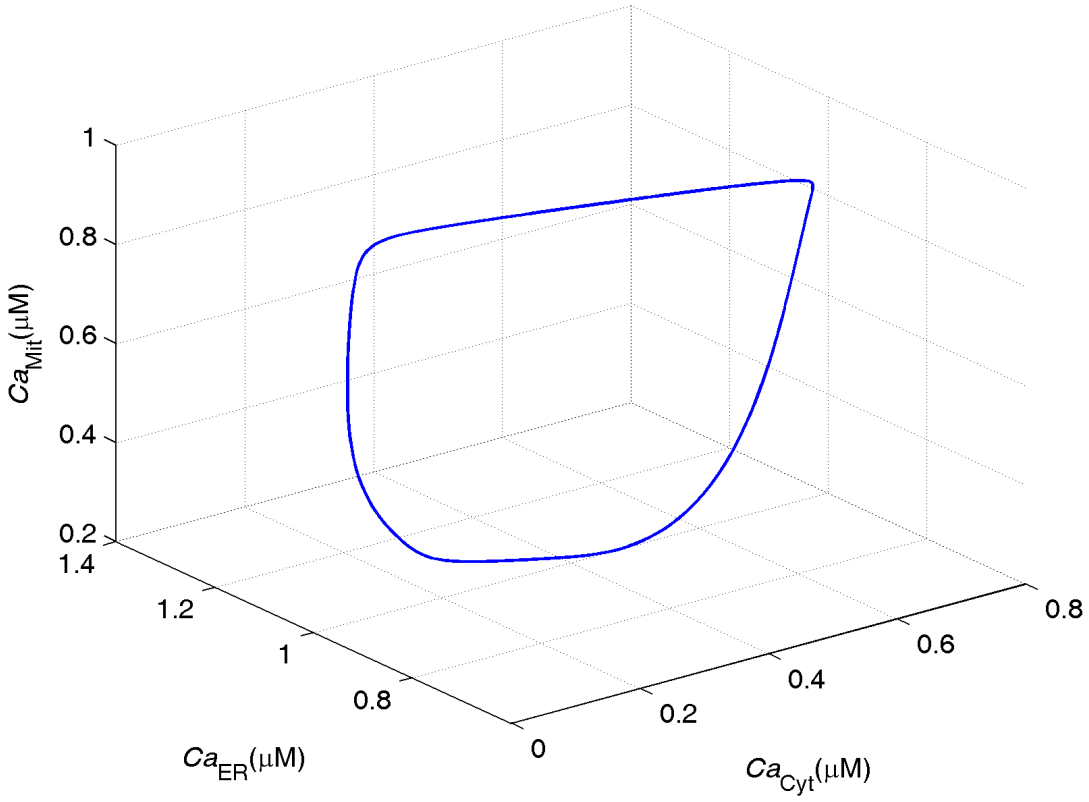
Oscylacje regularne

Na Rycinach 5.3 i 5.4 przedstawiono *regularne* oscylacje stężenia jonów wapnia w poszczególnych kompartmentach oraz obraz cyklu granicznego w przestrzeni fazowej Ca_{Cyt}, Ca_{Mit}, Ca_{ER}.

Rycina 5.3 przedstawia przebiegi czasowe stężenia jonów wapnia przy zmienionych w stosunku do Tab. 4.1 współczynnikach $K_2 = 1.37$ oraz $k_{MAM} = 1600$. Oscylacje te maja charakter regularny. Okres oscylacji T wynosi 10.9 s, natomiast stężenia jonów wapnia w poszczególnych kompartmentach zawierały się w przedziałach: (0.056, 0.56) dla Ca_{Cyt}, (0.4, 0.95) dla Ca_{Mit}, (0.7, 1.03) dla Ca_{ER}, natomiast ilość wapnia zbuforowanego $CaPr$ zawierała się w przedziale (82, 85.25). Jak łatwo zauważyć brak jest tutaj komponenty o podwyższonej „częstotliwości", która występuje w przypadku oscylacji typu „bursting" (Ryc. 5.1). Zwiększenie przepływu J_{MAM} (poprzez podwyższenie wartości współczynnika k_{MAM} od wartości 1200, jak na Ryc. 5.1, do wartości 1600) spowodowało regularyzację oscylacji stężenia jonów wapnia. Dokładniej wpływ współczynnika k_{MAM} na charakter oscylacji stężeń jonów wapnia oraz istnienie rozwiązań chaotycznych opisany został w podrozdziale 5.2.2.



Rycina 5.3: Regularne oscylacje wapniowe dla układu równań (4.12)–(4.14). Parametry: $k_{MAM} = 1600$, $K_2 = 1.37$ pozostałe parametry jak w Tab. 4.1. Wartości stężeń jonów na osi pionowej wyrażone w μM.

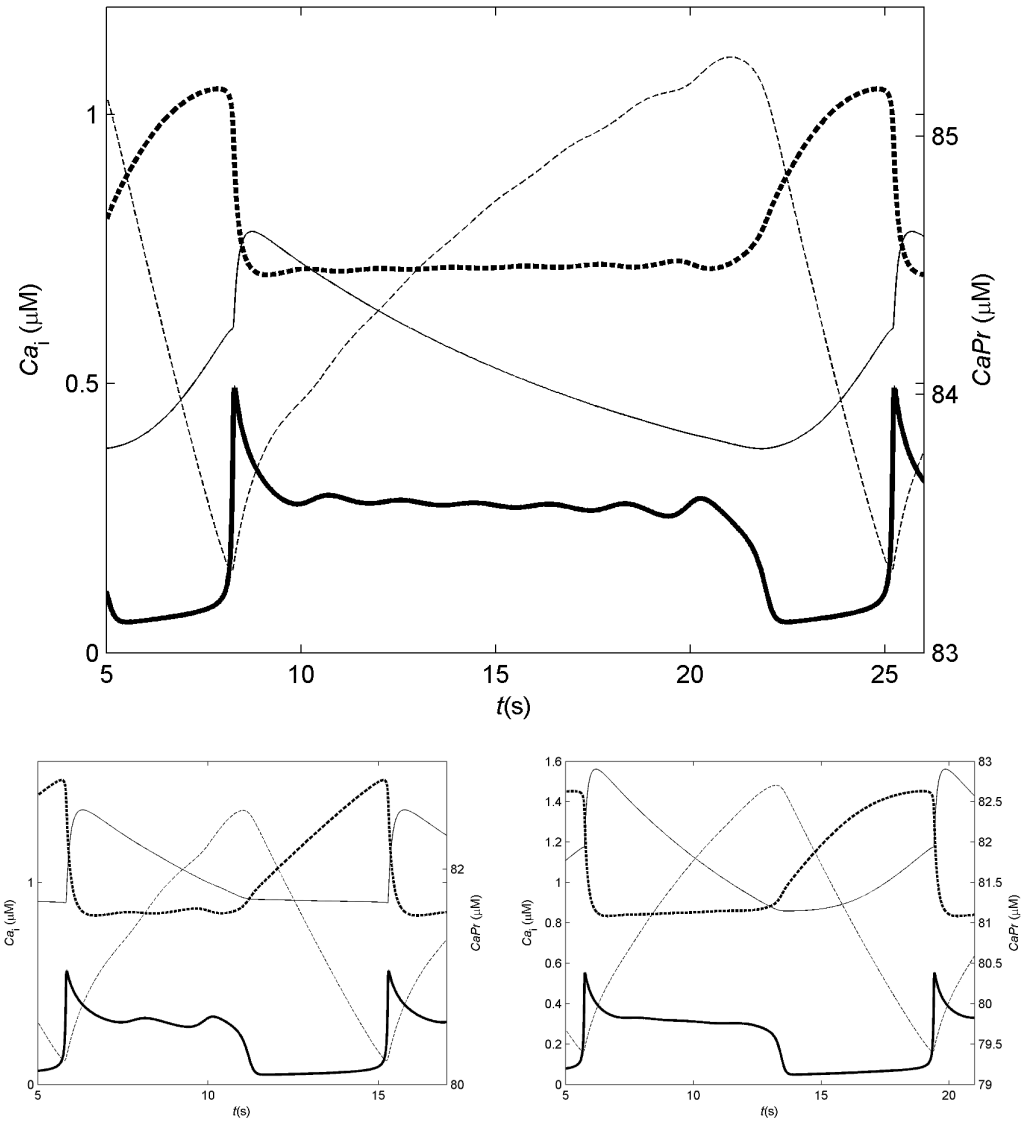


Rycina 5.4: Portret fazowy oscylacji regularnych oscylacji wapniowych dla układu równań (4.12)–(4.14) dla następującego zestawu parametrów $k_{MAM} = 1600$, $K_2 = 1.37$ pozostałe parametry jak w Tab. 4.1.

Analiza pojedynczego cyklu oscylacji typu „bursting"

Pojedynczy okres oscylacji nieregularnych typu „bursting", odpowiadający panelom z Ryc. 5.1, dla zestawu parametrów jak w Tab. 4.1, widoczny jest na Ryc. 5.5. (Na rycinie przedstawiającej jeden okres druga składowa o niskiej amplitudzie i wysokiej częstotliwości jest słabo widoczna, z uwagi na rozciągniecie osi czasu.) Każdy cykl może być podzielony na trzy fazy. Faza I - zaczyna się gdy poziom wapnia w cytozolu (Ca_{Cyt}) osiąga wartość maksymalną ($t = 7.6$ s) i trwa do czasu aż poziom wapnia w mitochondriach (Ca_{Mit}) osiągnie wartość maksymalną ($t = 8.1$ s). W tej fazie wiodącymi procesami są: uwalnianie wolnych jonów wapnia z retikulum oraz znaczny pobór Ca^{2+} przez mitochondria i buforowanie poprzez białka cytozolu.

W fazie drugiej aktywowany jest powolny strumień wapnia z mitochondriów do cytozolu. Większość uwolnionych jonów wapnia związana jest z cytozolicznymi białkami buforującymi. Ważnym procesem, zachodzącym w tej fazie jest szybka wymiana wapnia pomiędzy cytozolem i ER, co prowadzi do małych, szybkich drgań stężenia wapnia w tych kompartmentach (wspomniana powyżej druga składowa oscylacji). Ten etap kończy się, gdy poziom wapnia buforowanego ($CaPr$) osiąga wartość maksymalną (tj. dla $t = 20.7$ s).

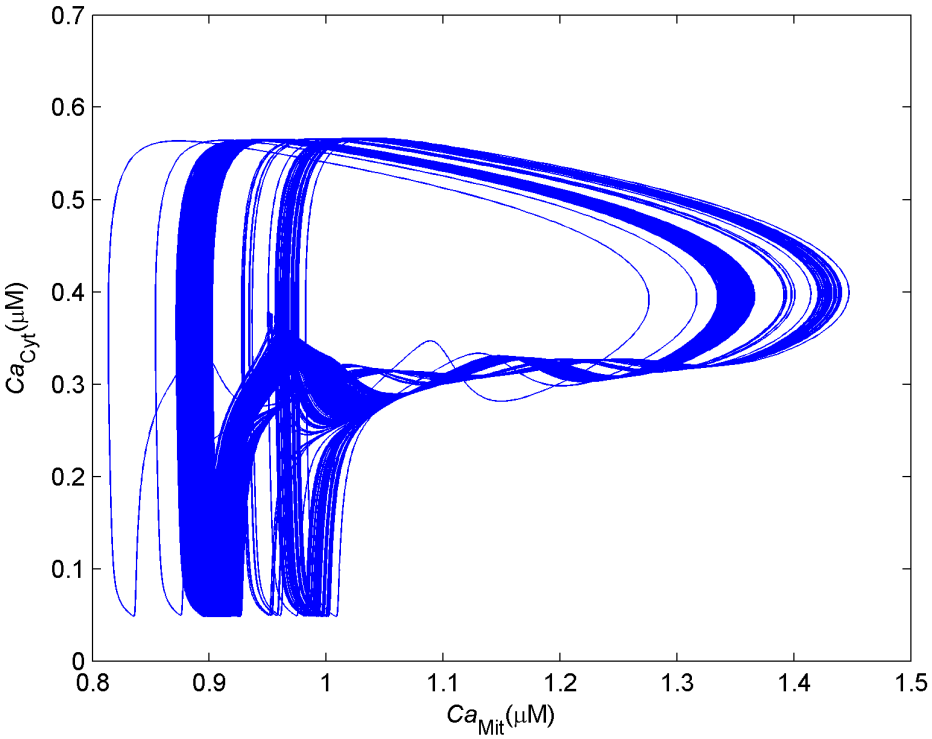


Rycina 5.5: Analiza pojedynczego okresu oscylacji stężenia jonów wapnia. Ca_i - oznacza stężenie jonów wapnia w i-tym kompartmencie. $CaCyt$ - pogrubiona, pełna linia; $CaMit$ - cienka, pełna linia; $CaER$ - pogrubiona, przerywana linia; $CaPr$ - cienka, przerywana linia. Stężenie buforów wapniowych Pr do $CaPr$ wynika z równania 4.9 i nie zostało ujęte na powyższym wykresie. Parametry dla górnego panelu tak jak w Tab. 4.1; dolny lewy panel: $k_{ch} = 2950$, $k_{MAM} = 3$; dolny prawy panel: $k_{ch} = 2950$, $k_{MAM} = 87$.

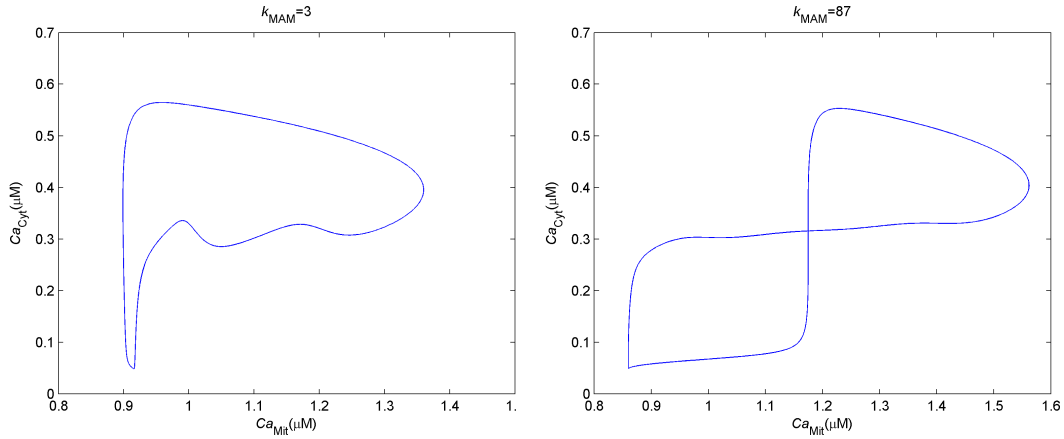
W fazie III, wiodącym procesem jest dysocjacja kompleksów białkowo-wapniowych. Mitochondria i ER są "ładowane", podczas gdy poziom wapnia w cytozolu najpierw zmniejsza się, a następnie wzrasta, aby osiągnąć maksymalną wartość, którą jest koniec III fazy ($t = 24.7$ s).

5.2.2 Wpływ k_{MAM} na charakter oscylacji stężenia jonów wapnia

Na Ryc. 5.6 widoczne są zmiany stężenia jonów wapnia w cytozolu i w mitochondriach dla $k_{ch} = 2950$ i $k_{MAM} = 0$, co odpowiada sytuacji, w której przepływ jonów wapnia przez te struktury został w tym przypadku całkowicie pominięty.



Rycina 5.6: Portret fazowy oscylacji o charakterze chaotycznym dla parametrów $k_{ch} = 2950$ i $k_{MAM} = 0$.



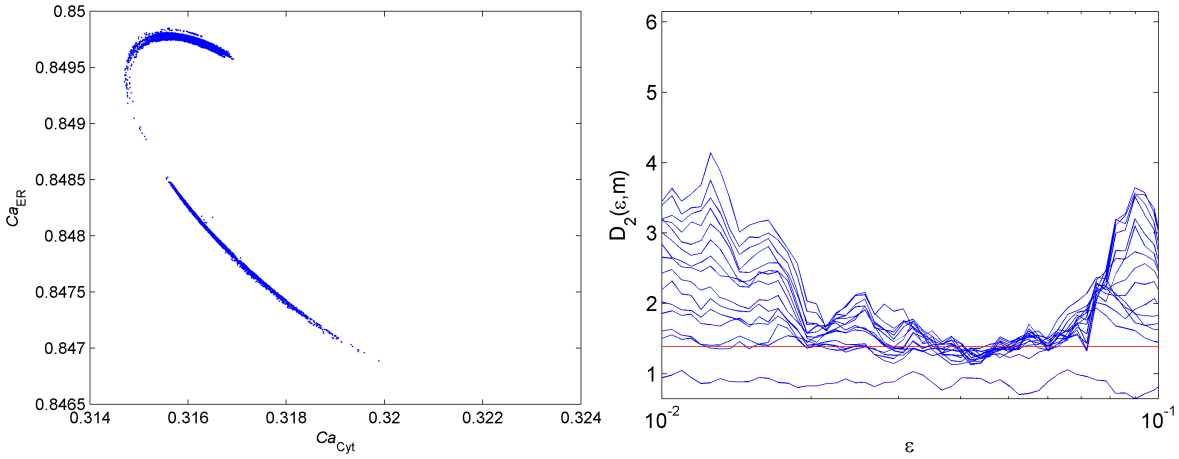
Rycina 5.7: Rzut trajektorii rozwiązania periodycznego (cyklu granicznego) na płaszczyznę Ca_{Cyt} – Ca_{Mit}, Ca_{ER} dla $k_{ch} = 2950$. Lewy panel $k_{MAM} = 3$, prawy panel $k_{MAM} = 87$.

Jak sugeruje Ryc. 5.7 wprowadzenie nawet niewielkiego przepływu jonów wapniowych przez struktury MAM (przez zadanie niezerowej stałej k_{MAM}) powoduje, że oscylacje chaotyczne zanikają. Wprowadzenie przepływu przez struktury MAM nie tylko regularyzuje przepływy wapniowe w komórce, ma również duży wpływ na kształt profili oscylacji wapniowych. W obu przypadkach, przedstawionych na Ryc. 5.7 ($k_{MAM} = 3$ oraz $k_{MAM} = 87$) mamy do czynienia z dobrze określonym cyklem granicznym. Dla $k_{MAM} = 3$ rzut cyklu na płaszczyznę $Ca_{Cyt} - Ca_{Mit}$ składa się z jednej pętli, natomiast dla wartości $k_{MAM} = 87$ rzut cyklu granicznego tworzy krzywą o ósemkowym kształcie.

Wzrost współczynnika k_{MAM} powoduje, że pionowa cześć trajektorii z Ryc. 5.7 (odpowiadająca mechanizmowi szybkiego ładowania cyzolu pod koniec fazy III) przechodzi do obszaru o wyższym stężeniu jonów wapnia w mitochondrium ($\approx 1.3 - 1.6$ μM). Zmienia się zatem mechanizm ładowania mitochondriów. Dla $k_{MAM} = 3$ mamy szybkie ładowanie mitochondriów wraz z szybkim ładowaniem cytozolu. Dla $k_{MAM} = 87$, oprócz szybkiego mechanizmu ładowania cytozolu i mitochondriów, występuje także wolne ładowanie kompartmentu mitochondrialnego, przy bardzo niskim, niemal stałym, poziomie jonów wapnia w cytozolu. Warto zauważyć, że w tej fazie niemal cała pula jonów wapnia, która jest sekwestrowana przez mitochondria i ER, pochodzi z dysocjacji kompleksów buforujących wapń.

Jednak wpływ struktur MAM na oscylacje stężenia jonów wapnia jest o wiele bardziej złożony, niż prosta regularyzacja trajektorii. Przeanalizowaliśmy wpływ współczynnika k_{MAM} na trajektorie dla dwóch wartości k_{ch}: 2950 oraz 4100, dla których asymptotyczne zachowanie systemu ($k_{MAM} = 0$) rozwiązań oscylacyjnych jest odpowiednio chaotyczne lub odpowiada stabilnym rozwiązaniom periodycznym (znaleziono stabilny cykl graniczny). Zaobserwowano szereg rozwiązań stabilnych dla szerokiego zakresu wartości parametru k_{MAM}. Dla k_{ch} równego 2950 wartości k_{MAM} były brane z przedziału (0,101), natomiast dla k_{ch} równego 4100 wartości k_{MAM} były brane z przedziału (0,1600). W zależności od wartości parametru k_{MAM} uzyskaliśmy różne rodzaje rozwiązań periodycznych (cykli granicznych o różnej „krotności" - Ryc. 5.9) oraz oscylacyjne rozwiązania o charakterze chaotycznym. Rozwiązanie uznawaliśmy za stabilne jeśli najwyższy wykładnik Lapunowa wynosił 0, a pozostałe dwa były ujemne. Rozwiązanie uznawaliśmy za chaotyczne jeśli jeden z wykładników przyjmował wartość 0, natomiast pozostałe dwa były niezerowe i miały rózny znak. Np. dla $k_{ch} = 2950$ i $k_{MAM} = 30$ wykładniki Lapunowa wynoszą odpowiednio: $\lambda_1 = 8.9 \times 10^{-6}$ (odpowiadająca wykładnikowi zerowemu), $\lambda_2 = -0.07$ oraz $\lambda_3 = -4.54$. Zakres czasowy dla analizowanych trajektorii wynosił 5000 s, z kolei krok czasowy dla ortonormalizacji Gramma-Schmidta wybrano na 2 s. Wykładniki Lapunowa zostały obliczone za pomocą pakietu MATDS dla systemu MATLAB do badań systemów dynamicznych [109]. Numeryczne wyznaczenie wykładników Lapunowa obarczone jest często relatywnie dużym błędem, który spowodowany jest trudnym doborem odpowiedniego kroku czasowego ortonormalizacji Gramma-Schmidta. Dlatego też dość często mieliśmy do

czynienia z sytuacją, w której niezerowe wykładniki Lapunowa miały różny znak, lecz bardzo małą wartość (rzędu 10^{-5}), co uniemożliwiało prawidłową klasyfikację trajektorii. W takich przypadkach, aby zdecydować, czy trajektoria jest chaotyczna, czy też jest cyklem granicznym (jedno- lub wielokrotnym), wyznaczane były przekroje Poincarégo i szacowany wymiar korelacji D_2 atraktora. Do obliczeń używaliśmy pakietu Tisean [128, 144]. Przekroje Poincarégo w płaszczyźnie $\mathrm{Ca}_{Mit} = 1.2$ (lewy panel) i szacowany wymiar korelacji dla trajektorii chaotycznej dla parametrów $k_{ch} = 2950$, $k_{MAM} = 73$ (prawy panel) są przedstawione na Ryc. 5.8. Ponieważ punkty przecięcia trajektorii z płaszczyzną przekroju tworzą rozmyty łuk, sugeruje to, że badana trajektoria jest chaotyczna [208]. W przypadku cyklu granicznego zbiór punktów skupienia w jego przekroju Poincarégo byłby jednym lub kilkoma punktami, w zależności od stopnia jego komplikacji. Przekrój Poincarégo znacznie upraszcza analizę skomplikowanych trajektorii okresowych lub quaziokresowych, zachowując jednocześnie istotne informacje na temat jego dynamiki.



Rycina 5.8: Lewy panel: przekroje Poincarégo w płaszczyźnie $\mathrm{Ca}_{Mit} = 1.2$. Parametry jak w Tab. 4.1 za wyjątkiem $k_{ch} = 2950$ oraz $k_{MAM} = 73$. Prawy panel: lokalne nachylenia sum korelacyjnych dla różnych wymiarów włożenia m (przyporządkowanych poszczególnym krzywym) w zależności od wymiaru pudełek ε - niebieskie linie. Oszacowany wymiar korelacji $D_2 = 1.34$ - czerwona linia (parametry jak w Tab. 4.1).

Szacunkowy wymiar korelacji D_2 (w notacji stosowanej przez [128]) dla różnych wartości parametru k_{MAM} i parametru $k_{ch} = 2950$ przedstawiono w Tab. 5.1.

k_{MAM}	0	41	42	43	46	68	72	73	89
D_2	1.84	1.02	1.05	1.12	1.64	1.1	1.02	1.34	1.09

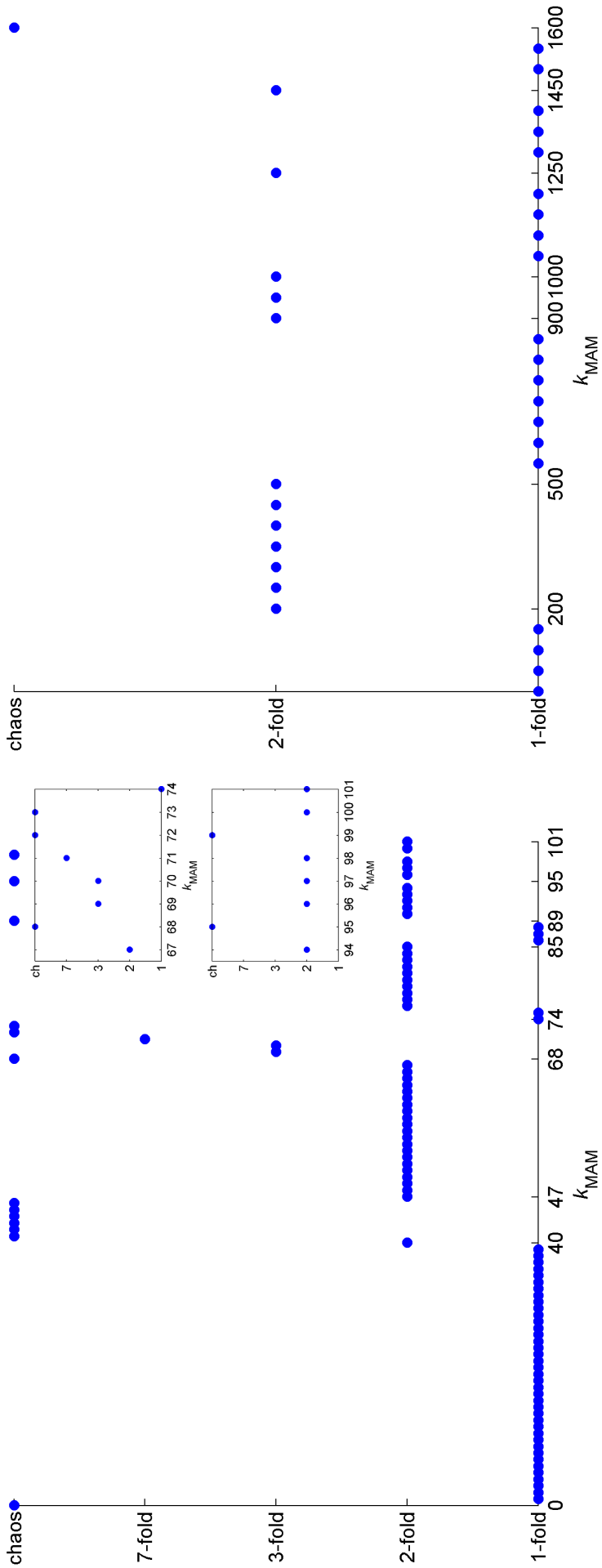
Tablica 5.1: Korelacja wymiarów atraktorów dla $k_{ch} = 2950$.

Dokładniejsza analiza zachowań rozwiązań modelu wykonana dla parametru $k_{ch} = 2950$ oraz parametru k_{MAM} w przedziale 0–200, z krokiem równym 1 wykazała, że

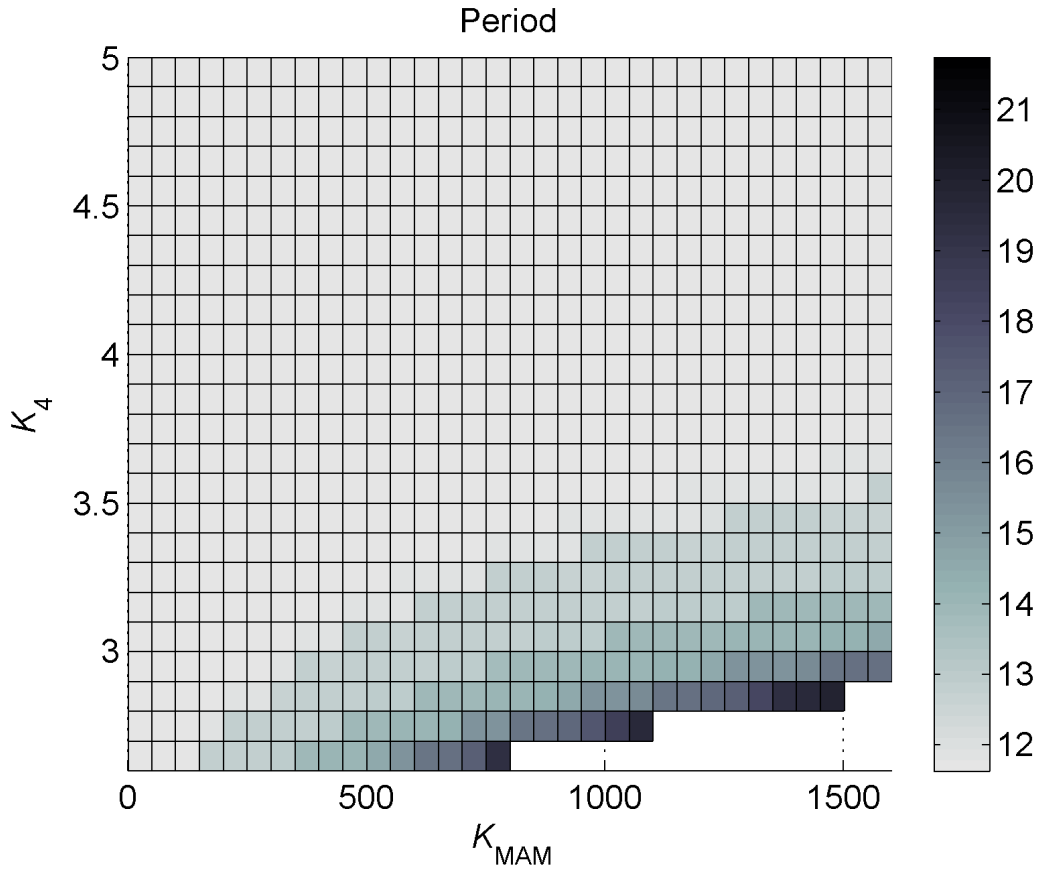
zmiana wartości k_{MAM} w znacznym stopniu zmieniała rodzaj uzyskanych oscylacji stężeń jonów wapnia (Ryc. 5.9). Dla k_{MAM} z powyższego przedziału zaobserwowaliśmy 1-, 2-, 3-, a nawet 7-krotne cykle graniczne oraz oscylacje o charakterze chaotycznym. Pojedyncze cykle graniczne zostały zaobserwowane dla k_{MAM} z zakresów 1–39, 74–75 i 86–88. Podwójne cykle graniczne istnieją dla k_{MAM} z zakresów 47–67, 76–85, 90–94, 96–98, 100–101 oraz k_{MAM}=40. Potrójne cykle graniczne występują dla k_{MAM} równego 69 i 70. Ponadto zaobserwowano siedmiokrotny cykl graniczny dla $k_{MAM} = 71$. Analiza wykładników Lapunowa i przecięć Poincarégo sugerują istnienie występowania chaosu deterministycznego dla k_{MAM} z przedziałów 41–46, 72–73 i dla k_{MAM} równego 0, 68, 89, 95, 99. Ryc. 5.9 przedstawia schematycznie uzyskane wyniki dla k_{MAM} z przedziału od 0–101. Co więcej dla parametru $k_{MAM} \geq 102$ nie uzyskaliśmy stabilnego cyklu granicznego. Dla tych wartości większość trajektorii przyciągana była do stabilnego punktu stacjonarnego z wysokim poziomem jonów wapnia w przedziale mitochondrialnym ($Ca_{Mit} > 18\mu$M) - Ryc. 5.13 - co może zostać uznane za początkową fazę apoptozy, której wewnętrzny szlak inicjuje proces akumulacji jonów wapnia w mitochondrium [122, 140, 237].

Dla parametru k_{ch}=4100 dokonaliśmy podobnej analizy zmieniając parametr k_{MAM} od 0 do 1600 z krokiem równym 50. Stabilne pojedyncze cykle graniczne obecne były dla k_{MAM} z zakresów 0–150, 550–850, 1050–1200, 1300–1400, 1500–1550. Stabilne podwójne cykle graniczne obecne były dla k_{MAM} z zakresów 200–500, 900–1000 oraz k_{MAM} równego 1250 i 1450. Zachowania chaotyczne obserwowano dla k_{MAM} równego 1600 (Ryc. 5.9, prawy panel). Dla $k_{MAM} \geq 1650$ trajektoria chaotyczna traci stabilność i większość trajektorii z tego obszaru dąży do punku stacjonarnego, który charakteryzuje się wysokim stężeniem jonów wapnia w przedziale mitochondrialnym. Efekt ten można interpretować jako wczesną fazę procesu apoptozy. Ryc. 5.9 przedstawia schematycznie uzyskane wyniki dla k_{MAM} z przedziału od 0 – 1600.

Na Ryc. 5.10 przedstawiona została mapa zależności okresu oscylacji stężeń jonów wapnia od dwóch parametrów K_4 oraz k_{MAM}. Okres oscylacji wahał się w przedziale od 11 do 22 sekund. Dla parametru $K_4 > 3.6$ okres oscylacji praktycznie nie zmieniał się i niezależnie od wartości parametru k_{MAM} wynosił około 12 s. Natomiast dla ustalonej wartości parametru K_4 z przedziału (0–3.6) okres oscylacji zwiększał się wraz ze wzrostem wartości parametru k_{MAM}



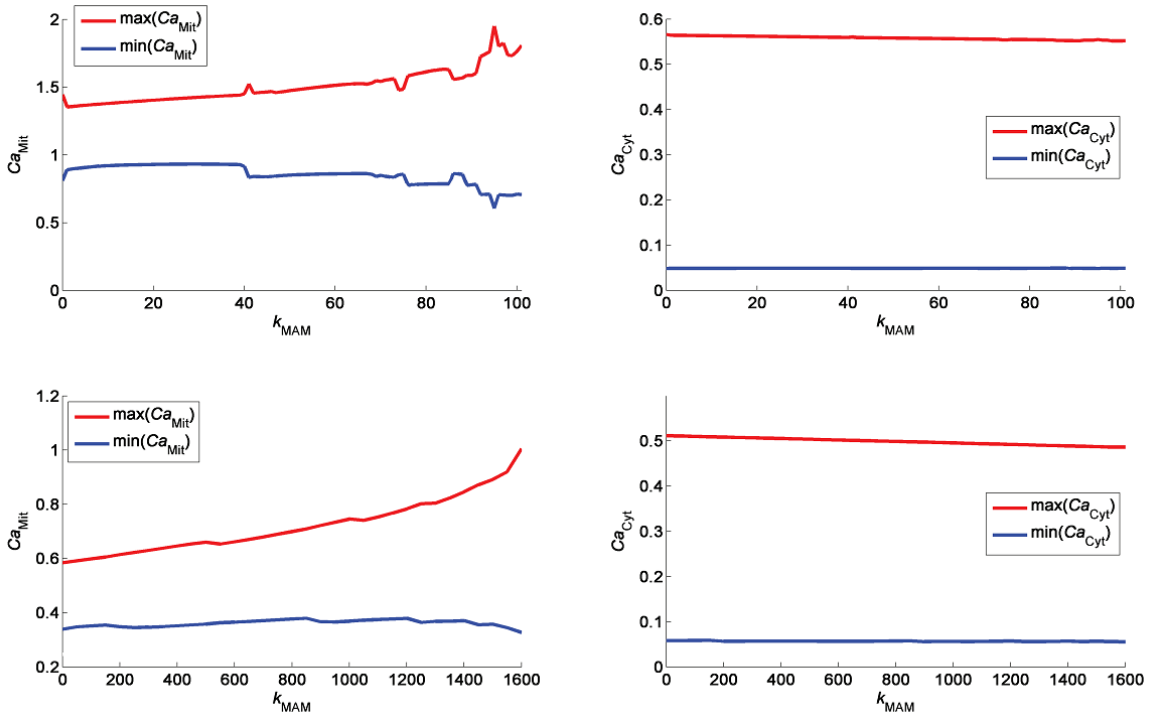
Rycina 5.9: Jakościowy obraz zachowania się rozwiązań przedstawiony w funkcji parametru k_{MAM} dla $k_{ch} = 2950$ (lewy panel) oraz $k_{ch} = 4100$ (prawy panel). Dla różnych wartości k_{MAM} mamy do czynienia z atraktorem w postaci 1, 2, 3, 7-krotny cyklu granicznego lub trajektorią chaotyczną.



Rycina 5.10: Zależność okresu oscylacji (w sekundach) od parametrów k_{MAM} i K_4 . Biały obszar odpowiada zbiorowi parametrów, dla których rozwiązania periodyczne nie występowały.

5.2.3 Wpływ k_{MAM} na poziom stężeń jonów wapnia

Wykresy przedstawiające zmiany minimalnych i maksymalnych wartości stężeń jonów wapnia w Ca_{Cyt} oraz Ca_{Mit} w reżimie stabilnych cykli granicznych, w zależności od współczynnika k_{MAM}, znajdują się na Ryc. 5.11. Dla lepszej wizualizacji punkty maksimum i minimum dla wartości k_{MAM} z Ryc. 5.9 połączone zostały liniami ciągłymi. Minimalne i maksymalne wartości stężeń jonów wapniowych w cytozolu (Ca_{Cyt}) pozostają niemal stałe dla obu wartości k_{ch} (2950 i 4100) (prawe panele Ryc. 5.11). Dla $k_{ch} = 2950$ maksymalne Ca_{Mit} charakteryzuje się tendencją wzrostową (pomijając niewielkie perturbacje, wynikające ze zmiany charakteru rozwiązań oscylacyjnych), a minimalna wartość Ca_{Mit} zmniejsza się. Podobnie dla $k_{ch} = 4100$ obserwujemy istotny wzrost maksymalnych stężeń jonów wapnia w mitochondriach, natomiast minimalne wartości pozostają stabilne nieznacznie maleją. Z tego powodu amplituda oscylacji stężeń jonów wapnia w mitochondrium rośnie wraz z k_{MAM}.



Rycina 5.11: Minimalne i maksymalne wartości Ca_{Mit} (lewy panel) oraz Ca_{Cyt} (prawy panel) dla rozwiązań periodycznych. Górne panele - $k_{ch} = 2950$, dolne panele - $k_{ch} = 4100$. Dla lepszej wizualizacji punkty maksimum i minimum dla wartości k_{MAM} z Ryc. 5.9 połączone zostały liniami ciągłymi.

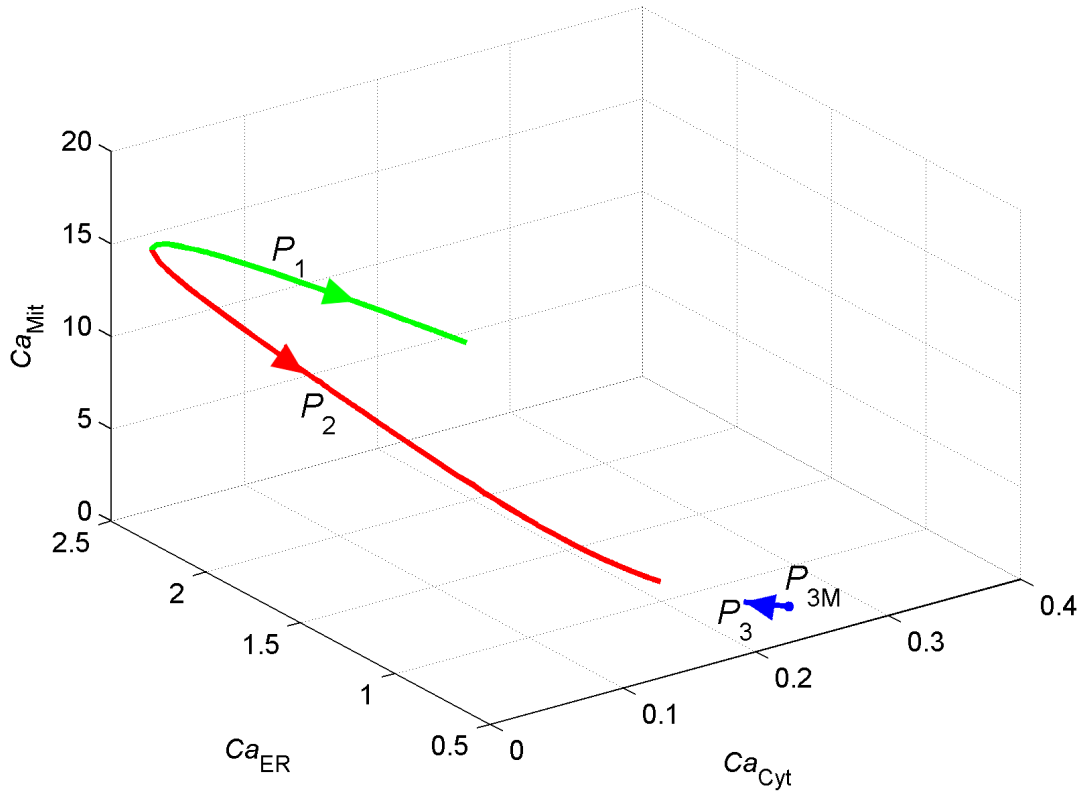
5.2.4 Punkty stacjonarne

Punkty stacjonarne wyznaczono za pomocą „MATLAB - Optimisation Toolbox", dla zestawu parametrów takich jak przedstawione w Tab. 4.1. Na Ryc. 5.12 pokazano zależność stanów stacjonarnych od wartości parametru k_{MAM} w przedziale 0–10000 (pozostałe parametry tak jak w Tab. 4.1). Dla $k_{MAM} = 0$ (tak jak ma to miejsce w przypadku modelu Marhla, opisanego w [183]) istnieje tylko jeden dodatni punkt stacjonarny

$$P_{3M} = (Ca_{Cyt} = 0.257, Ca_{ER} = 0.730, Ca_{Mit} = 0.102, CaPr = 86.41)$$

(oznaczony na rysunku na niebiesko), który jest niestabilny. Wraz ze wzrostem k_{MAM} zachodzi bifurkacja typu siodło-węzeł już dla wartości $k_{MAM} \approx 0.5$ i pojawiają się dwa nowe stany stacjonarne: stabilny P_1 (oznaczony na zielono) oraz niestabilny P_2 (oznaczony kolorem czerwonym). Charakterystycznym jest fakt, że dwa pierwsze stany P_1 i P_2 znacząco zmieniają się wraz ze zmianą wartości k_{MAM}, podczas gdy koordynaty punktu P_3 prawie wcale się nie zmieniają. Przykładowe punkty stacjonarne dla $k_{MAM} = 1200$:

$$
\begin{aligned}
P_1 &= (Ca_{Cyt} = 9.18 \times 10^{-3}, Ca_{ER} = 0.892, Ca_{Mit} = 19.1, CaPr = 10.1) \quad \text{(stabilny)} \\
P_2 &= (Ca_{Cyt} = 0.107, Ca_{ER} = 1.02, Ca_{Mit} = 5.94, CaPr = 62.0) \quad \text{(niestabilny)} \\
P_3 &= (Ca_{Cyt} = 0.254, Ca_{ER} = 0.730, Ca_{Mit} = 0.173, CaPr = 86.1) \quad \text{(niestabilny)}
\end{aligned}
$$

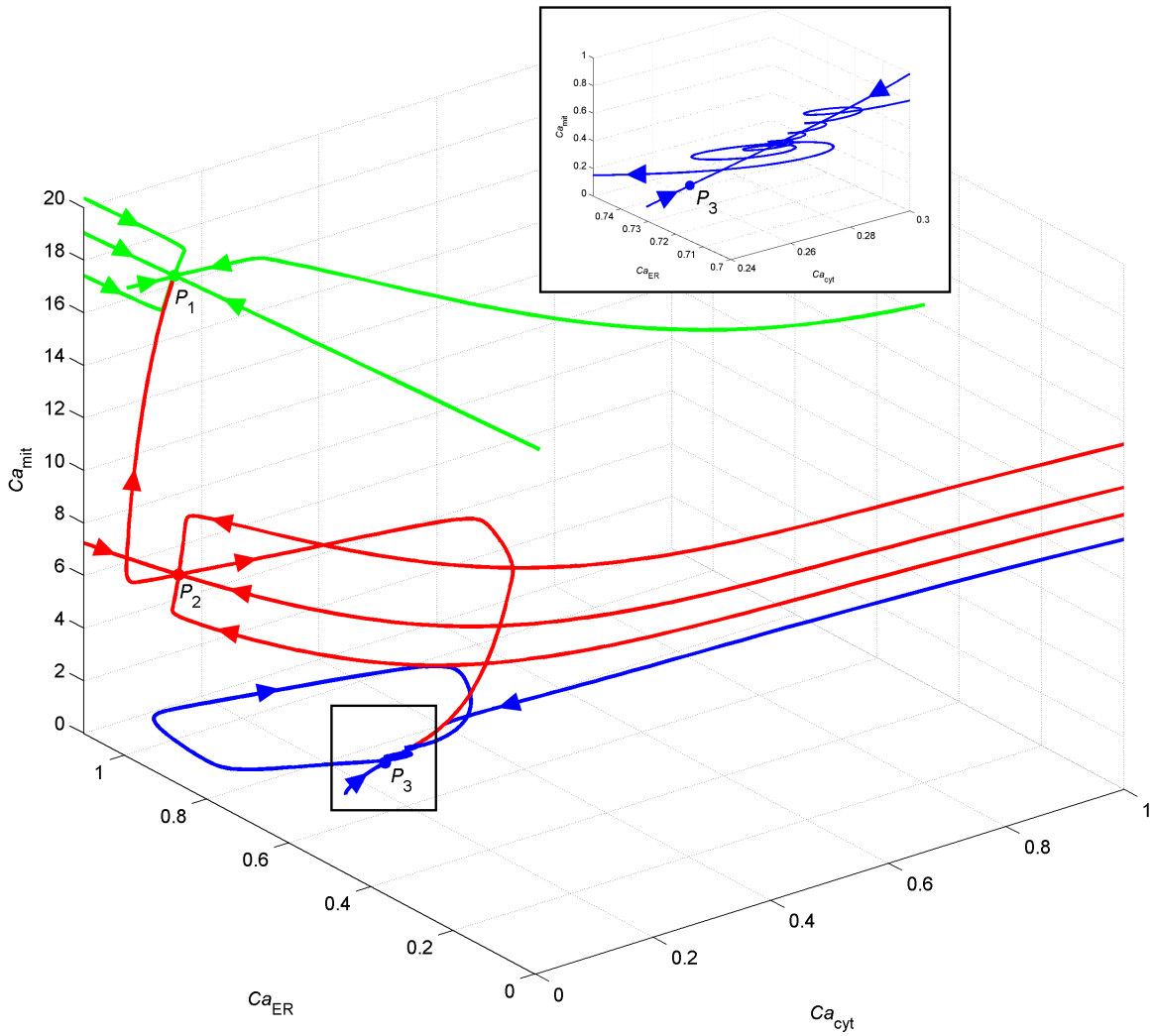


Rycina 5.12: Zachowanie punktów stacjonarnych w $k_{MAM} \in [0, 10000]$: P_1 - zielony (stabilny), P_2 - czerwony (niestabilny) oraz P_3 - niebieski (niestabilny). P_1 i P_2 powstają w wyniku bifurkacji typu siodło-węzeł przy $k_{MAM} = 0.5$. Strzałki wskazują wzrost wartości parametru k_{MAM}.

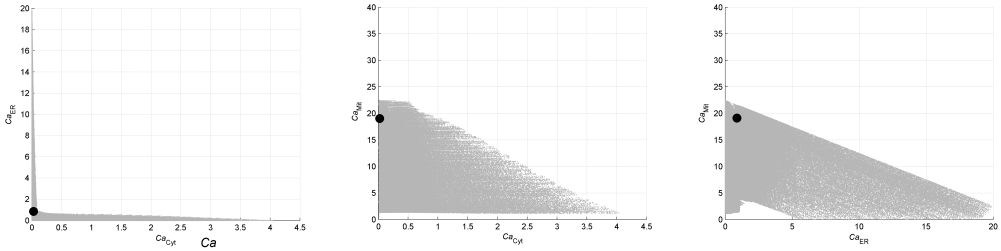
Ze względu na orientację Ryc. 5.12 nie oddaje dobrze wartości stężeń jonów wapnia w stanach stacjonarnych, w szczególności w kompartmencie mitochondrialnym. Punkty te wraz z niektórymi trajektoriami do nich dążącymi oraz oraz stabilnym cyklem granicznym pokazane zostały na Ryc. 5.13. Jak widać na wykresie istnieje separatrysa łącząca punkty P_1 i P_2.

Dla szerokiego zakresu wartości parametru k_{MAM} (np. $k_{MAM} \in (0.5, 1649]$) system zachowuje się jak układ bistabilny, w którym współistnieją dwa atraktory: stabilny punkt stacjonarny P_1 oraz stabilny cykl graniczny/przyciągająca trajektoria chaotyczna. jednoczesne istnienie powyższych atraktorów, charakteryzujących się dużymi basenami przyciągania ma istotne znaczenie biologiczne. Oscylacje wapniowe stanowią istotny czynnik będący częścią sieci sygnałowej, sprawdzający czy komórka jest

w dobrej kondycji. Natomiast podwyższony napływ jonów wapnia do mitochondriów (realizujący się na trajektoriach przyciąganych do punktu P_1) i ich sekwestracja w tym kompartmencie może skierować komórkę na szlak programowanej śmierci (scenariusz apoptozy Rozdz. 5.4). Na Ryc. 5.14 przedstawiono rzut basenu przyciągania punktu P_1 dla parametrów przedstawionych w Tab. 4.1 na płaszczyzny Ca_{Cyt}-Ca_{ER}, Ca_{Cyt}-Ca_{Mit} i Ca_{ER}-Ca_{Mit}. Jak widać większość trajektorii układu przyciągana jest przez stabilny cykl graniczny, co oznacza, że oscylacje są odporne na zaburzenia (układ homeostatyczny). Jednakże dla dużych wartości k_{MAM} (np. $k_{MAM} \geq 1649$) to punkt P_1 przyciąga znakomita większość trajektorii. Takie zachowanie może być zinterpretowana jako akumulacja wapnia w mitochondriach (pęcznienie mitochondriów), który występują w początkowej fazie apoptozy (podrozdział 5.4).



Rycina 5.13: Stany stacjonarne P_1, P_2, P_3 systemu (4.2) - (4.4) i stabilny cykl graniczny dla parametrów przedstawionych w Tab. 4.1. Punkt P_3 pozostaje schowany pod wykresem cyklu granicznego. W powiększeniu widoczny jest złożony charakter oscylacji w pobliżu punktu P_3. Kolorami oznaczone są trajektorie przyciągane przez punkty P_1, P_2, P_3.



Rycina 5.14: Baseny przyciągania punktu P_1: rzutowanie na przestrzeń $Ca_{Cyt} - Ca_{ER}$, $Ca_{Cyt} - Ca_{Mit}$ oraz $Ca_{ER} - Ca_{Mit}$. Czarny punkt odpowiada stabilnemu punktowi stacjonarnemu $P_1 = (9.18 \times 10^{-3}, 0.892, 19.1)$, szare punkty odpowiadają wartościom punktów początkowych trajektorii przyciąganych przez punkt P_1. Trajektorie startujące z białego obszaru przyciągane są przez stabilny cykl graniczny.

5.2.5 Podsumowanie dotyczące Modelu #1

Zaproponowany przez nas model (oznaczony jako Model #1) oscylacji stężeń jonów wapnia (Rozdz. 4.1.1) uwzględnia jawnie miejsca bliskiego kontaktu mitochondriów i ER - tzw. struktury MAM. Badania numeryczne wykazały, że powyższe struktury mają istotny wpływ na rodzaj i kształt profili przebiegów czasowych oscylacji stężeń jonów wapniowych. W modelu tym uzyskano szereg typów oscylacyjnych, od prostych oscylacji stężeń jonów wapnia, przez złożone oscylacje typu „bursting", po quasi-periodyczne rozwiązania chaotyczne. Zmiany parametru k_{MAM} (czyli maksymalnej przepustowości interfejsu MAM) zmienia typ oscylacji. Wzrost k_{MAM} powoduje zazwyczaj regularyzację trajektorii. Np. dla parametrów $k_{ch} = 2950$ i $k_{MAM} = 0$ istnieją rozwiązania chaotyczne, natomiast nawet dla bardzo małych wartości k_{MAM}, trajektorie startujące z tych samych warunków początkowych tworzą stabilny cykl graniczny (Ryc. 5.9). Wpływ bezpośredniego przepływu wolnych jonów wapnia przez interfejs MAM nie ogranicza się jedynie do regularyzacji trajektorii. Wraz ze wzrostem przepływu jonów wapnia przez miejsca kontaktu widoczne są bardziej złożone wzorce oscylacji - reprezentowane przez proste, złożone cykle graniczne i quasi-periodyczne rozwiązania chaotyczne. Ponadto, dla dużych wartości k_{MAM} basen przyciągania rozwiązań oscylacyjnych zmniejsza się znacząco i większość trajektorii zbiega do stabilnego punktu stacjonarnego P_1 (Ryc. 5.14, charakteryzującego się wysokim poziomem stężenia jonów wapnia w mitochondriach. Np. dla $k_{MAM} = 1200$ stężenie jonów wapnia w mitochondriach w punkcie stacjonarnym P_1 wynosi $Ca_{Mit} = 19.1\mu$M. Z biologicznego punktu widzenia tego typu sytuacja może być interpretowana jako początkowa faza procesu apoptozy (tzw. „puchnięcie mitochondriów"). Zaobserwowaliśmy również, że wzrost współczynnika k_{MAM} wpływa na kształt profili przebiegów czasowych, tak że dla wysokich wartości k_{MAM} ładowanie mitochondriów wapniem zaczyna się o wiele szybciej, niż w przypadku niskich wartości k_{MAM}. Ponadto, amplituda i okres oscylacji

oraz średnie stężenie jonów wapnia w mitochondriach (Ca_{Mit}) rośnie z wielkością parametru k_{MAM}. Zaproponowany powyżej początkowy etap scenariusza apoptozy jest ściśle związany z kompleksami błonowymi MAM.

5.3 Analiza Modelu #2

Jak już wspomnieliśmy w Rozdz. 4.1.2, w Modelu #2 uwzględniono również specyficzne właściwości białka transportującego wapń do wnętrza mitochondrium – uniportera mitochondrialnego (MICU). Białko to przy stosunkowo niskich stężeniach Ca^{2+} przenosi jony wapnia w tzw. szybkim modzie RaM-owym, który jest bardziej efektywny niż mod standardowy. Przepływ wapnia do mitochondriów w tym modelu składa się zatem z dwóch składowych: pierwsza uwzględnia wspomniany powyżej szybki tryb RaM-owy, druga opisuje pracę uniportera mitochondrialnego w trybie standardowym. Z tego powodu wyrażenia opisujące strumień jonów wapnia wpływających do mitochondriów w obszarze struktur MAM (J_{MAM}) i poza nimi (J_{in}) składają się z dwóch części, odpowiadających powyższym modom pracy uniportera. Zatem

$$J_{MAM} = J_{MAM2} + J_{MAM8} := k_{MAM2}\frac{Ca_{ER}^2}{K_{4,2}^2 + Ca_{ER}^2} + k_{MAM8}\frac{Ca_{ER}^8}{K_{4,8}^8 + Ca_{ER}^8},$$
$$J_{in} = J_{in2} + J_{in8} := k_{in2}\frac{Ca_{Cyt}^2}{K_{2,2}^2 + Ca_{Cyt}^2} + k_{in8}\frac{Ca_{Cyt}^8}{K_{2,8}^8 + Ca_{Cyt}^8}.$$

gdzie J_{MAM2} i J_{in2} opisują mod RaMowy pracy uniportera, natomiast J_{MAM8} i J_{in8} tryb standardowy.

Symulacje numeryczne, których wyniki zostały przedstawione w tym rozdziale w większości przypadków zostały wykonane dla parametrów przedstawionych w Tab. 4.2 i jest to przypadek referencyjny. Jeśli wartości któregoś z parametrów były inne niż w Tab. 4.2, zostało to explicite zaznaczone.

W celu ułatwienia analizy wpływu współczynników k_{MAM2} i k_{MAM8} na zachowanie modelu zdefiniowano dodatkowy parametr k_{MAM}:

$$k_{MAM} = k_{MAM2} + k_{MAM8} \tag{5.2}$$

z ustalonym stosunkiem:

$$k_{MAM8}/k_{MAM2} = 4 \tag{5.3}$$

W rozdziale tym skoncentrujemy się na:

- istnieniu oscylacji stężeń jonów wapnia
- stanach stacjonarnych oraz wpływie k_{MAM} na poziom jonów wapniowych

- wpływie k_{MAM} na okres oscylacji
- możliwym scenariuszu apoptozy wywołanego akumulacją jonów wapnia w mitochondriach

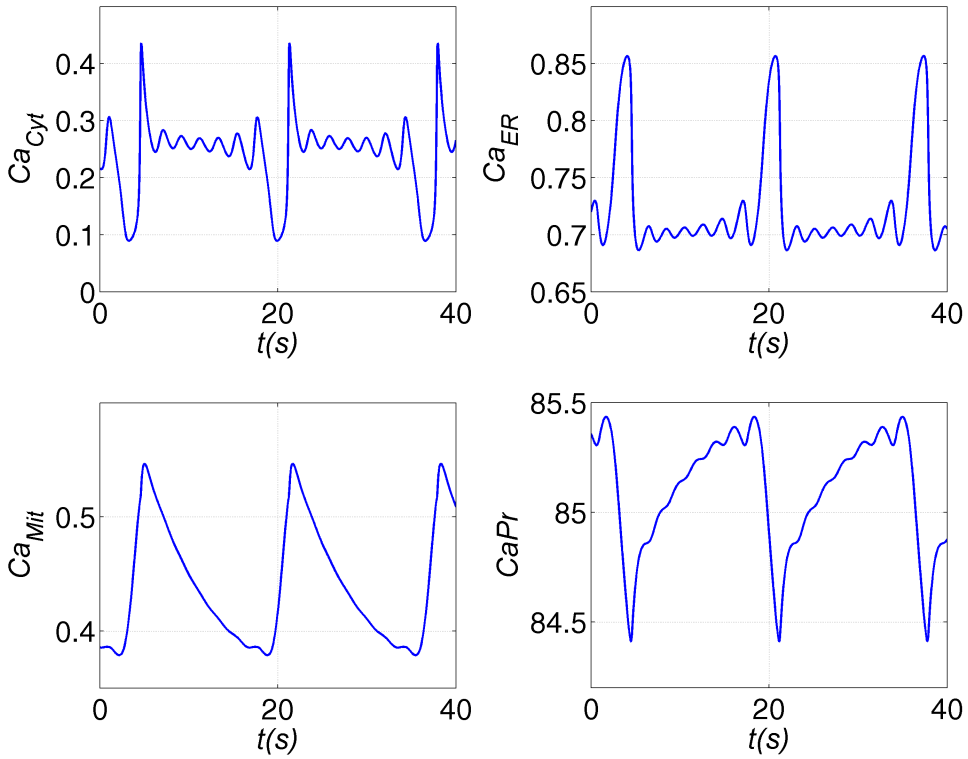
Punkty stacjonarne układu (4.22)–(4.26) określone zostały za pomocą programu „MATLAB Optimization Toolbox" dla zestawu parametrów przedstawionych w Tab. 4.2 i analizowane dalej w odniesieniu do parametru k_{MAM} z użyciem programu MatCont (Matlab Continuation Toolbox) [69].

5.3.1 Analiza przebiegów czasowych

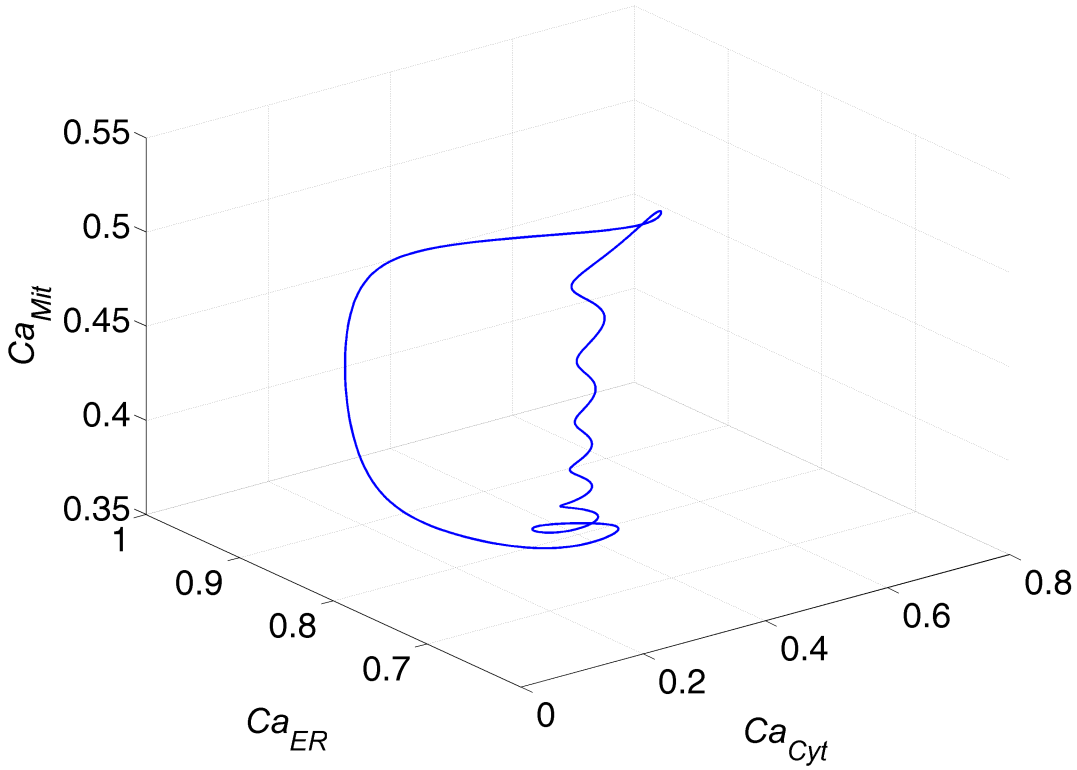
Przeprowadzone symulacje numeryczne wykazały istnienie nieregularnych rozwiązań periodycznych dla szerokiego zakresu parametru k_{MAM} (i innych parametrów jak w Tab. 4.2). Zauważmy, że ze względu na (5.2) i (5.3) zadając wartość parametr k_{MAM} jesteśmy w stanie wyznaczyć wartości parametrów k_{MAM2} i k_{MAM8}. Parametr k_{MAM} w dalszych rozważaniach będzie parametrem bifurkacyjnym. Jak już wspominaliśmy, w odróżnieniu od Modelu #1, w Modelu #2 nie występują quasi-periodyczne rozwiązania chaotyczne. Wydaje się, że przyczyną tego stanu rzeczy jest inna postać przepływu J_{out} danego przez (4.35), który w tym przypadku nie zależy od stężenia jonów wapnia w cytozolu. Oscylacje nieregularne mają dla większości rozpatrywanych zestawów parametrów stosunkowo duży basen przyciągania, jednak, wraz ze wzrostem współczynnika k_{MAM}, większość trajektorii układu (4.22)–(4.26) przyciągana jest przez stabilny punkt stacjonarny P.

Oscylacje stężeń jonów wapnia

Oscylacje stężeń wolnych jonów wapnia typu „bursting" w poszczególnych kompartmentach oraz czasowy przebieg stężenia uwapniowanych buforów w cytozolu ($CaPr$) zostały przedstawione na Ryc. 5.15. Odpowiadający tym oscylacjom portret fazowy w przestrzeni Ca_{Cyt}, Ca_{Mit}, Ca_{ER} pokazany jest na Ryc. 5.16. Parametry, dla których istnieją tego typu rozwiązania oscylacyjne przedstawiono w Tab. 4.2. Oscylacje te charakteryzują się powolnym wypływem jonów wapnia z kompartmentu mitochondrialnego oraz szybką wymianą jonów wapnia pomiędzy cytozolem i ER.



Rycina 5.15: Trajektorie oscylacji wapniowych, zmiany stężenia wapnia w poszczególnych kompartmentach: gwałtowne oscylacje typu „bursting”



Rycina 5.16: Trójwymiarowy portret fazowy oscylacji typu „bursting”. Wszystkie parametry tak jak w Tab. 4.2

Analiza pojedynczego cyklu oscylacji typu „bursting"

Pojedynczy okres oscylacji nieregularnych typu „bursting", dla zestawu parametrów jak w Tab. 4.2, przedstawiono na Ryc. 5.17. Każdy cykl może być podzielony na trzy fazy. Faza I - zaczyna się, gdy poziom wapnia w cytozolu (Ca_{Cyt}) osiąga wartość maksymalną ($t = 4.4$ s) i trwa do czasu aż poziom wapnia w mitochondriach (Ca_{Mit}) osiągnie wartość maksymalną ($t = 4.8$ s). W tej fazie wiodącymi procesami są: uwalnianie wolnych jonów wapnia z retikulum oraz znaczny pobór Ca^{2+} przez mitochondria i buforowanie poprzez białka cytozolu.

W fazie drugiej aktywowany jest powolny strumień jonów wapnia z mitochondriów do cytozolu. Większość uwolnionych jonów wapnia związana jest z cytozolicznymi białkami buforującymi. Ważnym procesem, zachodzącym w tej fazie jest szybka wymiana wapnia pomiędzy cytozolem i ER, co prowadzi do małych, szybkich drgań stężenia wapnia w tych kompartmentach. Ten etap kończy się, gdy poziom wapnia buforowanego ($CaPr$) osiąga wartość maksymalną (tj. dla $t = 18.1$ s).

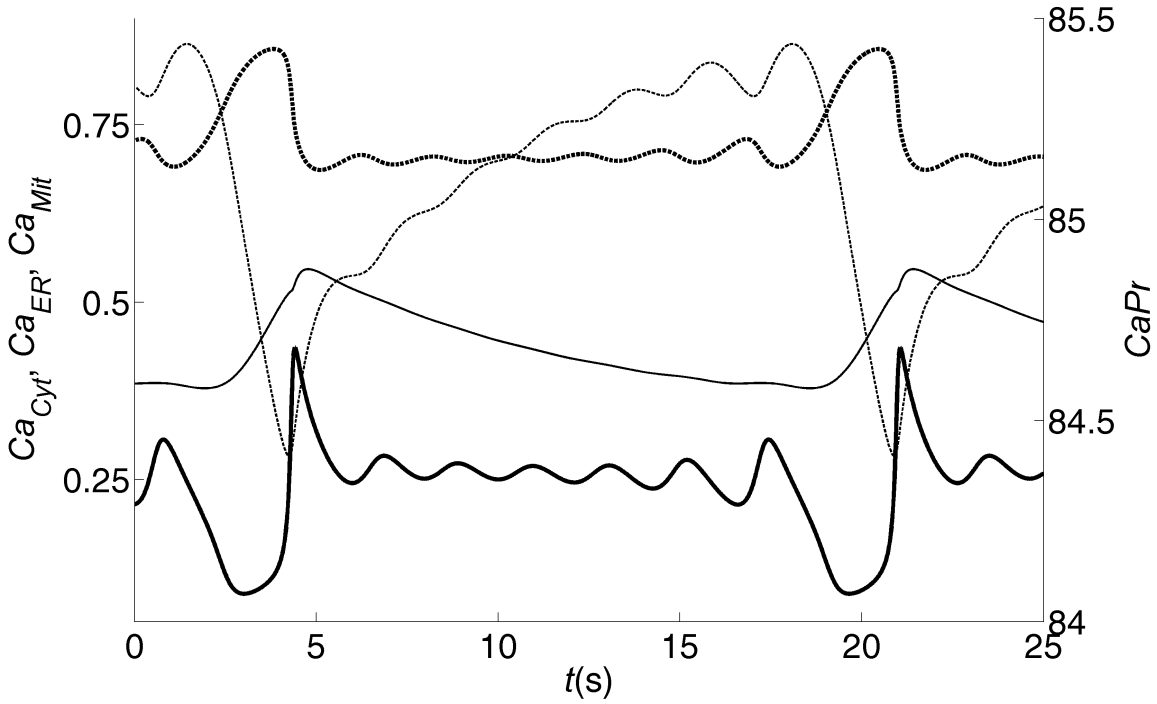
W fazie III, wiodącym procesem jest dysocjacja kompleksów białkowo-wapniowych. Mitochondria i ER są "ładowane", podczas gdy poziom wapnia w cytozolu najpierw zmniejsza się, a następnie wzrasta, aby osiągnąć maksymalną wartość, która wyznacza koniec III fazy ($t = 21.05$ s).

Cały okres trwa 16.65 sekundy, a stężenia wolnych jonów wapnia w poszczególnych kompartmentach wahają się w przedziałach: (0.089, 0.44) dla Ca_{Cyt}, (0.69, 0.86) dla Ca_{ER}, (0.38, 0.55) dla Ca_{Mit} oraz (84.4, 85.4) dla $CaPr$.

Powyższe przebiegi czasowe częściowo przypominają wyniki pomiarów opisanych w [136] po aktywacji histaminą, mimo że w [136] autorzy brali pod uwagę oscylacje, które miały tendencje zanikowe, w wyniku czego ustalał się nowy stan równowagi. W eksperymentach przeprowadzonych przez [136] pik stężenia wapnia cytozolicznego (Ca_{Cyt}) poprzedzał pik stężenia wapnia mitochondrialnego (Ca_{Mit}), oraz minimum wapnia retikularnego (Ca_{Er}), tak jak w prezentowanym powyżej modelu. Podobne były też minima i maksima przebiegów czasowych stężeń jonów wapnia. Kolejnym podobieństwem pomiędzy pomiarem eksperymentalnym, a oscylacjami przedstawionymi na Ryc. 5.17, jest prosty, liniowy, spadek stężenia jonów wapnia w mitochondriach w odróżnieniu od oscylacyjnego spadku jonów wapnia w cytozolu (składowa o niskiej amplitudzie i wysokiej częstotliwości widoczna na Ryc. 5.17 między $t \cong 6$ i $t \cong 18$ sekundą). Dodatkowo profil przebiegów czasowych i poziom stężeń jonów wapnia w cytozolu na Ryc. 5.17 podobne są do wykresu danych eksperymentalnych przedstawionego na Ryc. 1 w pracy [29].

Przepływy domitochondrialne

Przepływy przez struktury MAM mogą stanowić istotny czynnik wpływający na dynamikę przedstawionego w tym rozdziale modelu. W celu weryfikacji powyższej



Rycina 5.17: Przebiegi czasowe stężeń jonów wapnia w cytozolu, retikulum i mitochondriach dla jednego okresu oscylacji. Ca_{Cyt} - gruba, ciągła linia, Ca_{Mit} - cienka, ciągła linia, Ca_{ER} - gruba, przerywana linia, $CaPr$ - cienka, przerywana linia.

hipotezy przeprowadziliśmy porównanie przepływów mitochondrialnych J_{in} i J_{MAM} (Ryc. 5.15 - lewy panel).

Pomimo, że przepływ J_{in} charakteryzuje się nieznacznie wyższą wartością maksymalną, to całkowity przepływ jonów wapniowych przez struktury MAM jest większy. Całkowity przepływ przez struktury MAM wynosił

$$\int_t^{t+T} J_{MAM}(s)\,ds = 3.55$$

w trakcie jednego okresu równego $T = 16.65$ s i przewyższał przepływ przez uniportery usytuowane poza MAM

$$\int_t^{t+T} J_{in}(s)\,ds = 0.37$$

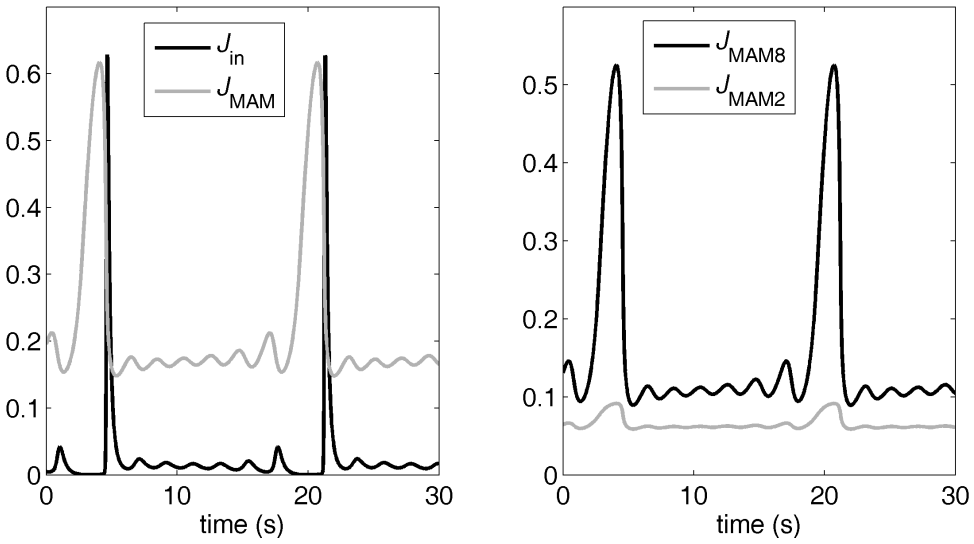
. Prawy panel pokazuje dwie składowe wpływu wapnia do mitochondrium wewnątrz struktur MAM, które odpowiadają dwóm modułom pracy uniportera: trybowi normalnemu - J_{MAM2} oraz trybowai RaM - J_{MAM8}, które zdefiniowane zostały w równaniu (4.33). Maksymalne wartości przepływu J_{MAM2} są mniejsze od maksymalnych wartości przepływu J_{MAM8}, a całkowity przepływ w trybie normalnym

$$\int_t^{t+T} J_{MAM2}(s)\,ds = 1.08$$

okazał się być znacznie mniejszy od całkowitego przepływu w trybie RaM

$$\int_t^{t+T} J_{MAM8}(s)\,ds = 2.47$$

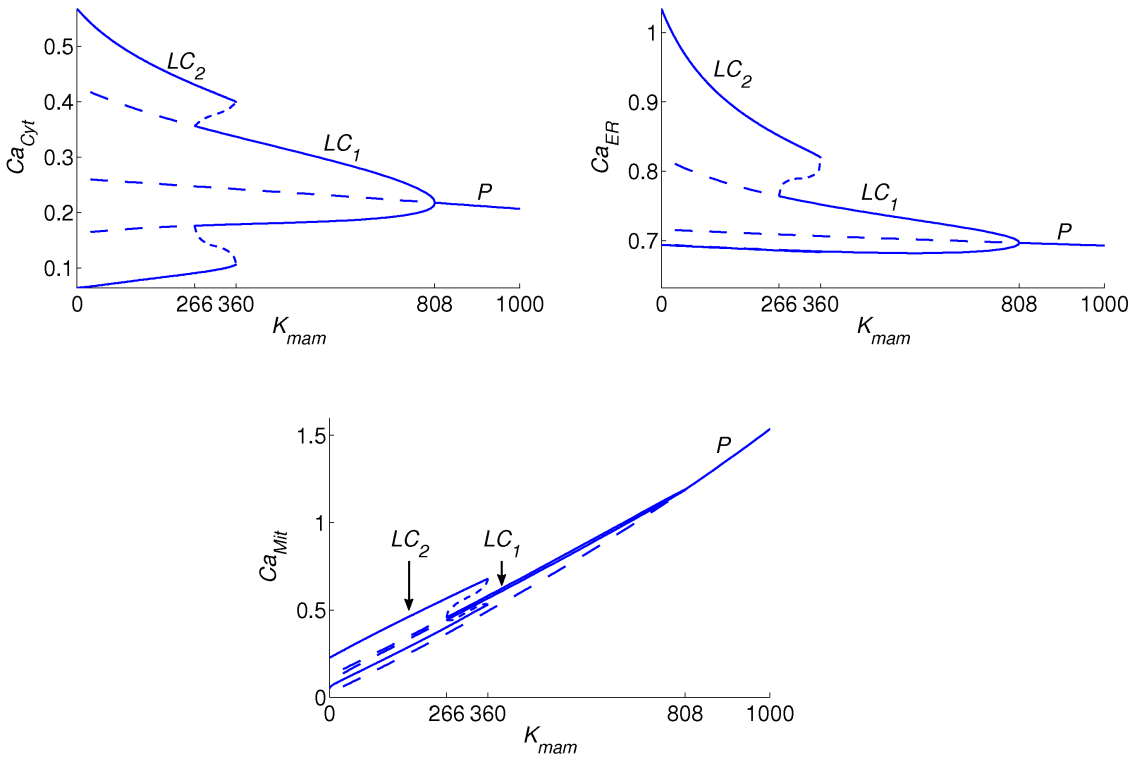
Słuszną wydaje się więc konkluzja, że przepływ jonów wapniowych przez struktury MAM w trybie szybkiego poboru jest istotny w kształtowaniu oscylacji stężeń jonów Ca^{2+}.



Rycina 5.18: Przebiegi czasowe mitochondrialnych przepływów wapnia dla oscylacji typu „bursting" (parametry jak w Tab. 4.2). Lewy panel $J_{in} = J_{in2} + J_{in8}$ i $J_{MAM} = J_{MAM2} + J_{MAM8}$. Prawy panel J_{MAM2} and J_{MAM8}. Wyniki całkowania po jednym okresie ($T \approx 16.65$s) wynoszą: $\int_t^{t+T} J_{in}(s)\,ds = 0.37$, $\int_t^{t+T} J_{MAM}(s)\,ds = 3.35$, $\int_t^{t+T} J_{MAM2}(s)\,ds = 1.08$ oraz $\int_t^{t+T} J_{MAM8}(s)\,ds = 2.47$.

5.3.2 Wpływ k_{MAM} na stężenia jonów wapniowych, cykle graniczne i stany stacjonarne

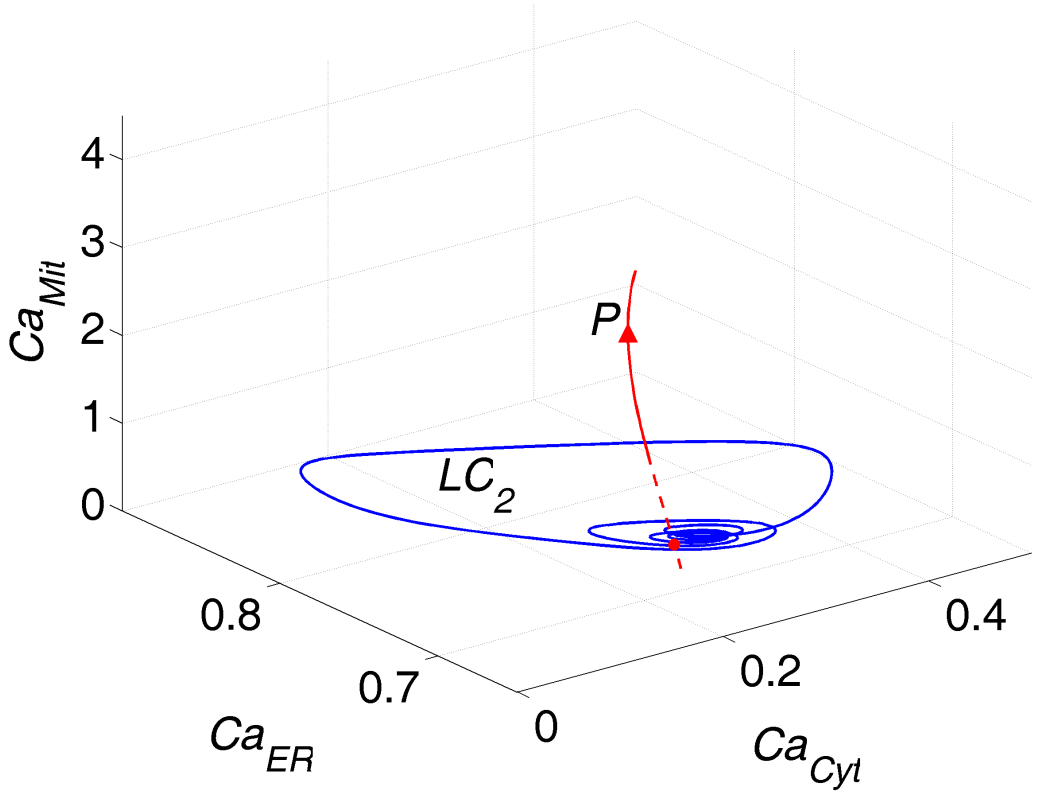
Na Ryc. 5.19 widoczne są diagramy bifurkacyjne dla rozwiązań układu (4.22)–(4.26) reprezentowanych przez Ca_{Cyt} (lewy, górny panel), Ca_{ER} (prawy, górny panel) oraz Ca_{Mit} (dolny panel), z k_{MAM} jako parametrem bifurkacyjnym (i innymi parametrami jak w Tab. 4.2). Linia ciągła oznacza rozwiązania stabilne, natomiast linia przerywana rozwiązania niestabilne. Z diagramów tych wynika, że dla $k_{MAM} \in [0, 1000]$ istnieje dokładnie jeden punkt stacjonarny P, który jest stabilny dla $k_{MAM} > 808$, natomiast niestabilny dla $k_{MAM} \in [0, 808]$. Dla $k_{MAM} = 808$ zachodzi bifurkacja typu Hopfa i dla $k_{MAM} < 808$ istnieje cykl graniczny LC_1. LC_1 jest stabilny w przedziale $k_{MAM} \in [266, 808]$ i niestabilny dla $k_{MAM} \in [0, 266]$. Dla wartości $k_{MAM} = 266$ następuje rozgałęzienia się cykli granicznych LC_1 i nowego cyklu LC_2. Niestabilne rozwiązanie periodyczne, łączące LC_1 z LC_2, widoczne na Ryc. 5.19 jest hipotetycznym dopełnieniem do części rozwiązań znalezionych metodami numerycznymi. Cykl graniczny LC_2 zachowuje stabilność dla $k_{MAM} \in [0, 360]$.



Rycina 5.19: Diagram bifurkacyjny: Ca_{Cyt} (górny, lewy panel), Ca_{ER} (górny, prawy) oraz Ca_{Mit} (dolny panel) z $k_{MAM} \in [0, 1000]$ jako parametrem bifurkacyjnym. Pozostałe parametry jak w Tab. 4.2. Punkt stacjonarny P jest stabilny dla $k_{MAM} > 808$. Dla $k_{MAM} = 808$ zachodzi bifurkacja typu Hopfa i pojawia się cykl graniczny LC_1 stabilny dla $k_{MAM} \in [266, 808]$. LC_1 traci stabilność dla $k_{MAM} < 266$. Dla $k_{MAM} < 360$ istnieje stabilny cykl graniczny LC_2. Linia ciągła oznacza rozwiązania stabilne, natomiast linia przerywana rozwiązania niestabilne.

Z Ryc. 5.19 wnioskujemy, że wzrost wartości parametru k_{MAM} powoduje zmniejszenie amplitudy oscylacji oraz podwyższenie minimalnej wartości Ca_{Mit}. Podobne wnioski „bifurkacyjne" są słuszne również dla innych wartości parametru $K_{4,8}$. Wynikają one z analizy Ryc. 5.21 z rozdziału 5.3.3. Np. dla $K_{4,8} = 1.5$ zmianie ulegają wartości parametru k_{MAM}, dla których dochodzi do bifurkacji typu Hopfa ($k_{MAM} = 238$) oraz rozgałęzienia cykli granicznych ($k_{MAM} = 80$).

Na Ryc. 5.20 widoczny jest stabilny cykl graniczny LC_2 dla $k_{MAM} = 250$, $K_3 = 3.5$ oraz pozostałych parametrów jak w Tab. 4.2 (niebieska krzywa). Krzywa czerwona przedstawia ścieżkę punktu stacjonarnego P dla $K_3 = 3.5$ i k_{MAM} z przedziału [0,2000]. Linia ciągła krzywej czerwonej odpowiada stabilnym stanom stacjonarnym ($k_{MAM} > 864$), natomiast linia przerywana odpowiada stanom niestabilnym. Strzałka wskazuje kierunek wzrostu wartości parametru k_{MAM}. Czerwony punkt widoczny na wykresie przedstawia punkt stacjonarny dla wartości $k_{MAM} = k_{MAM2} + k_{MAM8} = 50 + 200 = 250$ (tak jak w referencyjnym zestawie parametrów podanym w Tab. 4.2). Dla $k_{MAM} > 864$



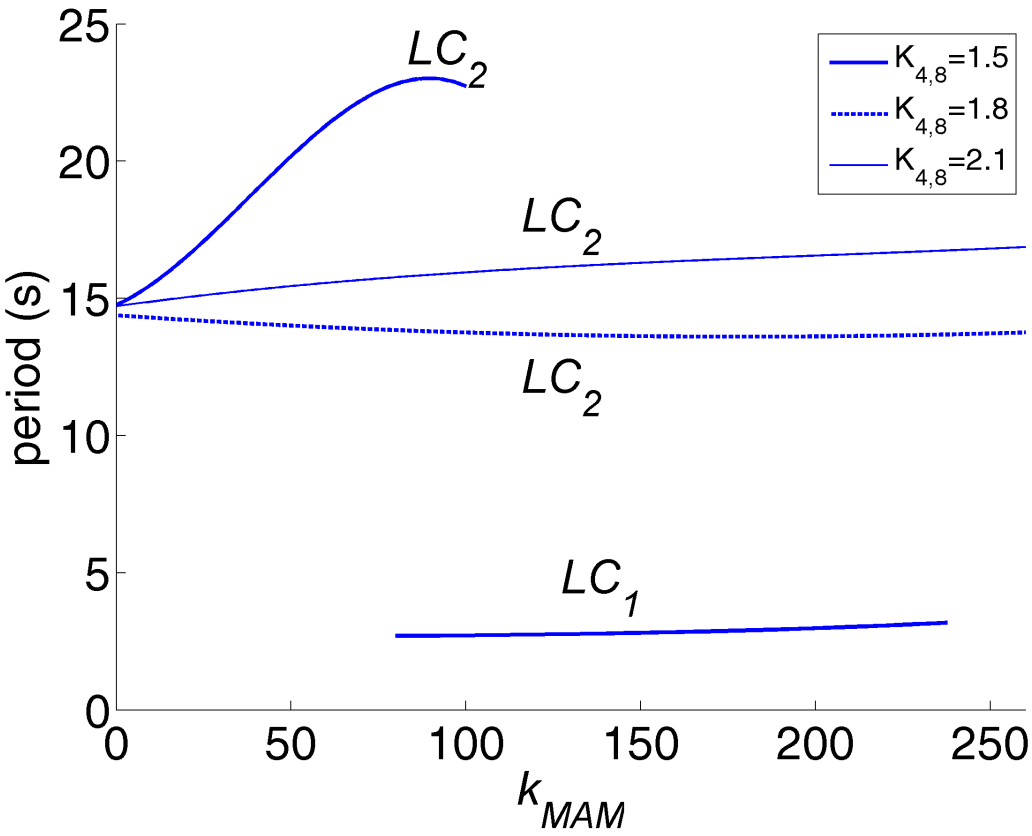
Rycina 5.20: Portret fazowy 3-D oscylacji typu „bursting" dla $K_3 = 3.5$ i pozostałych parametrach jak w Tab. 4.2 i „ścieżka" stanu stacjonarnego dla $k_{MAM} \in [0, 2000]$. Kierunek wzrostu wartości parametru k_{MAM} oznaczono strzałką. Linia przerywana oznacza niestabilne stany stacjonarne, linia pełna - stabilne. Bifurkacja Hopfa zachodzi dla $k_{MAM} = 864$ i jest oznaczona jako pogrubiony punkt.

stabilny punkt stacjonarny P jest jedynym atraktorem układu, tak więc wszystkie trajektorie zbiegają do niego asymptotycznie w czasie. Punkt ten charakteryzuje się wysoką, rosnącą wraz z k_{MAM} wartością Ca_{Mit}. Np. dla $k_{MAM} = 1000$ $Ca_{Mit} = 1.84$, natomiast dla $k_{MAM} = 2000$ $Ca_{Mit} = 4.24$. Zatem odpowiednio duży przepływ przez struktury MAM (odpowiadający dużym wartościom parametru k_{MAM}) wymusza przejście systemu do stanu, w którym wapń akumulowany jest w kompartmencie mitochondrialnym, co stanowi początkowy etap procesu apoptozy. Zagadnienie to zostanie opisane w Rozdz. 5.4.

5.3.3 Wpływ współczynnika k_{MAM} na okres oscylacji

W niniejszym rozdziale badamy wpływ parametrów $K_{4,8}$ i k_{MAM} na okres oscylacji. Ze względu na fakt, iż niestabilne rozwiązania periodyczne nie mają znaczenia z biologicznego punktu widzenia, analizę ograniczamy do stabilnych „odcinków" cykli granicznych LC_1 i LC_2. Wybrane wartości parametrów to: $K_{4,8} = 1.5, 1.8$ i 2.1 oraz $0 \leq k_{MAM} \leq 260$. Ze względu na inne wartości parametru $K_{4,8}$ w stosunku do

przypadku analizowanego na Ryc 5.19 obszary k_{MAM}, dla których cykle graniczne LC_1 i LC_2 są stabilne różnią się od obszarów widocznych na tej rycinie.



Rycina 5.21: Wykres stabilnych oscylacji jako funkcja parametrów k_{MAM} i $K_{4,8}$. Pozostałe parametry jak w Tab. 4.2.

Wyniki analizy przedstawiono na Ryc. 5.21. Dla $K_{4,8} = 2.1$ okres jest niemal stały i zmienia się z 14.7 (dla $k_{MAM} = 0$) do 16.9 (dla $k_{MAM} = 260$). Podobnie dla $K_{4,8} = 1.8$ okres jest prawie stały i maleje z 14.4 (dla $k_{MAM} = 0$) do 13.8 (dla $k_{MAM} = 260$). Dla tych wartości parametru $K_{4,8}$ cykl graniczny LC_1 jest niestabilny dla $k_{MAM} < 260$, dlatego też nie uwzględniliśmy okresów dla tego cyklu granicznego w podanym wcześniej przedziale k_{MAM} na rycinie.

Dla $K_{4,8} = 1.5$ zachowanie modelu zmienia się drastycznie. Okres oscylacji LC_2 wzrasta silnie od 14.8 s (dla $k_{MAM} = 0$) do 22.7 s (dla $k_{MAM} = 100$). Przy wartości $k_{MAM} \approx 100$ okres stabilnych oscylacji maleje do 2.7. Spowodowane jest to tym, iż dla tej wartości k_{MAM} cykl graniczny LC_2 traci stabilność. Cykl graniczny LC_1 istnieje dla $k_{MAM} \leq 238$ i zachowuje stabilność dla $k_{MAM} \geq 80$.

5.3.4 Podsumowanie dotyczące Modelu #2

Zaproponowaliśmy nowy model wewnątrzkomórkowych oscylacji stężeń jonów wapnia, który bierze pod uwagę istnienie kompleksów błonowych pomiędzy mitochondriami

oraz ER (tzw. MAM). Stanowią one miejsca kontaktu obu organelli. Model ten stanowi modyfikację wcześniejszego modelu [183]. Modyfikacje polegały na wprowadzeniu bezpośredniego przepływu jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego do mitochondriów w postaci przepływu J_{MAM}. W stosunku do Modelu #1 rozpatrzyliśmy dokładniejsze postaci przepływów J_{MAM} i J_{in} (4.33), (4.34). W obu przepływach uwzględniliśmy zatem dwie składowe wpływu wapnia do mitochondrium, które odpowiadają modułom pracy uniportera: trybowi normalnemu oraz trybowi RaM. Zmodyfikowany został również przepływ J_out, który w pracy [183] oraz w Modelu #1, zależy od cytozolicznego stężenia jonów wapnia Ca_{Cyt} (4.21). W Modelu #2 funkcja opisująca przepływ J_{out} bazuje na [177, 188] i zamieszczonych tam referencjach. W Modelu #2 wypływ jonów wapnia z mitochondriów opisany równaniem (4.35) zależy wyłącznie od stężenia tych jonów w przedziale mitochondrialnym (Ca_{Mit}). To zasadnicza różnica pomiędzy Modelem #2, a Modelem #1, która powoduje, że układ nie jest w stanie generować rozwiązań chaotycznych.

Zbadaliśmy numerycznie wpływ struktur MAM na okres i profil przebiegów czasowych rozwiązań periodycznych. Symulacje numeryczne wykazały istnienie wyłącznie oscylacji typu „bursting". Zbadaliśmy również wpływ parametru k_{MAM} na rozwiązania periodyczne i punkty stacjonarne. Wykazaliśmy, że dla pewnych wartości parametru $K_{4,8}$ istnieją przedziały k_{MAM}, dla których współistnieją dwa cykle graniczne LC_1 i LC_2, różniące się amplitudą i okresem oscylacji. Cykl graniczny LC_1 o mniejszym okresie i mniejszej amplitudzie oscylacji staje się stabilny dla odpowiednio wysokich wartości parametru k_{MAM}. Ostatecznie dla odpowiednio wysokich wartości k_{MAM} rozwiązania periodyczne zanikają, a większość trajektorii przyciągana jest przez stabilny punkt stacjonarny P, charakteryzujący się wysokim poziomem jonów wapnia w mitochondriach (Ryc. 5.20). Wejście układu na jedną z takich trajektorii może być interpretowane jako początek procesu apoptozy.

5.4 Scenariusz apoptozy

Mitochondria pełnia kluczową rolę w procesie apoptozy, są też kluczowymi organellami utrzymującymi homeostazę wapniową w komórce. Zgodnie z przyjętym modelem szlaku wewnętrznego apoptozy, jednym z najważniejszych i koniecznych zdarzeń W trakcie realizacji programowanej śmierci jest uwolnienie cytochromu C z przestrzeni perymitochondrialnej. W tym celu musi dojść do fragmentacji zewnętrznej błony mitochondrialnej [282]. Zgodnie z tą teorią jony (w tym jony wapnia), przedostające się do matriks mitochondriów, zwiększają ciśnienie osmotyczne w matrix, powodując przepływ cząsteczek wody w kierunku bardziej stężonego roztworu, powodując wzrost objętości organelli, potocznie nazywany „pęcznieniem mitochondriów". Ponieważ wewnętrzna błona mitochondrialna posiada szereg wpukleń (tzw. grzebieni mitochondrialnych), jej powierzchnia jest kilkakrotnie większa od powierzchni błony zewnętrznej

(por. B). Rozszerzanie się wewnętrznej błony w wyniku zwiększenia objętości matriks może prowadzić do utraty ciągłości zewnętrznej błony mitochondrialnej.

W niniejszej pracy wykazaliśmy, że dla specyficznego zestawu parametrów oba modele pozwalają na wygenerowanie takiego stanu badanego systemu, który charakteryzuje się wysokim stężeniem jonów wapnia w kompartmencie mitochondrialnym.

W **Modelu #1** dla $k_{ch} = 2950$ i $k_{MAM} \leq 101$ oraz $k_{ch} = 4100$ i $k_{MAM} < 1649$ istnieje stabilny cykl graniczny lub chaotyczne trajektorie, charakteryzujące się dużym basenem przyciągania. Zachowania układu zmieniają się jednak wraz ze wzrostem wartości k_{MAM}, która charakteryzuje wielkość przepływu jonów Ca^{2+} przez interfejs MAM. Dla współczynników $k_{ch} = 2950$ i $k_{MAM} \geq 102$ oraz $k_{ch} = 4100$ i $k_{MAM} \geq 1649$ większość trajektorii zbiega do punktu stacjonarnego, który charakteryzuje się bardzo wysokim stężeniem jonów wapnia w mitochondrium ($Ca_{Mit} > 18\mu$M – punkt P_1 na Ryc. 5.13).

W **Modelu #2** (dla $k_{MAM} > 864$) oraz $K_3 = 3.5$ istnieje stabilne rozwiązanie - punkt P, które charakteryzuje się wysokim stężeniem jonów wapniowych w przedziale mitochondrialnym (Ryc. 5.20). Dla $k_{MAM} > 864$ punkt P jest jedynym atraktorem systemu, tak więc wszystkie trajektorie zbiegają do tego stabilnego stanu stacjonarnego. Punkt ten charakteryzuje się wysoką i rosnącą wartością Ca_{Mit}, która rośnie wraz ze wzrostem wartości parametru k_{MAM}. Np. dla $k_{MAM} = 1000$ $Ca_{Mit} = 1.84$, natomiast dla $k_{MAM} = 2000$ $Ca_{Mit} = 4.24$.

W każdym z opisanych modeli wykazaliśmy, że zwiększanie przepływu jonów wapnia przez struktury MAM poprzez manipulację parametrem k_{MAM} doprowadza do zaniku stabilnych rozwiązań oscylacyjnych, w wyniku czego w systemie występuje tylko jedno rozwiązanie stabilne - punkt stacjonarny o wysokim stężeniu jonów wapniowych w kompartmencie mitochondrialnym.

Jak wiadomo, podwyższenie poziomu wapnia w mitochondriach towarzyszy początkowym etapom procesu apoptozy 1.4. Gromadzenie się jonów Ca^{2+} może wynikać ze zwiększonego przepływu jonów wapniowych do mitochondrium z ER poprzez struktury MAM. Dane eksperymentalne wskazują, że wiele czynników stresogennych wpływa na ekspresję białek związanych z powstawaniem połączeń pomiędzy mitochondriami i ER. Park i współpracownicy wykazali, że stres cieplny powoduje wzrost ilości transkryptów kalretikuliny (bufora wapniowego) [210]. Także szereg innych białek retikularnych, współtworzących struktury MAM, takich jak erp44, hsp90, grp94, grp75 czy receptor sigma-1 podlegać może nadekspresji, w wyniku działania różnych czynników stresogennych (m.in. stres oksydacyjny, niedoboru związków odżywczych, stres cieplny lub wywołany specyficznym ligandem) [8, 80, 126]. Nie tylko czynniki związane ze stresem mają wpływ na ilość struktur MAM. Ilość miejsc kontaktu regulować mogą także białka modulujące kształt mitochondriów np. mitofuzyna-1 lub mitofuzyna-2. Doświadczenia ze zmutowanymi liniami komórkowymi, które charakteryzowały się brakiem mitofuzyny-2 (MFN-2 $^{-/-}$), wykazały że komórki MFN-2 $^{-/-}$ posiadały aż 40%

mniej połączeń pomiędzy ER i mitochondriami, co miało duży wpływ na transport wapnia do mitochondriów. Z kolei nadekspresja mitofuzyny-2 i zwiększenie połączeń ER-Mit jest wystarczające do wywołania apoptozy w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych [119]. Dodatkowo ekspozycja na intensywny stres cieplny wywołuje wzmożoną glikozylację białek chaperonowych (w tym kalretikuliny) [139]. Glikozylacja powoduje powstawanie bardziej stabilnych kompleksów białkowych, wliczając w to białka budujące MAM [195]. Ponieważ chaperony ER są niezbędne do prawidłowego przepływu jonów wapnia z ER do mitochondrium, stabilizacja połączeń powoduje, że mitochondria są w stanie przyjąć znaczne ilości jonów wapnia. Krótkotrwały stres i przepływ wapnia do mitochondriów może mieć działanie anty-apoptotyczne. W przypadku, kiedy podwyższony poziom jonów wapnia w mitochondriach utrzymuje się przez relatywnie długi czas, może to skutkować „pęcznieniem mitochondriów", co z kolei może prowadzić do wejścia komórki na szlak apoptotyczny (uwolnienie cytochromu C, AIF, aktywacja kaspazy-9) [101, 122, 230].

Rozdział 6

Podsumowanie

Zasadniczym celem poniższej pracy jest analiza oscylacji stężeń jonów wapnia w komórce eukariotycznej. Dokładniej, przedmiotem naszego zainteresowania jest czasowe zachowanie się stężeń niezwiązanych jonów wapnia w trzech kompartmentach komórki: cytozolu, retikulum cytoplazmatycznym oraz mitochondriach ze szczególnym uwzględnieniem obszarów bliskiego kontaktu pomiędzy retikulum endoplazmatycznym (ER) a mitochondriami. Obszary te określane są jako obszary MAM (od pierwszych liter określenia w języku angielskim: Mitochondria Associated Membrane Complexes).

Podstawą całokompartmentowych modeli oscylacji stężeń niezbuforowanych jonów wapnia jest założenie, że stężenia te wyrównują się dostatecznie szybko w ramach danego kompartmentu, tak że ich przestrzenne rozkłady w danej chwili czasu można zastąpić przez rozkłady uśrednione (po danym kompartmencie). Jest to założenie upraszczające, jednak bardzo często przyjmowane w literaturze [13, 29, 105, 183, 257]. Dla kompartmentu cytozolicznego można je częściowo uzasadnić przyjmując, że efektywny współczynnik dyfuzji jonów wapniowych jest dostatecznie duży. W przypadku dwu pozostałych kompartmentów sytuacja jest bardziej skomplikowana, gdyż tworzą one skomplikowane struktury geometryczne, nierzadko podzielone na rozseparowane podstruktury, pomiędzy którymi nie może następować swobodna wymiana jonów wapnia. (Dodatkową komplikacją, jaka pojawia się przy rozpatrywaniu struktur typu MAM jest fakt, że są one rozłożone niejednorodnie w obszarze komórki.) Można jednak założyć, że dla interesujących nas rozwiązań oscylacyjnych wyrównywanie się stężeń w retikulum cytoplazmatycznym i mitochondriach dokonuje się na skutek ich lokalnego dostosowania się do jednorodnego przestrzennie stężenia jonów wapniowych w cytozolu. Dlatego też, pozostając na gruncie klasycznych modeli kompartmentalnych, zakładamy, że wewnątrz danego kompartmentu stężenie jonów wapniowych jest jednorodne przestrzennie.

Punktem startowym do przedstawionych w Rozdziale 4 **Modelu #1** oraz **Modelu #2** jest trójkompartmentowy model dynamiki jonów wapnia z pracy [183]. Modele te, zadane poprzez układy równań różniczkowych zwyczajnych, abstrahują od przestrzennego rozkładu struktur typu MAM i uwzględniają je poprzez wprowadzenie bezpośrednich przepływów pomiędzy mitochondrium a retikulum cytoplazmatycznym.

Wprowadzenie powyższych przepływów nie wynika jedynie z niemożności uwzględnienia geometrii rozmieszczenia obszarów typu MAM, ale ma również swoje podłoże biologiczne. Każdy z nich stanowi bowiem sam w sobie strukturę niemalże zamkniętą, z której wypływ jonów wapniowych jest istotnie utrudniony.

W Rozdziale 1 opisane zostały komórkowe mechanizmy kontrolujące stężenia jonów wapniowych w poszczególnych kompartmentach, ze szczególnym uwzględnieniem kanałów, pomp i wymienników wapniowych w retikulum endoplazmatycznym i w mitochondriach. Opisana została również struktura kompleksów mitochondrialno-retikularnych MAM. Obszary te odkryto już w latach 70-tych, jednak dopiero od niedawna są one przedmiotem intensywnych badań eksperymentalnych. Badania za pomocą mikroskopii elektronowej, FRET i metod genetycznych pozwoliły na dokładne określenie struktury fizycznej oraz zidentyfikowanie komponent tworzących MAM. Odległość między błonami odgraniczającymi w kompleksie waha się od 10 - 30 nm. Tworzą one zatem fizyczne połączenia przypominające synapsy umożliwiające szybsze przekazywanie jonów wapnia z ER do mitochondriów i odwrotnie. Interfejs mitochondrialno-retikularny stabilizowany jest przez szereg protein, które w większości powiązane są z głównymi elementami przewodzącymi sygnał wapniowy w tych kompartmentach, tj. receptorem IP_3R, pompą wapniową SERCA oraz kanałem VDAC. Szacuje się, że w 80% przepływu jonów wapniowych pomiędzy mitochondrium a retikulum, odbywający się pośrednio przez cytozol, zachodzi poprzez obszary typu MAM [53, 182].

W Rozdziale 2 startując z matematycznego opisu czaso-przestrzennej dynamiki jonów wapnia w komórce wyrażonego w języku równań typu reakcji-dyfuzji na stężenia wolnych i zbuforowanych jonów wapnia, pokazujemy, jak przy założeniu odpowiednio dużych wartości współczynników dyfuzji, możemy otrzymać (asymptotycznie) układy równań różniczkowych zwyczajnych opisujących modele kompartmentowe. Pokazujemy też, jak przy założeniu dostatecznie szybkich reakcji przyłączania i odłączania jonów wapnia do miejsc buforujących w danym kompartmencie, równania różniczkowe na stężenia protein buforujących możemy aproksymować równaniami algebraicznymi, upraszczając tym samym istotnie matematyczną i numeryczna analizę układu. Tego rodzaju przybliżenia zostały zastosowane w zaproponowanych przez nas w Rozdziale 4 dwóch modelach kompartmentalnych mających na celu zbadanie wpływu obszarów typu MAM na oscylacje stężenia wapnia w komórce eukariotycznej. W rozdziale tym przedstawiamy również inny, bardzo istotny z fizjologicznego punktu widzenia, rodzaj czaso-przestrzennej dynamiki wapnia w komórkach - fale wapniowe. Sztandarowym przykładem tego rodzaju dynamiki są fale biegnące wapnia w komórkach mięśniowych. W Podrozdziale 3.2 przedstawiamy rezultaty pracy [143, 147, 148], dotyczącej fal biegnących wapnia w długich komórkach. Praca ta bierze również pod uwagę zjawisko generowania naprężeń mechanicznych w komórce poprzez lokalne odchylenia stężenia wapnia od stanu równowagowego, jak również zjawisko odwrotne, tzn. pozyskiwanie

wolnych jonów wapnia z magazynów retikularno-mitochondrialnych wskutek naprężeń mechanicznych.

Modele przedstawione w Rozdz. 4 opisane zostały w pracach [77, 267], które opisują dwa modele ewolucji uśrednionego stężenia jonów wapnia w trójkompartmentowym opisie komórki eukariotycznej. Jak już wspominaliśmy, celem obydwu modeli jest uwzględnienie połączeń między siateczką śródplazmatyczną a mitochondriami, których istnienie pozwala na prawie bezpośredni przepływ jonów wapnia pomiędzy tymi organellami. Punktem wyjścia do budowy tych modeli jest model przedstawiony w pracy [183]. W Modelu #1 modyfikacje w stosunku do modelu z pracy Marhla polegają na wprowadzeniu bezpośrednich przepływów mitochondrialno-retikularnych i zmianie niektórych parametrów układu. Wprowadzenie powyższych przepływów regularyzuje dynamikę układu: dla dostatecznie dużych wartości współczynnika k_{MAM}, określającego natężenie przepływów jonów wapnia poprzez interfejsy MAM, quasi-periodyczne rozwiązania chaotyczne, będące charakterystyczną cechą modelu Marhla, przestają istnieć i ustępują miejsca oscylacjom typu „bursting", bądź też oscylacjom regularnym. Bezpośrednie przepływy retikularno-mitochondrialne zmieniają również efektywny okres oscylacji wapniowych. Okazuje się, że okres ten rośnie ze wzrostem wartości współczynnika k_{MAM}. Wprowadzenie przepływów retikularno-mitochondrialnych zmienia również jakościowo koegzystencję różnych typów rozwiązań układu. W przeciwieństwie do układu z pracy Marhla, oprócz stabilnych rozwiązań oscylacyjnych, układ posiada też trzy rozwiązania stacjonarne, z których jedno jest stabilne. Wzrost wartości parametru k_{MAM} powoduje zwiększenie się wielkości basenu przyciągania wspomnianego rozwiązania stacjonarnego, przy jednoczesnym zmniejszaniu się basenu przyciągania stabilnego rozwiązania periodycznego. W rezultacie, dla bardzo dużych wartości k_{MAM} prawie wszystkie trajektorie układu są przyciągane przez stabilne rozwiązanie stacjonarne. Rozwiązanie to charakteryzuje się bardzo dużą wartością stężenia wolnych jonów wapnia w mitochondrium. Z drugiej strony wiadomo, że w początkowym stadium apoptozy komórek stężenia wapnia w mitochondrium istotnie wzrasta [35, 100, 231]. Tak więc, na gruncie przyjętego modelu, zjawiska prowadzące do zwiększenia efektywnego przepływu przez interfejs retikularno-mitochondrialny mogą prowadzić do apoptozy komórki.

W Modelu #2 zmodyfikowaliśmy dodatkowo wyrażenie opisujące wypływ jonów wapniowych z mitochondrium do postaci niezależnej od stężenia jonów wapniowych w cytozolu. Rozpatrzyliśmy też dwa możliwe mody pracy białka transportującego wapń do wnętrza mitochondrium - uniportera mitochondrialnego MICU: szybki mod RaM-owy (rapid uptake mode) realizujący się dla dostatecznie niskich wartości stężenia wapnia cytozolicznego oraz mod normalny. Obie te zmiany wpłynęły istotnie na strukturę rozwiązań rozpatrywanego układu. Dla wszystkich wartości k_{MAM} w układzie mamy przynajmniej jedno rozwiązanie stabilne. Dla k_{MAM} nie przekraczającego pewnej wartości progowej k_{MAMP} jest to stabilne rozwiązanie periodyczne (stabilny

cykl graniczny). Warto zauważyć, że w istocie rzeczy w Modelu #2 mamy do czynienia z dwoma stabilnymi cyklami granicznymi istniejącymi dla różnych wartości k_{MAM}, których okres wzrasta skokowo w punkcie bifurkacji wraz ze wzrostem k_{MAM}. Dla $k_{MAM} > k_{MAMP}$ wszystkie trajektorie układu są natomiast przyciągane przez stabilny punkt stacjonarny charakteryzujący się relatywnie dużą wartością stężenia wapnia w mitochondrium. Jak w Modelu #1 możemy zatem mówić, że proces inicjacji apoptozy komórki może być powiązany ze zwiększaniem się intensywności przepływów poprzez interfejsy MAM.

W Rozdziale 5 podajemy eksperymentalne argumenty przemawiające za przedstawioną powyżej ideą związku początkowego stadium apoptozy z drastycznym zwiększeniem przepływu wapnia przez obszary typu MAM na skutek rożnego rodzaju czynników stresogennych.

Bibliografia

[1] Aczél S., Kurka B., Hering S.: Mechanism of voltage- and use-dependent block of class A Ca^{2+} channels by mibefradil. *British journal of pharmacology*, 125(3):447–54, Paz. 1998.

[2] Adachi M., Imai K.: The proapoptotic BH3-only protein BAD transduces cell death signals independently of its interaction with Bcl-2. *Cell death and differentiation*, 9(11):1240–7, List. 2002.

[3] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, 2002.

[4] Alonso M. T., Villalobos C., Chamero P., Alvarez J., García-Sancho J.: Calcium microdomains in mitochondria and nucleus. *Cell calcium*, 40(5-6):513–25, 2006.

[5] Altimimi H. F., Schnetkamp P. P. M.: Na^+/Ca^{2+}-K^+ exchangers (NCKX): functional properties and physiological roles. *Channels (Austin, Tex.)*, 1(2):62–9, 2007.

[6] Alvarez J., Montero M.: Measuring $[Ca^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum with aequorin. *Cell calcium*, 32(5-6):251–60, Gru. 2002.

[7] Andrin C., Pinkoski M. J., Burns K., Atkinson E. A., Krahenbuhl O., Hudig D., Fraser S. A., Winkler U., Tschopp J., Opas M., Bleackley R. C., Michalak M.: Interaction between a Ca^{2+}-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. *Biochemistry*, 37(29):10386–94, Lip. 1998.

[8] Anelli T., Alessio M., Mezghrani A., Simmen T., Talamo F., Bachi A., Sitia R.: ERp44, a novel endoplasmic reticulum folding assistant of the thioredoxin family. *The EMBO journal*, 21(4):835–44, Luty 2002.

[9] Annunziato L., Pignataro G., Di Renzo G. F.: Pharmacology of brain Na^+/Ca^{2+} exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives. *Pharmacological reviews*, 56(4):633–54, Gru. 2004.

[10] Aritomi M., Kunishima N., Inohara N., Ishibashi Y., Ohta S., Morikawa K.: Crystal structure of rat Bcl-xL. Implications for the function of the Bcl-2 protein family. *The Journal of biological chemistry*, 272(44):27886–92, Paz. 1997.

[11] Arroyo G., Aldea M., Fuentealba J., Albillos A., García A. G.: SNX482 selectively blocks P/Q Ca^{2+} channels and delays the inactivation of Na^+ channels of chromaffin cells. *European journal of pharmacology*, 475(1-3):11–8, Sier. 2003.

[12] Ashby M. C., Craske M., Park M. K., Gerasimenko O. V., Burgoyne R. D., Petersen O. H., Tepikin A. V.: Localized Ca^{2+} uncaging reveals polarized distribution of Ca^{2+}-sensitive Ca^{2+} release sites: mechanism of unidirectional Ca^{2+} waves. *The Journal of cell biology*, 158(2):283–92, Lip. 2002.

[13] Atri a., Amundson J., Clapham D., Sneyd J.: A single-pool model for intracellular calcium oscillations and waves in the Xenopus laevis oocyte. *Biophysical journal*, 65(4):1727–39, Paz. 1993.

[14] Babcock D. F., Herrington J., Goodwin P. C., Park Y. B., Hille B.: Mitochondrial participation in the intracellular Ca^{2+} network. *The Journal of cell biology*, 136(4):833–44, Luty 1997.

[15] Babu Y. S., Bugg C. E., Cook W. J.: Structure of calmodulin refined at 2.2 A resolution. *Journal of molecular biology*, 204(1):191–204, List. 1988.

[16] Ban J., Eckhart L., Weninger W., Mildner M., Tschachler E.: Identification of a human cDNA encoding a novel Bcl-x isoform. *Biochemical and biophysical research communications*, 248(1):147–52, Lip. 1998.

[17] Bazil J. N., Dash R. K.: A minimal model for the mitochondrial rapid mode of Ca^{2+} uptake mechanism. *PloS one*, 6(6):e21324, Sty. 2011.

[18] Bear M. F., Connors B. W., Paradiso M. A.: *Neuroscience Exploring the Brain*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, wyd. 3, 2007.

[19] Beker F., Weber M., Fink R. H. a., Adams D. J.: Muscarinic and nicotinic ACh receptor activation differentially mobilize Ca^{2+} in rat intracardiac ganglion neurons. *Journal of neurophysiology*, 90(3):1956–64, Wrze. 2003.

[20] Berridge M.: *Cell Signalling Biology*. Portland Press Limited, London, wyd. 2, 2012.

[21] Berridge M. J.: Calcium microdomains: organization and function. *Cell calcium*, 40(5-6):405–12, 2006.

[22] Berridge M. J.: Cell Signalling Biology: Module 1 - Introduction. *Cell Signalling Biology*, strony 1–63. Portland Press Limited, London, wyd. 2, Kwi. 2012.

[23] Berridge M. J.: Cell Signalling Biology: Module 2 - Cell signalling pathways. *Cell Signalling Biology*, strony 64–194. Portland Press Limited, London, wyd. 2, Kwi. 2012.

[24] Berridge M. J.: Cell Signalling Biology: Module 9 - Cell Cycle and Proliferation. *Cell Signalling Biology*, strony 623–665. Portland Press Limited, London, wyd. 2, Kwi. 2012.

[25] Bezzi P., Carmignoto G., Pasti L., Vesce S., Rossi D., Rizzini B. L., Pozzan T., Volterra A.: Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature*, 391(6664):281–5, Sty. 1998.

[26] Bindschadler M., Sneyd J.: A bifurcation analysis of two coupled calcium oscillators. *Chaos (Woodbury, N.Y.)*, 11(1):237–246, Mar. 2001.

[27] Bockstal V., Guirnalda P., Caljon G., Goenka R., Telfer J. C., Frenkel D., Radwanska M., Magez S., Black S. J.: T. brucei infection reduces B lymphopoiesis in bone marrow and truncates compensatory splenic lymphopoiesis through transitional B-cell apoptosis. *PLoS pathogens*, 7(6):e1002089, Czerw. 2011.

[28] Bonneau B., Prudent J., Popgeorgiev N., Gillet G.: Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: the calcium connection. *Biochimica et biophysica acta*, 1833(7):1755–65, Lip. 2013.

[29] Borghans J. M., Dupont G., Goldbeter a.: Complex intracellular calcium oscillations. A theoretical exploration of possible mechanisms. *Biophysical chemistry*, 66(1):25–41, Maj 1997.

[30] Bosanac I., Alattia J.-R., Mal T. K., Chan J., Talarico S., Tong F. K., Tong K. I., Yoshikawa F., Furuichi T., Iwai M., Michikawa T., Mikoshiba K., Ikura M.: Structure of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding core in complex with its ligand. *Nature*, 420(6916):696–700, Gru. 2002.

[31] Brini M., Bano D., Manni S., Rizzuto R., Carafoli E.: Effects of PMCA and SERCA pump overexpression on the kinetics of cell Ca^{2+} signalling. *The EMBO journal*, 19(18):4926–35, Wrze. 2000.

[32] Brini M., Murgia M., Pasti L., Picard D., Pozzan T., Rizzuto R.: Nuclear Ca^{2+} concentration measured with specifically targeted recombinant aequorin. *The EMBO journal*, 12(12):4813–9, Gru. 1993.

[33] Buntinas L., Gunter K. K., Sparagna G. C., Gunter T. E.: The rapid mode of calcium uptake into heart mitochondria (RaM): comparison to RaM in liver mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, 1504(2-3):248–61, Kwi. 2001.

[34] Burgoyne R. D.: Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca^{2+} signalling. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(3):182–93, Mar. 2007.

[35] Calì T., Ottolini D., Brini M.: Mitochondrial Ca^{2+} and neurodegeneration. *Cell calcium*, 52(1):73–85, Lip. 2012.

[36] Campbell K., Swann K.: Ca^{2+} oscillations stimulate an ATP increase during fertilization of mouse eggs. *Developmental biology*, 298(1):225–33, Paz. 2006.

[37] Campbell R. L., Davies P. L.: Structure-function relationships in calpains. *The Biochemical journal*, 447(3):335–51, Gru. 2012.

[38] Catterall W. A., Perez-Reyes E., Snutch T. P., Striessnig J.: International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological reviews*, 57(4):411–25, Gru. 2005.

[39] Chang B. S., Kelekar A., Harris M. H., Harlan J. E., Fesik S. W., Thompson C. B.: The BH3 domain of Bcl-x(S) is required for inhibition of the antiapoptotic function of Bcl-x(L). *Molecular and cellular biology*, 19(10):6673–81, Paz. 1999.

[40] Chang H. Y., Yang X.: Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 64(4):821–46, Gru. 2000.

[41] Chao D. T., Korsmeyer S. J.: BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual review of immunology*, 16:395–419, Sty. 1998.

[42] Chaudhuri D., Sancak Y., Mootha V. K., Clapham D. E.: MCU encodes the pore conducting mitochondrial calcium currents. *eLife*, 2(i):e00704, Sty. 2013.

[43] Chelu M. G., Danila C. I., Gilman C. P., Hamilton S. L.: Regulation of ryanodine receptors by FK506 binding proteins. *Trends in cardiovascular medicine*, 14(6):227–34, Sier. 2004.

[44] Cheng E. H., Levine B., Boise L. H., Thompson C. B., Hardwick J. M.: Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature*, 379(6565):554–6, Luty 1996.

[45] Chepyzhov V. V., Vishik M. I.: *Attractors for Equations of Mathematical Physics*, wolumen American M. American Mathematical Society, Providence, 2002.

[46] Clapham D. E.: Calcium signaling. *Cell*, 131(6):1047–58, Gru. 2007.

[47] Cobbold P. H., Cuthbertson K. S., Goyns M. H., Rice V.: Aequorin measurements of free calcium in single mammalian cells. *Journal of cell science*, 61:123–36, Maj 1983.

[48] Cohen G. M.: Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical journal*, 326 (Pt 1:1–16, Sier. 1997.

[49] Conradt B., Horvitz H. R.: The C. elegans protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell*, 93(4):519–29, Maj 1998.

[50] Coombes S., Hinch R., Timofeeva Y.: Receptors, sparks and waves in a fire-diffuse-fire framework for calcium release. *Progress in biophysics and molecular biology*, 85(2-3):197–216, 2004.

[51] Csordás G., Golenár T., Seifert E. L., Kamer K. J., Sancak Y., Perocchi F., Moffat C., Weaver D., de la Fuente Perez S., Bogorad R., Koteliansky V., Adijanto J., Mootha V. K., Hajnóczky G.: MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter. *Cell metabolism*, 17(6):976–87, Czerw. 2013.

[52] Csordás G., Renken C., Várnai P., Walter L., Weaver D., Buttle K. F., Balla T., Mannella C. a., Hajnóczky G.: Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *The Journal of cell biology*, 174(7):915–21, Wrze. 2006.

[53] Csordás G., Thomas a. P., Hajnóczky G.: Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *The EMBO journal*, 18(1):96–108, Sty. 1999.

[54] Csordás G., Várnai P., Golenár T., Roy S., Purkins G., Schneider T. G., Balla T., Hajnóczky G.: Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Molecular cell*, 39(1):121–32, Lip. 2010.

[55] Czabotar P. E., Colman P. M., Huang D. C. S.: Bax activation by Bim? *Cell death and differentiation*, 16(9):1187–91, Wrze. 2009.

[56] Dash R. K., Beard D. a.: Analysis of cardiac mitochondrial Na^{+}-Ca^{2+} exchanger kinetics with a biophysical model of mitochondrial Ca^{2+} handling suggests a 3:1 stoichiometry. *The Journal of physiology*, 586(13):3267–85, Lip. 2008.

[57] Dash R. K., Qi F., Beard D. a.: A biophysically based mathematical model for the kinetics of mitochondrial calcium uniporter. *Biophysical journal*, 96(4):1318–32, Luty 2009.

[58] Dawson S. P., Keizer J., Pearson J. E.: Fire-diffuse-fire model of dynamics of intracellular calcium waves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11):6060–3, Maj 1999.

[59] Dębska-Vielhaber G., Koszela-piotrowska I., Dołowy K.: Mitochondrialne kanały jonowe. *Postępy Biochemii*, 52(2):137–144, 2006.

[60] Brito O. M. de, Scorrano L.: Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 456(7222):605–10, Gru. 2008.

[61] Brito O. M. de, Scorrano L.: An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *The EMBO journal*, 29(16):2715–23, Sier. 2010.

[62] Fuente S. de la, Fonteriz R. I., Montero M., Alvarez J.: Ca^{2+} homeostasis in the endoplasmic reticulum measured with a new low-Ca^{2+}-affinity targeted aequorin. *Cell calcium*, 54(1):37–45, Lip. 2013.

[63] De Young G. W., Keizer J.: A single-pool inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in Ca^{2+} concentration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(20):9895–9, Paz. 1992.

[64] Deák F., Shin O.-H., Tang J., Hanson P., Ubach J., Jahn R., Rizo J., Kavalali E. T., Südhof T. C.: Rabphilin regulates SNARE-dependent re-priming of synaptic vesicles for fusion. *The EMBO journal*, 25(12):2856–66, Czerw. 2006.

[65] Demaurex N., Distelhorst C.: Cell biology. Apoptosis–the calcium connection. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5616):65–7, Kwi. 2003.

[66] Dennis E. a., Kennedy E. P.: Intracellular sites of lipid synthesis and the biogenesis of mitochondria. *Journal of lipid research*, 13(2):263–7, Mar. 1972.

[67] Denton R. M.: Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et biophysica acta*, 1787(11):1309–16, List. 2009.

[68] Desagher S., Martinou J. C.: Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in cell biology*, 10(9):369–77, Wrze. 2000.

[69] Dhooge A., Govaerts W., Kuznetsov Y. A.: MATCONT: A Matlab package for numerical bifurcation analysis of ODEs. *ACM Transactions on Mathematical Software*, 29(2):141–164, Czerw. 2003.

[70] Di Leva F., Domi T., Fedrizzi L., Lim D., Carafoli E.: The plasma membrane Ca^{2+} ATPase of animal cells: structure, function and regulation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 476(1):65–74, Sier. 2008.

[71] Dooley J., Liston A.: Molecular control over thymic involution: from cytokines and microRNA to aging and adipose tissue. *European journal of immunology*, 42(5):1073–9, Maj 2012.

[72] Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X.: Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1):33–42, Lip. 2000.

[73] Dunham I., Shimizu N., Roe B. A., Chissoe S., Hunt A. R., Collins J. E., Bruskiewich R., Beare D. M., Clamp M., Smink L. J., Ainscough R., Almeida J. P., Babbage A., Bagguley C., Bailey J., Barlow K., Bates K. N., Beasley O., Bird C. P., Blakey S., Bridgeman A. M., Buck D., Burgess J., Burrill W. D., O'Brien K. P.: The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature*, 402(6761):489–95, Gru. 1999.

[74] Dupont G., Abou-Lovergne A., Combettes L.: Stochastic aspects of oscillatory Ca^{2+} dynamics in hepatocytes. *Biophysical journal*, 95(5):2193–202, Wrze. 2008.

[75] Dupont G., Combettes L.: What can we learn from the irregularity of Ca^{2+} oscillations? *Chaos (Woodbury, N.Y.)*, 19(3):037112, Wrze. 2009.

[76] Dupont G., Combettes L., Bird G. S., Putney J. W.: Calcium oscillations. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(3):1–18, Mar. 2011.

[77] Dyzma M., Szopa P., Kaźmierczak B.: Membrane associated complexes : new approach to calcium dynamics modelling. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*, 7(6):167–186, Gru. 2012.

[78] Dziadek M. a., Johnstone L. S.: Biochemical properties and cellular localisation of STIM proteins. *Cell calcium*, 42(2):123–32, Sier. 2007.

[79] Egan T. M., Khakh B. S.: Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(13):3413–20, Mar. 2004.

[80] Ellgaard L., Helenius a.: ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Current opinion in cell biology*, 13(4):431–7, Sier. 2001.

[81] Ertel E. A., Warren V. A., Adams M. E., Griffin P. R., Cohen C. J., Smith M. M.: Type III omega-agatoxins: a family of probes for similar binding sites on L- and N-type calcium channels. *Biochemistry*, 33(17):5098–108, Maj 1994.

[82] Falcke M.: Buffers and oscillations in intracellular Ca^{2+} dynamics. *Biophysical journal*, 84(1):28–41, Sty. 2003.

[83] Falcke M.: On the role of stochastic channel behavior in intracellular Ca^{2+} dynamics. *Biophysical journal*, 84(1):42–56, Sty. 2003.

[84] Falcke M.: Reading the patterns in living cells — the physics of Ca^{2+} signaling. *Advances in Physics*, 53(3):255–440, Maj 2004.

[85] Falcke M., Or-Guil M., Bär M.: Dispersion gap and localized spiral waves in a model for intracellular Ca^{2+} dynamics. *Physical review letters*, 84(20):4753–6, Maj 2000.

[86] Fill M., Copello J. A.: Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiological reviews*, 82(4):893–922, Paz. 2002.

[87] Fink C. C., Slepchenko B., Moraru I. I., Watras J., Schaff J. C., Loew L. M.: An image-based model of calcium waves in differentiated neuroblastoma cells. *Biophysical journal*, 79(1):163–83, Lip. 2000.

[88] Foskett J. K., White C., Cheung K.-H., Mak D.-O. D.: Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Physiological reviews*, 87(2):593–658, Kwi. 2007.

[89] Franzini-Armstrong C.: RYR-DHPR Relationships In Skeletal And Cardiac Muscles. *Ryanodine Receptors*, rozdział 4, strony 35–42. Springer Science+Business Media, LLC, Boston, 2005.

[90] Freeze B. S., McNulty M. M., Hanck D. A.: State-dependent verapamil block of the cloned human Ca(v)3.1 T-type Ca^{2+} channel. *Molecular pharmacology*, 70(2):718–26, Sier. 2006.

[91] Fridlyand L. E., Tamarina N., Philipson L. H.: Modeling of Ca^{2+} flux in pancreatic beta-cells: role of the plasma membrane and intracellular stores. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 285(1):E138–54, Lip. 2003.

[92] Fuchs Y., Steller H.: Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147(4):742–58, List. 2011.

[93] Furuichi T., Furutama D., Hakamata Y., Nakai J., Takeshima H., Mikoshiba K.: Multiple types of ryanodine receptor/Ca^{2+} release channels are differentially expressed in rabbit brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 14(8):4794–805, Sier. 1994.

[94] Furukawa T., Nukada T., Namiki Y., Miyashita Y., Hatsuno K., Ueno Y., Yamakawa T., Isshiki T.: Five different profiles of dihydropyridines in blocking T-type Ca^{2+} channel subtypes (Ca(v)3.1 (alpha(1G)), Ca(v)3.2 (alpha(1H)), and Ca(v)3.3 (alpha(1I))) expressed in Xenopus oocytes. *European journal of pharmacology*, 613(1-3):100–7, Czerw. 2009.

[95] Furukawa T., Yamakawa T., Midera T., Sagawa T., Mori Y., Nukada T.: Selectivities of dihydropyridine derivatives in blocking Ca^{2+} channel subtypes expressed in Xenopus oocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 291(2):464–73, List. 1999.

[96] Galluzzi L., Kepp O., Trojel-Hansen C., Kroemer G.: Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circulation research*, 111(9):1198–207, Paz. 2012.

[97] Gautier F., Guillemin Y., Cartron P. F., Gallenne T., Cauquil N., Le Diguarher T., Casara P., Vallette F. M., Manon S., Hickman J. a., Geneste O., Juin P.: Bax activation by engagement with, then release from, the BH3 binding site of Bcl-xL. *Molecular and cellular biology*, 31(4):832–44, Luty 2011.

[98] Gething M. J.: Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Seminars in cell & developmental biology*, 10(5):465–72, Paz. 1999.

[99] Gibson L., Holmgreen S. P., Huang D. C., Bernard O., Copeland N. G., Jenkins N. A., Sutherland G. R., Baker E., Adams J. M., Cory S.: bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene*, 13(4):665–75, Sier. 1996.

[100] Giorgi C., Baldassari F., Bononi A., Bonora M., De Marchi E., Marchi S., Missiroli S., Patergnani S., Rimessi A., Suski J. M., Więckowski M. R., Pinton P.: Mitochondrial Ca^{2+} and apoptosis. *Cell calcium*, 52(1):36–43, Lip. 2012.

[101] Giorgi C., Baldassari F., Bononi A., Bonora M., De Marchi E., Marchi S., Missiroli S., Patergnani S., Rimessi A., Suski J. M., Więckowski M. R., Pinton P.: Mitochondrial Ca^{2+} and apoptosis. *Cell calcium*, 52(1):36–43, Lip. 2012.

[102] Giorgi C., Więckowski M. R., Pandolfi P. P., Pinton P.: Mitochondria associated membranes (MAMs) as critical hubs for apoptosis. *Communicative & integrative biology*, 4(3):334–5, Maj 2011.

[103] Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W., Stokłosa T., redaktorzy: *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, wyd. 6, 2013.

[104] Gogada R., Yadav N., Liu J., Tang S., Zhang D., Schneider A., Seshadri A., Sun L., Aldaz C. M., Tang D. G., Chandra D.: Bim, a proapoptotic protein, up-regulated via transcription factor E2F1-dependent mechanism, functions as a prosurvival molecule in cancer. *The Journal of biological chemistry*, 288(1):368–81, Sty. 2013.

[105] Goldbeter a., Dupont G., Berridge M. J.: Minimal model for signal-induced Ca^{2+} oscillations and for their frequency encoding through protein phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(4):1461–5, Luty 1990.

[106] Goll D. E., Thompson V. F., Li H., Wei W., Cong J.: The calpain system. *Physiological reviews*, 83(3):731–801, Lip. 2003.

[107] Gomes D. A., Leite M. F., Bennett A. M., Nathanson M. H.: Calcium signaling in the nucleus. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 84(3-4):325–32, 2006.

[108] Gonzalez-Garcia J. R., Machaty Z., Lai F. A., Swann K.: The dynamics of PKC-induced phosphorylation triggered by Ca^{2+} oscillations in mouse eggs. *Journal of cellular physiology*, 228(1):110–9, Sty. 2013.

[109] Govorukhin V.: MATDS, 2009.

[110] Grabarek Z.: Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *Journal of molecular biology*, 359(3):509–25, Czerw. 2006.

[111] Griffiths E. J., Rutter G. a.: Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1787(11):1324–33, List. 2009.

[112] Groenendyk J., Lynch J., Michalak M.: Calreticulin, Ca^{2+}, and calcineurin - signaling from the endoplasmic reticulum. *Molecules and cells*, 17(3):383–9, Czerw. 2004.

[113] Groffen A. J. a., Friedrich R., Brian E. C., Ashery U., Verhage M.: DOC2A and DOC2B are sensors for neuronal activity with unique calcium-dependent and kinetic properties. *Journal of neurochemistry*, 97(3):818–33, Maj 2006.

[114] Guerini D., Coletto L., Carafoli E.: Exporting calcium from cells. *Cell calcium*, 38(3-4):281–9, 2005.

[115] Gunter T. E., Buntinas L., Sparagna G., Eliseev R., Gunter K.: Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell calcium*, 28(5-6):285–96, 2000.

[116] Gunter T. E., Gunter K. K.: Uptake of calcium by mitochondria: transport and possible function. *IUBMB life*, 52(3-5):197–204, 2001.

[117] Gunter T. E., Pfeiffer D. R.: Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *The American journal of physiology*, 258(5 Pt 1):C755–86, Maj 1990.

[118] Gunter T. E., Yule D. I., Gunter K. K., Eliseev R. a., Salter J. D.: Calcium and mitochondria. *FEBS letters*, 567(1):96–102, Czerw. 2004.

[119] Guo X., Chen K.-H., Guo Y., Liao H., Tang J., Xiao R.-P.: Mitofusin 2 triggers vascular smooth muscle cell apoptosis via mitochondrial death pathway. *Circulation research*, 101(11):1113–22, List. 2007.

[120] Gurkoff G., Shahlaie K., Lyeth B., Berman R.: Voltage-gated calcium channel antagonists and traumatic brain injury. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(7):788–812, Sty. 2013.

[121] Gustavsson N., Wu B., Han W.: Calcium Sensing in Exocytosis. *Calcium Signaling*, rozdział 32, strony 731–58. Springer Science+Business Media, LLC, Dordrecht, 2012.

[122] Hajnóczky G., Csordás G., Das S., Garcia-Perez C., Saotome M., Sinha Roy S., Yi M.: Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca^{2+} uptake in apoptosis. *Cell calcium*, 40(5-6):553–60, 2006.

[123] Hajnóczky G., Davies E., Madesh M.: Calcium signaling and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(3):445–454, Maj 2003.

[124] Haq R., Yokoyama S., Hawryluk E. B., Jönsson G. B., Frederick D. T., McHenry K., Porter D., Tran T.-N., Love K. T., Langer R., Anderson D. G., Garraway L. a., Duncan L. M., Morton D. L., Hoon D. S. B., Wargo J. a., Song J. S., Fisher D. E.: BCL2A1 is a lineage-specific antiapoptotic melanoma oncogene that confers resistance to BRAF inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(11):4321–6, Mar. 2013.

[125] Hayashi T., Rizzuto R., Hajnóczky G., Su T.-P.: MAM: more than just a housekeeper. *Trends in cell biology*, 19(2):81–8, Mar. 2009.

[126] Hayashi T., Su T.-P.: Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca$ˆ{2+}$ signaling and cell survival. *Cell*, 131(3):596–610, List. 2007.

[127] Heaney R. P.: Calcium intake and disease prevention. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 50(4):685–93, Sier. 2006.

[128] Hegger R., Kantz H., Schreiber T.: Practical implementation of nonlinear time series methods: The TISEAN package. *Chaos (Woodbury, N.Y.)*, 9(2):413–435, Czerw. 1999.

[129] Hengartner M. O.: The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805):770–6, Paz. 2000.

[130] Hengartner M. O., Horvitz H. R.: C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell*, 76(4):665–76, Luty 1994.

[131] Hernjak N., Slepchenko B. M., Fernald K., Fink C. C., Fortin D., Moraru I. I., Watras J., Loew L. M.: Modeling and analysis of calcium signaling events leading to long-term depression in cerebellar Purkinje cells. *Biophysical journal*, 89(6):3790–806, Gru. 2005.

[132] Hertle D. N., Yeckel M. F.: Distribution of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor isotypes and ryanodine receptor isotypes during maturation of the rat hippocampus. *Neuroscience*, 150(3):625–38, Gru. 2007.

[133] Higgins E. R., Goel P., Puglisi J. L., Bers D. M., Cannell M., Sneyd J.: Modelling calcium microdomains using homogenisation. *Journal of theoretical biology*, 247(4):623–44, Sier. 2007.

[134] Hoffman N. E., Chandramoorthy H. C., Shamugapriya S., Zhang X., Rajan S., Mallilankaraman K., Gandhirajan R. K., Vagnozzi R. J., Ferrer L. M., Sreekrishnanilayam K., Natarajaseenivasan K., Vallem S., Force T., Choi E. T., Cheung J. Y., Madesh M.: MICU1 motifs define mitochondrial calcium uniporter binding and activity. *Cell reports*, 5(6):1576–88, Gru. 2013.

[135] Inohara N., Gourley T. S., Carrio R., Muñiz M., Merino J., Garcia I., Koseki T., Hu Y., Chen S., Núñez G.: Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *The Journal of biological chemistry*, 273(49):32479–86, Gru. 1998.

[136] Ishii K., Hirose K., Iino M.: Ca^{2+} shuttling between endoplasmic reticulum and mitochondria underlying Ca^{2+} oscillations. *EMBO reports*, 7(4):390–6, Kwi. 2006.

[137] Jacobson M. D., Weil M., Raff M. C.: Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88(3):347–54, Luty 1997.

[138] Jarvis M. F., Khakh B. S.: ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology*, 56(1):208–15, Sty. 2009.

[139] Jethmalani S. M., Henle K. J.: Calreticulin associates with stress proteins: implications for chaperone function during heat stress. *Journal of cellular biochemistry*, 69(1):30–43, Kwi. 1998.

[140] Joseph S. K., Hajnóczky G.: IP_3 receptors in cell survival and apoptosis: Ca^{2+} release and beyond. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 12(5):951–68, Maj 2007.

[141] Jou M. J., Peng T. I., Sheu S. S.: Histamine induces oscillations of mitochondrial free Ca^{2+} concentration in single cultured rat brain astrocytes. *The Journal of physiology*, 497 (Pt 2:299–308, Gru. 1996.

[142] Jung D. W., Bradshaw P. C., Litsky M., Pfeiffer D. R.: Ca^{2+} transport in mitochondria from yeast expressing recombinant aequorin. *Analytical biochemistry*, 324(2):258–68, Sty. 2004.

[143] Kaźmierczak B., Peradzyński Z.: Calcium waves with mechano-chemical couplings. *Mathematical biosciences and engineering : MBE*, 10(3):743–59, Czerw. 2013.

[144] Kantz H., Schreiber T.: *Nonlinear Time Series Analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, wyd. 2, 2004.

[145] Katsuhiko M.: IP 3 receptors and their role in cell function. *Calcium: A Matter of Life or Death*, rozdział 11, strony 267–285. Elsevier B.V., Paris, wyd. 1, 2007.

[146] Kawate T., Michel J. C., Birdsong W. T., Gouaux E.: Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature*, 460(7255):592–8, Lip. 2009.

[147] Kaźmierczak B., Dyzma M.: Mechanical effects coupled with calcium waves. *Arch. Mech.*, 62(2):121–133, 2010.

[148] Kaźmierczak B., Peradzyński Z.: Calcium waves with fast buffers and mechanical effects. *Journal of mathematical biology*, 62(1):1–38, Sty. 2011.

[149] Keener J., Sneyd J.: *Mathematical Physiology II: Systems biology*, wolumen 8/2 serii *Interdisciplinary Applied Mathematics*. Springer New York, New York, NY, 2009.

[150] Keener J. P.: Stochastic calcium oscillations. *Mathematical medicine and biology : a journal of the IMA*, 23(1):1–25, Mar. 2006.

[151] Keizer J., Levine L.: Ryanodine receptor adaptation and Ca^{2+}(-)induced Ca^{2+} release-dependent Ca^{2+} oscillations. *Biophysical journal*, 71(6):3477–87, Gru. 1996.

[152] Kelly P. N., Strasser a.: The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell death and differentiation*, 18(9):1414–24, Wrze. 2011.

[153] Kiliańska Z.: Apoptoza komórek zwierzęcych. *Cytobiochemia*, rozdział 23, strony 772–812. Wydawnictwo Naukowe PWN, wyd. 3, 2002.

[154] Kimlicka L., Lau K., Tung C.-C., Van Petegem F.: Disease mutations in the ryanodine receptor N-terminal region couple to a mobile intersubunit interface. *Nature communications*, 4:1506, Sty. 2013.

[155] Kirichok Y., Krapivinsky G., Clapham D. E.: The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, 427(6972):360–4, Sty. 2004.

[156] Kuboniwa H., Tjandra N., Grzesiek S., Ren H., Klee C. B., Bax A.: Solution structure of calcium-free calmodulin. *Nature structural biology*, 2(9):768–76, Wrze. 1995.

[157] Kummer U., Krajnc B., Pahle J., Green A. K., Dixon C. J., Marhl M.: Transition from stochastic to deterministic behavior in calcium oscillations. *Biophysical journal*, 89(3):1603–11, Wrze. 2005.

[158] Kwan Y. W., Bangalore R., Lakitsh M., Glossmann H., Kass R. S.: Inhibition of cardiac L-type calcium channels by quaternary amlodipine: implications for pharmacokinetics and access to dihydropyridine binding site. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 27(1):253–62, Sty. 1995.

[159] Lacinová L.: Voltage-dependent calcium channels. *General physiology and biophysics*, 24 Suppl 1:1–78, Czerw. 2005.

[160] Lamb H. K., Mee C., Xu W., Liu L., Blond S., Cooper A., Charles I. G., Hawkins A. R.: The affinity of a major Ca^{2+} binding site on GRP78 is differentially enhanced by ADP and ATP. *The Journal of biological chemistry*, 281(13):8796–805, Mar. 2006.

[161] Lanner J. T.: Ryanodine Receptor Physiology and Its Role in Disease. *Calcium Signaling*, rozdział 9, strony 217–234. Springer Science+Business Media, LLC, Dordrecht, 2012.

[162] Laube B., Hirai H., Sturgess M., Betz H., Kuhse J.: Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron*, 18(3):493–503, Mar. 1997.

[163] Laude A. J., Simpson A. W. M.: Compartmentalized signalling: Ca^{2+} compartments, microdomains and the many facets of Ca^{2+} signalling. *The FEBS journal*, 276(7):1800–16, Kwi. 2009.

[164] Lebiedzińska M., Szabadkai G., Jones A. W. E., Duszyński J., Więckowski M. R.: Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and other subcellular organelles. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(10):1805–16, Paz. 2009.

[165] Leo S., Bianchi K., Brini M., Rizzuto R.: Mitochondrial calcium signalling in cell death. *The FEBS journal*, 272(16):4013–22, Sier. 2005.

[166] Lewit-Bentley A., Réty S.: EF-hand calcium-binding proteins. *Current opinion in structural biology*, 10(6):637–43, Gru. 2000.

[167] Liao J., Li H., Zeng W., Sauer D. B., Belmares R., Jiang Y.: Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6069):686–90, Luty 2012.

[168] Lodish H., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.: Intracellular Ion Environment and Membrane Electric Potential. *Molecular Cell Biology*, rozdział 15. W. H. Freeman, New York, wyd. 4, 2000.

[169] Lomonosova E., Chinnadurai G.: BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*, 27 Suppl 1(Suppl 1):S2–19, Gru. 2008.

[170] Lopreiato R., Giacomello M., Carafoli E.: The Plasma Membrane Calcium Pump: New Ways to Look at an Old Enzyme. *The Journal of biological chemistry*, strony 0–15, Luty 2014.

[171] Losa D., Köhler T., Bellec J., Dudez T., Crespin S., Bacchetta M., Boulanger P., Hong S. S., Morel S., Nguyen T. H., Delden C. van, Chanson M.: Pseudomonas aeruginosa-Induced Apoptosis in Airway Epithelial Cells Is Mediated by Gap Junctional Communication in a JNK-Dependent Manner. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Kwi. 2014.

[172] Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X.: Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94(4):481–90, Sier. 1998.

[173] Lytton J.: Na^+/Ca^{2+} exchangers: three mammalian gene families control Ca^{2+} transport. *The Biochemical journal*, 406(3):365–82, Wrze. 2007.

[174] MacDermott A. B., Mayer M. L., Westbrook G. L., Smith S. J., Barker J. L.: NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature*, 321(6069):519–22, 1986.

[175] Mackrill J. J.: Ryanodine Receptor Calcium Release Channels: An Evolutionary Perspective. *Calcium Signaling*, rozdział 7, strony 159–182. Springer Science+Business Media, LLC, Dordrecht, 2012.

[176] Maeda T., Ochi K., Nakakura-Ohshima K., Youn S. H., Wakisaka S.: The Ruffini ending as the primary mechanoreceptor in the periodontal ligament: its morphology, cytochemical features, regeneration, and development. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 10(3):307–27, Sty. 1999.

[177] Magnus G., Keizer J.: Minimal model of beta-cell mitochondrial Ca^{2+} handling. *The American journal of physiology*, 273(2 Pt 1):C717–33, Sier. 1997.

[178] Magnus G., Keizer J.: Model of beta-cell mitochondrial calcium handling and electrical activity. I. Cytoplasmic variables. *The American journal of physiology*, 274(4 Pt 1):C1158–73, Kwi. 1998.

[179] Magnus G., Keizer J.: Model of beta-cell mitochondrial calcium handling and electrical activity. II. Mitochondrial variables. *The American journal of physiology*, 274(4 Pt 1):C1174–84, Kwi. 1998.

[180] Mallilankaraman K., Doonan P., Cárdenas C., Chandramoorthy H. C., Müller M., Miller R., Hoffman N. E., Gandhirajan R. K., Molgó J., Birnbaum M. J., Rothberg B. S., Mak D.-o. D., Foskett J. K., Madesh M.: MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca^{2+} uptake that regulates cell survival. *Cell*, 151(3):630–44, Paz. 2012.

[181] Manji S. S., Parker N. J., Williams R. T., Stekelenburg L. van, Pearson R. B., Dziadek M., Smith P. J.: STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface. *Biochimica et biophysica acta*, 1481(1):147–55, Sier. 2000.

[182] Mannella C. A., Buttle K., Rath B. K., Marko M.: Electron microscopic tomography of rat-liver mitochondria and their interaction with the endoplasmic reticulum. *BioFactors (Oxford, England)*, 8(3-4):225–8, Sty. 1998.

[183] Marhl M., Haberichter T., Brumen M., Heinrich R.: Complex calcium oscillations and the role of mitochondria and cytosolic proteins. *Bio Systems*, 57(2):75–86, Lip. 2000.

[184] Marhl M., Schuster S., Brumen M.: Mitochondria as an important factor in the maintenance of constant amplitudes of cytosolic calcium oscillations. *Biophysical chemistry*, 71(2-3):125–32, Kwi. 1998.

[185] Marks A. R., Tempst P., Hwang K. S., Taubman M. B., Inui M., Chadwick C., Fleischer S., Nadal-Ginard B.: Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(22):8683–7, List. 1989.

[186] Martins L. M.: The serine protease Omi/HtrA2: a second mammalian protein with a Reaper-like function. *Cell death and differentiation*, 9(7):699–701, Lip. 2002.

[187] Masumiya H., Kase J., Tanaka Y., Tanaka H., Shigenobu K.: Frequency-dependent blockade of T-type Ca^{2+} current by efonidipine in cardiomyocytes. *Life sciences*, 68(3):345–51, Gru. 2000.

[188] Mazel T., Raymond R., Raymond-Stintz M., Jett S., Wilson B. S.: Stochastic modeling of calcium in 3D geometry. *Biophysical journal*, 96(5):1691–706, Mar. 2009.

[189] McDonough S. I.: *Calcium Channel Pharmacology*. Springer US, Boston, MA, 2004.

[190] McDonough S. I., Swartz K. J., Mintz I. M., Boland L. M., Bean B. P.: Inhibition of calcium channels in rat central and peripheral neurons by omega-conotoxin MVIIC. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(8):2612–23, Kwi. 1996.

[191] Merkwirth C., Langer T.: Mitofusin 2 builds a bridge between ER and mitochondria. *Cell*, 135(7):1165–7, Gru. 2008.

[192] Meyer T., Stryer L.: Molecular model for receptor-stimulated calcium spiking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(14):5051–5, Lip. 1988.

[193] Micaroni M.: Calcium Around the Golgi Apparatus: Implications for Intracellular Membrane Trafficking. Islam M. S., redaktor, *Calcium Signaling*, wolumen 740 serii *Advances in Experimental Medicine and Biology*, rozdział 18, strony 439–460. Springer Netherlands, Dordrecht, 2012.

[194] Mikoshiba K.: The Discovery and Structural Investigation of the IP_3 Receptor and the Associated IRBIT Protein. *Calcium Signaling*, rozdział 12, strony 281–304. Springer Science+Business Media, LLC, Dordrecht, 2012.

[195] Mizzen L. a., Kabiling a. N., Welch W. J.: The two mammalian mitochondrial stress proteins, grp 75 and hsp 58, transiently interact with newly synthesized mitochondrial proteins. *Cell regulation*, 2(2):165–79, Luty 1991.

[196] Murray J. D.: *Mathematical Biology: I. An Introduction (Interdisciplinary Applied Mathematics)*. Springer, wyd. 3, 2007.

[197] Murray R. K., Granner D. K., Mayer P. A., Rodwell V. W.: *Biochemia Harpera*. Lekarskie PZWL, Warszawa, wyd. 5, 2006.

[198] Nagai T., Sawano a., Park E. S., Miyawaki a.: Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+}. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6):3197–202, Mar. 2001.

[199] Nalefski E. a., Falke J. J.: The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 5(12):2375–90, Gru. 1996.

[200] Neher E.: Vesicle pools and Ca^{2+} microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron*, 20(3):389–99, Mar. 1998.

[201] Nelson M. R., Thulin E., Fagan P. A., Forsén S., Chazin W. J.: The EF-hand domain: a globally cooperative structural unit. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 11(2):198–205, Luty 2002.

[202] Newton A. C.: Protein kinase C: structure, function, and regulation. *The Journal of biological chemistry*, 270(48):28495–8, Gru. 1995.

[203] Nicholson D. W.: Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell death and differentiation*, 6(11):1028–42, Gru. 1999.

[204] North R. A.: Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews*, 82(4):1013–67, Paz. 2002.

[205] O'Connor L., Strasser a., O'Reilly L. a., Hausmann G., Adams J. M., Cory S., Huang D. C.: Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *The EMBO journal*, 17(2):384–95, Sty. 1998.

[206] Otsu K., Willard H. F., Khanna V. K., Zorzato F., Green N. M., MacLennan D. H.: Molecular cloning of cDNA encoding the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 265(23):13472–83, Sier. 1990.

[207] Oxhamre C., Richter-Dahlfors A., Zhdanov V. P., Kasemo B.: A minimal generic model of bacteria-induced intracellular Ca^{2+} oscillations in epithelial cells. *Biophysical journal*, 88(4):2976–81, Kwi. 2005.

[208] Özer A. B., Akin E.: Tools for detecting chaos. *SAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9:60–66, 2005.

[209] Parekh A. B., Putney J. W.: Store-operated calcium channels. *Physiological reviews*, 85(2):757–810, Kwi. 2005.

[210] Park B. J., Lee D. G., Yu J. R., Jung S. K., Choi K., Lee J., Kim Y. S., Lee J. I., Kwon J. Y., Singson A., Song W. K., Eom S. H., Park C. S., Kim D. H., Bandyopadhyay J., Ahnn J.: Calreticulin, a calcium-binding molecular chaperone, is required for stress response and fertility in Caenorhabditis elegans. *Molecular biology of the cell*, 12(9):2835–45, Wrze. 2001.

[211] Partha S. K., Ravulapalli R., Allingham J. S., Campbell R. L., Davies P. L.: Crystal structure of calpain-3 penta-EF-hand domain: A homodimerized PEF family member with calcium bound at the fifth EF-hand. *The FEBS journal*, Maj 2014.

[212] Parys J. B., De Smedt H.: Inositol 1,4,5-Trisphosphate and Its Receptors. *Calcium Signaling*, rozdział 11, strony 255–279. Springer Science+Business Media, LLC, Dordrecht, 2012.

[213] Patron M., Checchetto V., Raffaello A., Teardo E., Vecellio Reane D., Mantoan M., Granatiero V., Szabò I., De Stefani D., Rizzuto R.: MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca^{2+} uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. *Molecular cell*, 53(5):726–37, Mar. 2014.

[214] Pedersen S. F., Owsianik G., Nilius B.: TRP channels: an overview. *Cell calcium*, 38(3-4):233–52, 2005.

[215] Perciavalle R. M., Opferman J. T.: Delving deeper: MCL-1's contributions to normal and cancer biology. *Trends in cell biology*, 23(1):22–9, Sty. 2013.

[216] Pereda J., Croxatto H. B.: Human preimplantation development *in vivo*: ultrastructural observations. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 21(4):480–8, Lip. 1992.

[217] Perez J. F., Sanderson M. J.: The frequency of calcium oscillations induced by 5-HT, ACH, and KCl determine the contraction of smooth muscle cells of intrapulmonary bronchioles. *The Journal of general physiology*, 125(6):535–53, Czerw. 2005.

[218] Perocchi F., Gohil V. M., Girgis H. S., Bao X. R., McCombs J. E., Palmer A. E., Mootha V. K.: MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca^{2+} uptake. *Nature*, 467(7313):291–6, Wrze. 2010.

[219] Petersen O. H.: Local calcium spiking in pancreatic acinar cells. *Ciba Foundation symposium*, 188:85–94; discussion 94–103, Sty. 1995.

[220] Petersen O. H., Burdakova N.: The specificity of Ca^{2+} signalling. *Acta physiologica Hungarica*, 89(4):439–50, Sty. 2002.

[221] Piedras-Renteria E. S., Barrett C. F., Cao Y.-Q., Tsien R. W.: Voltage-gated calcium channels, calcium signaling, and channelopathies. Krebs J., Michalak M., redaktorzy, *Calcium: A Matter of Life or Death*, wolumen 740 serii *Advances in Experimental Medicine and Biology*, strony 125–155. Elsevier, 2012.

[222] Plovanich M., Bogorad R. L., Sancak Y., Kamer K. J., Strittmatter L., Li A. a., Girgis H. S., Kuchimanchi S., De Groot J., Speciner L., Taneja N., Oshea J., Koteliansky V., Mootha V. K.: MICU2, a paralog of MICU1, resides within the mitochondrial uniporter complex to regulate calcium handling. *PloS one*, 8(2):e55785, Sty. 2013.

[223] Poenie M., Tsien R. Y., Schmitt-Verhulst a. M.: Sequential activation and lethal hit measured by $[Ca^{2+}]_i$ in individual cytolytic T cells and targets. *The EMBO journal*, 6(8):2223–32, Sier. 1987.

[224] Pradhan R. K., Beard D. a., Dash R. K.: A biophysically based mathematical model for the kinetics of mitochondrial Na^+-Ca^{2+} antiporter. *Biophysical journal*, 98(2):218–30, Sty. 2010.

[225] Pringos E., Vignes M., Martinez J., Rolland V.: Peptide neurotoxins that affect voltage-gated calcium channels: a close-up on ω-agatoxins. *Toxins*, 3(1):17–42, Sty. 2011.

[226] Prins D., Michalak M.: Organellar calcium buffers. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(3), Mar. 2011.

[227] Radhakrishnan A., Stein A., Jahn R., Fasshauer D.: The Ca^{2+} affinity of synaptotagmin 1 is markedly increased by a specific interaction of its C2B domain with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *The Journal of biological chemistry*, 284(38):25749–60, Wrze. 2009.

[228] Raffaello A., De Stefani D., Rizzuto R.: The mitochondrial Ca^{2+} uniporter. *Cell calcium*, 52(1):16–21, Lip. 2012.

[229] Ranganathan R., Ross E. M.: PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Current biology : CB*, 7(12):R770–3, Gru. 1997.

[230] Rasola A., Bernardi P.: The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 12(5):815–33, Maj 2007.

[231] Rasola A., Bernardi P.: Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+}-dependent apoptosis and necrosis. *Cell calcium*, 50(3):222–33, Wrze. 2011.

[232] Rizzuto R., Bastianutto C., Brini M., Murgia M., Pozzan T.: Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in intact cells. *The Journal of cell biology*, 126(5):1183–94, Wrze. 1994.

[233] Rizzuto R., Bernardi P., Pozzan T.: Mitochondria as all-round players of the calcium game. *The Journal of physiology*, 529 Pt 1(5-6):37–47, List. 2000.

[234] Rizzuto R., Pozzan T.: Microdomains of intracellular Ca^{2+}: molecular determinants and functional consequences. *Physiological reviews*, 86(1):369–408, Sty. 2006.

[235] Rodrigues M. A., Gomes D. A., Nathanson M. H., Leite M. F.: Nuclear calcium signaling: a cell within a cell. *Brazilian journal of medical and biological research*

= *Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, 42(1):17–20, Sty. 2009.

[236] Rowland A. a., Voeltz G. K.: Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(10):607–25, Paz. 2012.

[237] Roy S. S., Hajnóczky G.: Calcium, mitochondria and apoptosis studied by fluorescence measurements. *Methods (San Diego, Calif.)*, 46(3):213–23, List. 2008.

[238] Rusiñol a. E., Cui Z., Chen M. H., Vance J. E.: A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. *The Journal of biological chemistry*, 269(44):27494–502, List. 1994.

[239] Samsó M., Feng W., Pessah I. N., Allen P. D.: Coordinated movement of cytoplasmic and transmembrane domains of RyR1 upon gating. *PLoS biology*, 7(4):e85, Kwi. 2009.

[240] Sancak Y., Markhard A. L., Kitami T., Kovács-Bogdán E., Kamer K. J., Udeshi N. D., Carr S. A., Chaudhuri D., Clapham D. E., Li A. A., Calvo S. E., Goldberger O., Mootha V. K.: EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6164):1379–82, Gru. 2013.

[241] Sardet C., Paix A., Dru P., Chenevert J.: From Oocyte to 16-Cell Stage : Cytoplasmic and Cortical Reorganizations That Pattern the Ascidian Embryo PRIMARY. *Dev Dyn.*, 236(7):1716–1731, 2007.

[242] Sattler M., Liang H., Nettesheim D., Meadows R. P., Harlan J. E., Eberstadt M., Yoon H. S., Shuker S. B., Chang B. S., Minn A. J., Thompson C. B., Fesik S. W.: Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5302):983–6, Luty 1997.

[243] Schäfer B. W., Heizmann C. W.: The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends in biochemical sciences*, 21(4):134–40, Kwi. 1996.

[244] Scheffler I. E.: Structure and morphology. *Mitochondria*, wolumen 1, rozdział 3, strony 15–47. Wiley-Liss, New York, 1999.

[245] Schuster S., Marhl M., Höfer T.: Modelling of simple and complex calcium oscillations. From single-cell responses to intercellular signalling. *European journal of biochemistry / FEBS*, 269(5):1333–55, Mar. 2002.

[246] Schwaller B.: The regulation of a cell's Ca^{2+} signaling toolkit: the Ca^{2+} homeostasome. *Advances in experimental medicine and biology*, 740:1–25, Sty. 2012.

[247] Scorrano L., Oakes S. a., Opferman J. T., Cheng E. H., Sorcinelli M. D., Pozzan T., Korsmeyer S. J.: BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+}: a control point for apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5616):135–9, Kwi. 2003.

[248] Seo M.-D., Velamakanni S., Ishiyama N., Stathopulos P. B., Rossi A. M., Khan S. A., Dale P., Li C., Ames J. B., Ikura M., Taylor C. W.: Structural and functional conservation of key domains in InsP3 and ryanodine receptors. *Nature*, 483(7387):108–12, Mar. 2012.

[249] Sharman J. L., Benson H. E., Pawson A. J., Lukito V., Mpamhanga C. P., Bombail V., Davenport A. P., Peters J. a., Spedding M., Harmar A. J.: IUPHAR-DB: updated database content and new features. *Nucleic acids research*, 41(Database issue):D1083–8, Sty. 2013.

[250] Shi Y.: A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nature structural biology*, 8(5):394–401, Maj 2001.

[251] Shibukawa Y., Kang K. J., Kinjo T. G., Szerencsei R. T., Altimimi H. F., Pratikhya P., Winkfein R. J., Schnetkamp P. P. M.: Structure-function relationships of the NCKX2 Na^+/Ca^{2+}-K^+ exchanger. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1099:16–28, Mar. 2007.

[252] Simmen T., Aslan J. E., Blagoveshchenskaya A. D., Thomas L., Wan L., Xiang Y., Feliciangeli S. F., Hung C.-H., Crump C. M., Thomas G.: PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *The EMBO journal*, 24(4):717–29, Luty 2005.

[253] Simms B. a., Zamponi G. W.: Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron*, 82(1):24–45, Kwi. 2014.

[254] Skupin A., Kettenmann H., Falcke M.: Calcium signals driven by single channel noise. *PLoS computational biology*, 6(8):17–19, Sty. 2010.

[255] Smith M. a., Schnellmann R. G.: Calpains, mitochondria, and apoptosis. *Cardiovascular research*, 96(1):32–7, Paz. 2012.

[256] Sneyd J., Dufour J.-F.: A dynamic model of the type-2 inositol trisphosphate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4):2398–403, Luty 2002.

[257] Sneyd J., Keizer J., Sanderson M. J.: Mechanisms of calcium oscillations and waves: a quantitative analysis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(14):1463–72, List. 1995.

[258] Sneyd J., Tsaneva-Atanasova K., Yule D. I., Thompson J. L., Shuttleworth T. J.: Control of calcium oscillations by membrane fluxes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5):1392–6, Luty 2004.

[259] Somogyi R., Stucki J. W.: Hormone-induced calcium oscillations in liver cells can be explained by a simple one pool model. *The Journal of biological chemistry*, 266(17):11068–77, Czerw. 1991.

[260] Sparagna G. C., Gunter K. K., Sheu S. S., Gunter T. E.: Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *The Journal of biological chemistry*, 270(46):27510–5, List. 1995.

[261] Stengel W., Jainz M., Andreas K.: Different potencies of dihydropyridine derivatives in blocking T-type but not L-type Ca^{2+} channels in neuroblastoma-glioma hybrid cells. *European journal of pharmacology*, 342(2-3):339–45, Sty. 1998.

[262] Stull J. T.: Ca^{2+}-dependent cell signaling through calmodulin-activated protein phosphatase and protein kinases minireview series. *The Journal of biological chemistry*, 276(4):2311–2, Sty. 2001.

[263] Sun Y., Peng Z.-L.: Programmed cell death and cancer. *Postgraduate medical journal*, 85(1001):134–40, Mar. 2009.

[264] Swann K., Lai F. A.: PLCζ and the initiation of Ca^{2+} oscillations in fertilizing mammalian eggs. *Cell calcium*, 53(1):55–62, Sty. 2013.

[265] Swann K., Yu Y.: The dynamics of calcium oscillations that activate mammalian eggs. *The International journal of developmental biology*, 52(5-6):585–94, Sty. 2008.

[266] Szabadkai G., Bianchi K., Várnai P., De Stefani D., Więckowski M. R., Cavagna D., Nagy A. I., Balla T., Rizzuto R.: Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca^{2+} channels. *The Journal of cell biology*, 175(6):901–11, Gru. 2006.

[267] Szopa P., Dyzma M., Kaźmierczak B.: Membrane associated complexes in calcium dynamics modelling. *Physical biology*, 10(3):035004, Czerw. 2013.

[268] Takeshima H., Nishimura S., Matsumoto T., Ishida H., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H., Ueda M., Hanaoka M., Hirose T.: Primary structure and

expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature*, 339(6224):439–45, Czerw. 1989.

[269] Tang L., Gamal El-Din T. M., Payandeh J., Martinez G. Q., Heard T. M., Scheuer T., Zheng N., Catterall W. a.: Structural basis for Ca^{2+} selectivity of a voltage-gated calcium channel. *Nature*, 505(7481):56–61, Sty. 2014.

[270] Tang Y., Othmer H. G.: A model of calcium dynamics in cardiac myocytes based on the kinetics of ryanodine-sensitive calcium channels. *Biophysical journal*, 67(6):2223–35, Gru. 1994.

[271] Testa U.: Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia*, 18(7):1176–99, Lip. 2004.

[272] Thomas A. P., Renard D. C., Rooney T. A.: Spatial and temporal organization of calcium signalling in hepatocytes. *Cell calcium*, 12(2-3):111–26, 1991.

[273] Thul R., Smith G. D., Coombes S.: A bidomain threshold model of propagating calcium waves. *Journal of mathematical biology*, 56(4):435–63, Kwi. 2008.

[274] Tjioe E., Lasker K., Webb B., Wolfson H. J., Sali A.: MultiFit: a web server for fitting multiple protein structures into their electron microscopy density map. *Nucleic acids research*, 39(Web Server issue):W167–70, Lip. 2011.

[275] Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H., Ogawa H.: Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 A resolution. *Nature*, 405(6787):647–55, Czerw. 2000.

[276] Traczyk W. Z., Trzebski A. A.: *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, wyd. 3, 2007.

[277] Traore D. A. K., Brennan A. J., Law R. H. P., Dogovski C., Perugini M. A., Lukoyanova N., Leung E. W. W., Norton R. S., Lopez J. A., Browne K. A., Yagita H., Lloyd G. J., Ciccone A., Verschoor S., Trapani J. A., Whisstock J. C., Voskoboinik I.: Defining the interaction of perforin with calcium and the phospholipid membrane. *The Biochemical journal*, 456(3):323–35, Gru. 2013.

[278] Trollinger D. R., Cascio W. E., Lemasters J. J.: Selective loading of Rhod 2 into mitochondria shows mitochondrial Ca^{2+} transients during the contractile cycle in adult rabbit cardiac myocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 236(3):738–42, Lip. 1997.

[279] Tsujimoto Y.: Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *Journal of cellular physiology*, 195(2):158–67, Maj 2003.

[280] Tung C.-C., Lobo P. A., Kimlicka L., Van Petegem F.: The amino-terminal disease hotspot of ryanodine receptors forms a cytoplasmic vestibule. *Nature*, 468(7323):585–8, List. 2010.

[281] Unwin N.: Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution. *Journal of molecular biology*, 346(4):967–89, Mar. 2005.

[282] Vander Heiden M. G., Chandel N. S., Williamson E. K., Schumacker P. T., Thompson C. B.: Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*, 91(5):627–37, List. 1997.

[283] Vega J. A., Haro J. J., Del Valle M. E.: Immunohistochemistry of human cutaneous Meissner and pacinian corpuscles. *Microscopy research and technique*, 34(4):351–61, Lip. 1996.

[284] Verhagen A. M., Ekert P. G., Pakusch M., Silke J., Connolly L. M., Reid G. E., Moritz R. L., Simpson R. J., Vaux D. L.: Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102(1):43–53, Lip. 2000.

[285] Vinogradov A., Scarpa A.: The initial velocities of calcium uptake by rat liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 248(15):5527–31, Sier. 1973.

[286] Völkers M., Rohde D., Goodman C., Most P.: S100A1: a regulator of striated muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} handling, sarcomeric, and mitochondrial function. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010:178614, Sty. 2010.

[287] Wagner J., Keizer J.: Effects of rapid buffers on Ca^{2+} diffusion and Ca^{2+} oscillations. *Biophysical journal*, 67(1):447–56, Lip. 1994.

[288] Wang H. J., Guay G., Pogan L., Sauvé R., Nabi I. R.: Calcium regulates the association between mitochondria and a smooth subdomain of the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology*, 150(6):1489–98, Wrze. 2000.

[289] Wang J., Huang X., Huang W.: A quantitative kinetic model for ATP-induced intracellular Ca^{2+} oscillations. *Journal of theoretical biology*, 245(3):510–9, Kwi. 2007.

[290] Wang L., Yang X., Li S., Wang Z., Liu Y., Feng J., Zhu Y., Shen Y.: Structural and mechanistic insights into MICU1 regulation of mitochondrial calcium uptake. *The EMBO journal*, 33(6):594–604, Mar. 2014.

[291] Webb S. E., Miller A. L.: Aequorin-based genetic approaches to visualize Ca^{2+} signaling in developing animal systems. *Biochimica et biophysica acta*, 1820(8):1160–8, Sier. 2012.

[292] Weber M., Motin L., Gaul S., Beker F., Fink R. H. a., Adams D. J.: Intravenous anaesthetics inhibit nicotinic acetylcholine receptor-mediated currents and Ca^{2+} transients in rat intracardiac ganglion neurons. *British journal of pharmacology*, 144(1):98–107, Sty. 2005.

[293] Wehrens X. H. T., Marks A. R.: *Ryanodine Receptors*. Springer US, 2005.

[294] Wen X.-h., Duda T., Pertzev A., Venkataraman V., Makino C. L., Sharma R. K.: S100B serves as a Ca^{2+} sensor for ROS-GC1 guanylate cyclase in cones but not in rods of the murine retina. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 29(3-4):417–30, Sty. 2012.

[295] Whitaker M.: Calcium at fertilization and in early development. *Physiological reviews*, 86(1):25–88, Sty. 2006.

[296] Whitfield J. F., Chakravarthy B.: *Calcium: The Grand-Master Cell Signaler*. NRC Research Press, Ottawa, 2001.

[297] Więckowski M. R., Giorgi C., Lebiedzińska M., Duszyński J., Pinton P.: Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nature protocols*, 4(11):1582–90, Sty. 2009.

[298] Widłak P.: The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta biochimica Polonica*, 47(4):1037–44, Sty. 2000.

[299] Xi Q., Angus J. A.: Evidence against an action of mibefradil at N-type voltage-operated calcium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 364(5):430–6, List. 2001.

[300] Xia H. H., Talley N. J.: Apoptosis in gastric epithelium induced by Helicobacter pylori infection: implications in gastric carcinogenesis. *The American journal of gastroenterology*, 96(1):16–26, Sty. 2001.

[301] Yamakage M., Namiki A.: Calcium channels–basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels–a review. *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthésie*, 49(2):151–64, Luty 2002.

[302] Yanez M., Gil-Longo J., Campos-Toimil M.: Calcium Binding Proteins. *Calcium Signaling*, rozdział 19, strony 461–482. Springer, Dordrecht, wyd. 1, 2012.

[303] Yao S., Westphal D., Babon J. J., Thompson G. V., Robin A. Y., Adams J. M., Colman P. M., Czabotar P. E.: NMR studies of interactions between Bax and BH3 domain-containing peptides in the absence and presence of CHAPS. *Archives of biochemistry and biophysics*, 545:33–43, Mar. 2014.

[304] Yoshida Y., Imai S.: Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Japanese journal of pharmacology*, 74(2):125–37, Czerw. 1997.

[305] Yu Y., Nomikos M., Theodoridou M., Nounesis G., Lai F. A., Swann K.: PLCζ causes Ca^{2+} oscillations in mouse eggs by targeting intracellular and not plasma membrane PI(4,5)P(2). *Molecular biology of the cell*, 23(2):371–80, Sty. 2012.

[306] Zamponi G. W.: *Voltage-Gated Calcium Channels*. Landes Bioscience, Georgetown, 2005.

[307] Zeng S., Li B., Zeng S., Chen S.: Simulation of spontaneous Ca^{2+} oscillations in astrocytes mediated by voltage-gated calcium channels. *Biophysical journal*, 97(9):2429–37, List. 2009.

[308] Zhang H., Cowan-Jacob S. W., Simonen M., Greenhalf W., Heim J., Meyhack B.: Structural basis of BFL-1 for its interaction with BAX and its anti-apoptotic action in mammalian and yeast cells. *The Journal of biological chemistry*, 275(15):11092–9, Kwi. 2000.

[309] Zhou Y., Yang W., Kirberger M., Lee H.-W., Ayalasomayajula G., Yang J. J.: Prediction of EF-hand calcium-binding proteins and analysis of bacterial EF-hand proteins. *Proteins*, 65(3):643–55, List. 2006.

[310] Zong W. X., Edelstein L. C., Chen C., Bash J., Gélinas C.: The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes & development*, 13(4):382–7, Luty 1999.

Dodatek A

Białka zaangażowane w transport wapnia

Tablica A.1: Rozszerzona lista białek składających się na sygnałosom wapniowy w komórkach eukaryotycznych [22].

Białko	Opis
Recptory i przekaźniki	
Receptory powiązane z białkami G (GPCRs)	Receptory aktywujące PLCβ
Receptory powiązane z kinazą tyrozynową	Receptory aktywujące PLCγ
R. płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR)	Dostarczają miejsc dokujących do fosforylacji m.in. PLCγ
PDGFRα	
PDGFRβ	
R. nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR)	
ERBB1-ERBB4	
R. naczyniowego czynnika wzrostu (VEGFR)	
VEGFR1-VEGFR3	
Białka G	Białka adaptorowe dla receptora metabotropowego, hydrolizujące GTP do GDP+P
Gα_q, Gα_{11}, Gα_{14}, Gα_{15}, Gα_{16}, G$\beta\gamma$	
Czynnik wymiany nukleotydu guaninowego	Uwalnia GDP z białek Ras
RasGRF1	
Regulatory białek G (RGS)	Regulują aktywność podjednostki α białek G
RGS1, RGS2, RGS4, RGS16	
Fosfolipazy C (PLC)	Katalizuje hydrolizę fosfatydów do DAG i IP_3
PLCβ1-4, PLCγ1-2, PLCδ1-4, PLCε, PLCζ	
Cyklaza ADP-rybozy	przekształca NAD^+ w cykliczną ADP-rybozę
CD38	
Kanały	
Kanały błony komórkowej	
Kanały bramkowane napięciem (VGCCs)	
$Ca_V1.1$ – 1.4 (L-type)	
$Ca_V2.1$ (P/Q-type)	
$Ca_V2.2$ (N-type)	
$Ca_V2.3$ (R-type)	
$Ca_V3.1$ – 3.3 (T-type)	
Kanały zależne od Ca^{2+}	
Aktywowane Ca^{2+} kanały K^+	
Kanały o niskiej przepuszczalności (SK)	
Kanały o średniej przepuszczalnosci (IK)	
Kanały o wysokiej przepuszczalnosci (BK)	

Kontynuacja na następnej stronie...

Tablica A.1 – *Lista białek biorących udział w tranporcie wapnia - kontynuacja...*

Białko	**Opis**
Aktywowane Ca^{2+} Kanały Cl^-	
HCLCA1	
Kanały powiązane z receptorami (ROCs)	
Receptory nikotynowe	
Receptory serotoninowe (5-HT_3)	
Receptory AMPA	
Receptory NMDA	
Purynoreceptory (P2X)	
Kanały aktywowane przekaźnikami II-rzędu (SMOCs)	
I_{ARC}	
Kanały bramkowane nukleotydami cyklicznymi (CNGs)	
CNGA1-CNGA4, CNGB1, CNGB3	
Kanały TRP	Termo-wrażliwe receptory przejściowego potencjału
TRPC1-TRPC7	
TRPV1-TRPV6	
TRPM1-TRPM8	
Polycystins	
PC1 – PC2	
Kanały uwalniające wapń z ER	
Receptory $InsP_3$ (InsP3Rs)	
$InsP_3R1 – 3$	
Receptory Ryanodynowe (RYRs)	
RYR1 – 3	
Regulatory kanałów	Glikoproteiny retikulum, regulujące aktywność kanałów IP_3R/RyR
Triadyna	
Junktyna	
Sorcyna	
FKBP12	
FKBP12.6	
Fosfolamban	
Kanały uwalniające wapń z mitochondrium	
MICU1	
Por permeabilizacyjny (PMT)	
Bufory Ca^{2+}	
Bufory cytozoliczne	
Kalbindyna D-28k	
Kalretynina	
Parwalbumina	
Bufory ER	
Kalneksyna	
Kalretikulina	
Kalsekwestryna	
GRP78	
GRP94	
Sensory Ca^{2+}	
Białka z domeną EF-hand	
Kalmodulina (CaM)	
Kalcyneuryna B (CaNB)	
Troponina C (TnC)	
Miro	

Kontynuacja na następnej stronie...

Tablica A.1 – *Lista białek biorących udział w tranporcie wapnia - kontynuacja...*

Białko	Opis
KInaza DAGα	
STIM	
ALG-2	
Białka S100	
S100A1–14	
S100B, S100C, S100P	
Neuronowe białka sensoryczne (NCS)	
NCS-1	
Hippokalcyna	
Neurokalcynaδ (TnC)	
Rekoweryna	
Białka wizyno-podobne VILIPs)	Białka wrażliwe na wapń, związują się z błoną komórkową pod wpływem wapnia
VILIP-1–3	
Białka aktywujące cyklazą guanylylową (GCAPs)	
GCAP1–3	
Białka związane z kanałami Kv (KChIPs)	
KChIP1–4	
Białka wiążące Ca^{2+} CaBPs)	
Kaldendryna	
L-CaBP1	
S-CaBP1	
CaBP2–5	
Kalneuron-1	
Kalneuron-2	
Białka z domeną C2	
Synaptotagminy	Sensory Ca^{2+} w błonach zakończeń aksonów
Synaptotagmina I–III	
Otoferyna	
Aneksyny	Białko wiążące fosfolipidy podczas apoptozy
Aneksyna A1–13	
Enzymy i procesy zależne od Ca^{2+}	
Enzymy regulowane Ca^{2+}	
Kinazy białkowe zależne od Ca^{2+} (CaMKs)	Fosforylazy Ser/Thr, aktywujące różne białka
CaMKI–IV	
MLCK	
Kinaza fosforylazowa	
Kinaza IP_3	
Pyk2	
Kinazy lipidowe	
hVps34	
PKC-α,βI, βII, γ	
Fosfodiesterazy	
Fosfodiesterazy cyklicznego GMP (PDE)	
PDE1A – C	
Cyklazy adenylylowe (ACs)	
AC-1	
AC-III	
AC-VIII	
AC-V	
AC-VI	
Oksydazy (DUOX1-2)	

Kontynuacja na następnej stronie...

Tablica A.1 – *Lista białek biorących udział w tranporcie wapnia - kontynuacja...*

Białko	**Opis**
Syntaza NO (NOS)	
Nabłonkowa NOS (eNOS)	
Neuronowa NOS (nNOS)	
Aktywowane Ca^{2+} proteazy	
Kalpanina I – II	
Czynniki transkrypcyjne	
NFAT	Zależny od Ca^{2+} aktywator limfocytów T
NFATc1–4	
CREB	Regulator homeostazy glukozowej
DREAM	Zaangażowany w przekaźnictwie bólu
CBP	
Pompy wapniowe	
Pompy Ca^{2+} błony komórkowej (PMCAs)	
PMCA1–4	
Pompy Ca^{2+} SER/ER (SERCAs)	
SERCA1–3	
Pompy Ca^{2+} układu wydzielniczego (SPCA)	
SPCA1–2	
Wymienniki	
Wymieniki Na^{+}/Ca^{2+} (NCX)	
NCX1–3	
Wymieniki $Na^{+}/Ca^{2+}/K^{+}$ (NCKX)	
NCKX1–4	

Dodatek B

Procentowy udział błon biologicznych w komórce

Tablica B.1: Objętość hepatocytu = 5000μm^3, kom. trzustki = 1000μm^3. Całkowita powierzchnia błon lipidowych w hepatocycie = 110 000 μm^2, natomiast w kom. trzustki = 13 000 μm^2 [3].

Rodzaj błony lipidowej	**Procent całkowitej powierzchni błon**	
	Hepatocyt	**Komórki trzustki**
Plazmalemma	2	5
RER	35	60
SER	16	<1
Aparat Golgiego	7	10
Mitochondria		
OMM	7	4
IMM	32	17
Jądro		
Błona wewnętrzna jądra	0.2	0.7
Pęcherzyki wydzielnicze	NA	3
Lizosomy	0.4	NA
Peroksysomy	0.4	NA
Endosomy	0.4	NA