



Hücre İçi Serbest Ca⁺² Konsantrasyon Dinamiğinin Floresans Yöntemler ile İncelenmesi

Investigation of Intracellular Free Ca⁺² Concentration Dynamics with Fluorescence Methods

Figen Çiçek¹, İsmail Günay¹

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Adana, Turkey

ABSTRACT

Most of the extracellular stimulus arrive to the cell membrane result with the increase in cytoplasmic free Ca⁺² concentration [Ca⁺²]_i. Because of the huge Ca⁺² concentration differences between the cytoplasm (≈10⁻⁷ M) and extracellular fluid and endoplasmic reticulum (ER - which is the major Ca⁺² storage organelle in especially non electrically excitable cells) (≈10⁻³ M), a large electro-chemical gradient repel Ca⁺² to the plasma or ER. Therefore a signal which temporarily opens Ca⁺² channels, induce a fast influx of Ca⁺² through the cytosol and increase its concentration about 10-20 fold. At this organization free Ca⁺² functions as an intracellular signalling molecule and a second messenger. In this way many intracellular signalling proteins activated and cellular functions like gene expression, cell proliferation and division, apoptosis, and also myocyte contraction, endocrine cell degranulation and neuronal transmission are regulated. Thus, the key role of Ca⁺² in many intracellular process, makes the dynamic measurements necessary for an understanding of the signalling mechanisms. Fluorescence imaging techniques make possible of monitoring the spatiotemporal Ca⁺² response patterns in cytoplasm. In the last decades, especially their ease of loading, and minimum manipulations to the cell homeostasis, make these techniques unique with respect to the other methods.

Key words: Fluorescence, Ca⁺² imaging, IP3 signaling pathway.

ÖZET

Hücre membranına gelen uyarıların bir çoğu, sitoplazmik serbest Ca⁺² derişiminde ([Ca⁺²]_i) artışa



neden olur. Ca²⁺'un sitozoldeki konsantrasyonunun oldukça düşük ($\approx 10^{-7}$ M), hücre dışı sıvıdaki ve endoplazmik retikulumdaki (ER) ($\approx 10^{-3}$ M) konsantrasyonunun ise yüksek olmasından dolayı, pek çok hücrede Ca²⁺ hücre içi sinyal molekülü ve ikinci haberci olarak kullanılır. Ca²⁺'u, plazma ve ER membranlarından sitozole doğru iten böyle büyük bir elektro-kimyasal gradient nedeni ile plazma ya da ER membranlarında bulunan Ca²⁺ kanallarının geçici olarak açılmasını sağlayacak bir sinyal, Ca²⁺ un hızla sitozole akmasına ve [Ca²⁺]_i'nin 10-20 kat artmasına neden olur. Böylece hücre içinde bulunan Ca²⁺'a duyarlı proteinler aktive olarak bir çok hücre fonksiyonunun yerine getirilmesi sağlanır. Örneğin gen ekspresyonu, hücre çoğalması, bölünmesi, apoptoz ve ayrıca kas hücrelerinde kasılma, salgı hücrelerinde degranülasyon ve sinirsel iletim gibi olayların tetiklenmesinde Ca²⁺ kilit rol oynar. Bu nedenle [Ca²⁺]_i'nin dinamik olarak ölçülebilmesi, hücrede gerçekleşen pek çok sinyalizasyon mekanizmasının anlaşılmasında önemli bir yer tutar. Floresans görüntüleme teknikleri, Ca²⁺'un hücre içinde uzay/zaman değişim desenlerini takip edilebilir duruma getirmiştir ve bu sayede bu tekniklerin kullanıldığı yöntemler de son yıllarda gelişerek artmıştır. Özellikle floresans boyaların kullanım kolaylıkları ve hücre homeostazına müdahalenin diğer metotlara göre minimum oranda kalması, bu metotların kullanımının önünü açmıştır.

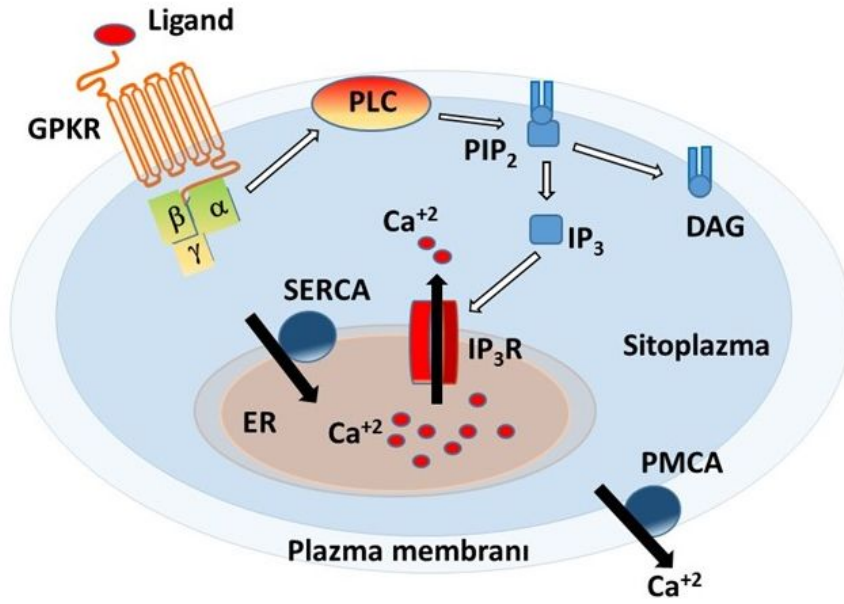
Anahtar kelimeler: Floresans, Ca²⁺ görüntüleme, IP₃ sinyal yolağı.

Giriş

Hücrede gerçekleşen büyüme, çoğalma, kopyalama ve apoptoz gibi yaşamsal faaliyetlerin düzenlenmesi ve devamı süreçlerinde, kasların kasılmasından nöronal iletime kadar geniş bir fizyolojik yanıt ağında, Ca²⁺ bir hücre içi haberci olarak kullanılmaktadır¹⁻⁴. Hücredeki pek çok aktivitenin oluşumunu veya devamlılığını sağlayan bu iyonun bu kadar çeşitli sinyal yolağında görev alabilmesi, konsantrasyon artışının uzaysal ve zamansal olarak düzenlenebilmesi ile mümkün olmaktadır. Ca²⁺'un konsantrasyonu hücre dışı ortamda milimolarlar (mM) düzeyindeyken, dinlenme durumunda sitoplazmada 10 ile 100 nM'lar dolayında bulunur. Temel olarak bu 10,000 katlık fark sayesinde hücre membranına gelen çeşitli uyarımlar, örneğin iyon kanalları vasıtası ile doğrudan veya dolaylı olarak reseptör aracılı yanıt oluşturup, hücre içinde Ca²⁺'un artmasına neden olabilmektedirler⁵.

Elektriksel olarak uyarılmayan hücrelerde hücre içi serbest Ca²⁺ konsantrasyonundaki ([Ca²⁺]_i) artış yollarından bir tanesi G proteini kenetli reseptöre (GPCR) ligand (hormon, nörotransmitter) bağlanmasıdır (Şekil 1). Konformasyonel dönüşüme uğrayan reseptör, membranın iç tarafında bulunan heterotrimerik Gq- α 'yı aktive eder. Gq, plazma membranında yer alan bir enzim olan Fosfolipaz C'yi (PLC) aktive eder. Aktif durumdaki PLC,

bir fosfolipid olan fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat'ı (PtdIns(4,5)P₂ veya PIP₂) inositol 1,4,5-trisfosfat (IP₃) ve diasilgliserol'e (DAG) hidrolize eder. Oluşan bu ikinci habercilerden IP₃ sitoplazmaya doğru diffüze olur ve Endoplazmik Retikulum (ER) membranında bulunan kendi reseptörüne (IP₃R) bağlanır. Bu bağlanma ile birlikte Ca⁺² kanalı açılır ve sitoplazmaya Ca⁺² salınımı gerçekleşir. Bu artışta kodlanan bilginin hedefine ulaştırılması sonrasında yeni sinyallerin algılanabilmesi için Ca⁺² konsantrasyonunun sitoplazmada bazal değerine dönmesi gerekir. Bunun için de hem ER'de, hem de plazma membranında yer alan Ca⁺² ATPazlar (SERCA ve PMCA) aktifleşerek sitoplazmayı Ca⁺²dan temizler. PMCA hücre dışına, SERCA ise ER'ye Ca⁺²'un taşınımını sağlar⁷⁻⁹. Ayrıca mitokondri ve sitoplazmik Ca⁺² tampon proteinleri (örn. kalmodulin) de hücre içi Ca⁺² sinyal dinamiğinde rol oynayan yapılardır^{10,11}.



Şekil 1. Gq proteini kenetli reseptör aracılığı ile oluşan hücre içi kalsiyum sinyalinin ana hatları.

GPCR: G proteini kenetli reseptör. PLC: Fosfolipaz C. PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat. IP₃: inositol 1,4,5-trisfosfat. DAG: Diasilgliserol. IP₃R: IP₃ Reseptörü. ER: Endoplazmik retikulum. SERCA: ER Ca⁺² ATPaz. PMCA: Plazma membran Ca⁺² ATPaz.

Hücrede IP₃ reseptör/Ca²⁺ kanalları uyarılmamış durumdayken rasgele açılır ve kapanırlar. Bu şekilde tek bir kanalın açılması literatürde Ca²⁺ blip olarak isimlendirilmiştir¹². IP₃ reseptörü ve miyositlerin sarkoplazmik retikulumlarındaki (SR) Ryanodin Reseptörleri (RyR) kümeler halinde bulunurlar. Tek bir IP₃R kümesinden Ca²⁺ salınması Ca²⁺ puff veya yine tek bir RyR kümesinden Ca²⁺ salınması Ca²⁺ *spark* olarak adlandırılmıştır¹³⁻¹⁵. Kardiyak ve iskelet kaslarında yapılan çalışmalarda *spark*ların kasılmaların aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Düz kaslarda ise Ca²⁺ ile aktive olan K⁺ akımlarını aktive ederek gevşemeye neden olduğu bildirilmiştir^{16,17}.

Ayrıca Ca²⁺ konsantrasyonu sitoplazmada artmaya başladıktan sonra kendi salınımını tetikleyerek SR/ER'dan daha fazla Ca²⁺un salınmasını tetiklemesi (Calcium induced Calcium Release-CICR) ancak sitoplazmada belli bir konsantrasyondan sonra da kendi salınımını inhibe etmesi, Ca²⁺ dinamiğinin anlaşılmasını zorlaştıran unsurlardır¹⁸. Hücrede birçok fizyolojik olayın oluşabilmesini sağlayan kalsiyumun, bu şekilde lokalden globale, osilatuar sinyalizasyondan tranziente varan çok farklı uzay-zaman desenlerinin incelenmesi ile hücrenin sinyal mekanizmaları daha açık ve net olarak anlaşılabilir¹⁹.

Floresans spektroskopisi iyonların uzay-zaman değişimlerinin bir arada görüntülenip ölçülebilmesini sağlayabilen önemli bir araçtır. Görüntülenecek materyalin floresans özelliği kazanması temeline dayanan bu teknik ile hücre içindeki pek çok molekül hakkında doğrudan veri alınabilmektedir. Konsantrasyon değişimi hücre içi sinyalizasyonda kritik önem taşıyan Ca²⁺ gibi bir iyonun floresans spektroskopisi ile takip edilebilmesi hücre fizyolojisinin anlaşılmasına büyük bir katkı sunmaktadır.

Floresans Kavramı ve Floresans Boyalar

Kimyasal yapısında ışığı yapabilen bir molekül (florofor) bulunduran bir materyal belirli bir dalga boyunda enerjisi (hc/λ) olan bir foton tarafından uyarıldığında, moleküldeki tekli temel seviyedeki elektron yine uyarılmış tekli seviyeye geçer. Uyarılmış tekli seviyelerdeki orbitalde bulunan elektron, temel seviye orbitalinde bulunan ikinci bir elektron ile çiftlendiğinden (ters spinli) hızlı bir foton yayılımı ile ışık yayarak (emisyon) temel seviyeye geri döner. Uyarın fotonun enerjisinin bir kısmı ısıyla kaybedildiğinden, salınan bu fotonun dalga boyu daha uzun, enerjisi ise daha az olacaktır (enerjideki bu fark Stokes Kayması olarak tanımlanır)²⁰.

Hücre İçi Ca^{+2} Konsantrasyonunun Görüntülenmesinde Kullanılan Floresans Ajanlar (Floroforlar)

Günümüzde birçok farklı hücrede floresans boyalar kullanılarak yapılan deneyler ile serbest Ca^{+2} 'un değişim desenleri hakkında bilgi sahibi olunmaktadır. Ayrıca, floresans boyalar kullanım kolaylığı ve hücrenin bütünlüğünü ve hemostazını koruması açısından vazgeçilmez deney araçları olmuşlardır.

Hücrede Ca^{+2} hakkında bilgi veren floresans olmayan metallokromik boya (boyaya Ca^{+2} bağlanması ile molekülün absorban spektrumu değişir) veya aquarin gibi kemilüminesan moleküllerin önemli dezavantajları vardır. Metallokromik boyalar Ca^{+2} 'a düşük afinite ile bağlanırlar²¹. Ayrıca NADPH (nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) ve sülfhidrillerle reaksiyona girerek serbest radikaller ve süperoksit oluşturma eğilimindedirler²¹⁻²³. Doğal formundaki aquarin'in ise Ca^{+2} 'a afinitesi büyüktür²⁴. Bir kaç μM seviyelerindeki Ca^{+2} konsantrasyonunun saptanması için uygun bir fotoproteindir²⁵. Ancak aquarin'e Ca^{+2} bağlandığında yayılan ışık oldukça azdır ve ayrıca yüksek Ca^{+2} varlığında geri dönüşümsüz olarak bozulur²⁶. Proteinin rekombinant formları ile mitokondri ve ER gibi organellerdeki Ca^{+2} derişimleri hakkında bilgi edinilmiştir. Ancak Ca^{+2} 'un ER içinde muhtemelen homojen dağılmıyor olması elde edilen sonuçları da tartışılır kılmıştır²⁷⁻³⁰.

Aequorea victoria tipi denizanasında, eşlikçisi aequarin ile keşfedilen yeşil floresans protein (GFP) de başka bir ışık duyarlı proteindir. Doğal ortamında bioluminesans ile mavi dalga boyunda ışımaya yapan aquarinden bu enerjiyi alan GFP yeşil dalga boyunda ışımaya yapar³¹. Hücrede GFP pek çok nedenle eksprese ettirilmektedir. Örneğin GFP cDNA'sı hedef hücreye yerleştirilerek yapılan ekspresyonun başarısı görüntülenebilir hale gelmekte ve PIP_2 gibi hücre içi yapılara takılarak hücre içi dinamiklerin değişimi incelenebilmektedir^{32,33}. Ca^{+2} ölçümünde ise GFP ve varyantları (CFP: cyan floresans protein, YFP: sarı floresans protein) genellikle kalmodulin (CaM) gibi bir Ca^{+2} bağlayan protein ile birleştirilerek hücrede eksprese ettirilir³⁴. Özellikle FRET (Förster Rezonans Enerji Transferi) tekniği içinde kullanılır³⁵.

GFP'nin net görüntü elde edebilmek için gerekli olan uzaysal dağılımı yeterince iyidir. Özel olarak bir hücreye veya organelle yerleştirilebilir. Optik özellikleri kullanışlıdır; eksitasyon dalga boyu görünür aralıktadır. Ancak bu proteinle çalışabilmek için gen transfeksiyonu gereklidir. Ayrıca yanıtlar, bitişirildiği Ca^{+2} bağlayan proteinin aktivitesi ile de orantılı olacaktır³⁰.

Kimyasal Floresans Problar (Floroforlar)

Sitoplazmik Ca²⁺ derişim bilgisini hücre homestazını koruyarak görüntülemek ve sinyal mekanizmalarındaki değişimleri dinamik olarak görüntüleyebilmek için floresans problar geliştirilmiştir. Bir Ca²⁺ şelatörü olan BAPTA'nın (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraasetik asit) karakteristik özelliklerinden türetilerek Ca²⁺'un mikroskop altında, dokuda ya da yapışık haldeki hücrelerde görüntülenmesi sağlanmıştır³⁶. Bu problar yaklaşık olarak 50 nM ile 50

olanlar sitoplazmada kullanılırken, düşük olanlar ise organellerdeki Ca²⁺'un görüntülenmesinde kullanılmaktadır. Ancak bu problar esas olarak kullanılacak metoda göre oran ölçümlü ve oran ölçümü olmayan (ratiometric ve nonratiometric) olarak ayrılırlar³⁸.

Oran Ölçümü Yapılabilen Floresans Boyalar

Oran ölçümü yapılabilen floresans boyalar kullanılarak, hücrenin farklı kesit alanlarından gelen sinyaller ve optik yoldan kaynaklanan hatalar düzeltilir. Fura-2 gibi boyalarda Ca²⁺ bağlanması ile birlikte uyarılma (eksitasyon) dalga boyu değişirken, indo-1 gibi boyalarda emisyon dalga boyu deęişir³⁹.

Fura 2

Uyarılma dalga boyu ultraviolet (UV) bölgededir. Boyanın serbest formu 380 nm'de, Ca²⁺ ile bağlı formu 340 nm'de uyarılır. Hücre dışı ortamda nominal Ca²⁺'suz durumda fura-2'nin karakteristik uyarılma spektrumu Şekil 2'deki gibidir. Tek dalgaboyunda 510 nm'de emisyon yapar. Sitoplazmik Ca²⁺ konsantrasyonunu görüntülemek için boyanın afinitesi ((Kd): 0,14 µM) uygundur. Luminal veya mitokondrideki Ca²⁺'un ölçülebilmesi için düşük afiniteli formları da mevcuttur: Bis-fura 2 (0,37 µM), fura 4F (0,77 µM), fura-FF (5,5 µM) bunlardan bazılarıdır³⁸.

Indo 1

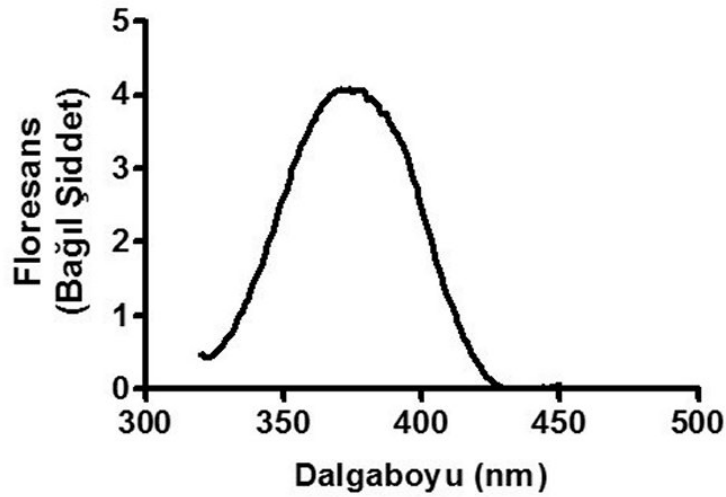
Fura'dan farklı olarak tek dalga boyunda uyarılır; ancak Ca²⁺ bağlı ve serbest formu iki ayrı dalga boyunda emisyon yapar. Boya 355 nm'de uyarılırken, serbest formunun 475 nm'deki emisyonu, Ca²⁺ bağlanması ile 400 nm'ye kayar. Indo-1'in Kd' si 0,23 µM ve boyanın başka bir formu olan indo-5F'nin Kd' si 0,47 µM' dur. Afiniteleri birbirine yakın olan bu iki boya özellikle deney sistemlerinin gerektirdiği şartlara göre tercih edilirler^{36,37}.

Oran ölçümü olmayan floresans boyalar

Ca⁺² ölçümlerinde genel olarak tercih edilen ancak oran ölçümü olmayan floresans boyaların başında fluo-3 ve rhod-2 bulunur.

Fluo-3

Bu prob flow sitometrik teknikleri^{40,41} ve konfokal mikroskop ile 488 nm argon laser ile uyarılarak Ca⁺² transienlerinin ve sparklarının ölçümü gibi^{7,42} pek çok farklı görüntüleme tekniğinde kullanılmaktadır. Fluo-3'e Ca⁺² bağlanması ile floresans şiddetinde 100 kattan fazla bir artış meydana gelir. Maksimum emisyonunu 525 nm'de gerçekleştirir. Fluo-3'ün Ca⁺² ile Kd'si 325 nM'dir. Fluo-3'ün başka bir analogu olan fluo-4'ün yapısı ve spektral özellikleri fluo-3 ile benzeşmekle birlikte, fluo-4 daha parlak bir floresans emisyonu yapar⁴³. Fluo-5F, fluo-5N, ve fluo-4FF de Ca⁺²'a afiniteleri düşük fluo-4 analoglarıdır. Hücre içi Ca⁺²'un 1 µM ile 1 mM seviyelerinde ölçüm yapmaya uygundur⁴⁴.



Şekil 2. Hücre dışında nominal Ca⁺² suz ortamda fura-2 için karakteristik uyarılma spektrumu.

Ölçüm HEK 293 hücrelerinde bir PMT'ye bağlı mikrospektroflorimetre aracılığı ile yapılmıştır. Hücre içine yüklenen fura-2, 330 nm ile 450 nm dalga boyları aralığında ardışık olarak uyarılmıştır.

Rhod-2

Ca²⁺'a afinitesi düşüktür (Kd: 570 nM). Bu özelliği ile özellikle mitokondrideki Ca²⁺ değişimlerinin incelenmesinde kullanılır. Uyarım dalga boyu 552 nm'dir. Molekül Ca²⁺ bağladığında 581 nm'de emisyon yapar ve floresan şiddeti 100 kattan fazla artar. Uyarılma ve emisyon dalga boyundaki kayma miktarı oldukça azdır. Boya seçiminde gözönünde tutulması gereken bir diğer faktör de boyanın uyarılma ve emisyon dalga boylarının kullanılacak deney sistemine uygun olmasıdır⁴⁵.

Hücre içerisine boya yüklenmesinde kullanılan başlıca teknikler

Asetoksimetil ester (AM) ile yükleme

Floresans boyalar çoğunlukla fizyolojik pH'da anyoniktir³⁶. Asetoksimetil Ester (AM) yağda çözünebilen bir molekül olduğundan hücre membranlarından kolaylıkla geçebilir⁴⁶. Floresans problemlerinin hücre içine esterlerle birlikte sokulması Tsien RY'nin⁴⁷ çalışmasına dayanır: Bu çalışmaya göre asetoksimetil gibi ester grupları proba birleştirilerek hidrofobik bir molekül oluşturulur. Bu şekilde plazma mebranından difüzyon aracılığı ile hücre içine girmesi sağlanır. Oluşturulan molekül hücre içine girmesi ile sitozolik esterazlar asetoksimetil esteri yıkarak molekülün yüklü ve hidrofilik durumda kalmasına neden olur ve böylece boya tekrar hücre dışına çıkamaz⁴⁸.

Mikro-enjeksiyon veya patch pipeti kullanarak doğrudan yükleme

Sitozolün fizyolojik içeriğine benzer bir solüsyon içinde hazırlanan boya, hücre yeterince büyükse mikro enjeksiyon ile daha küçükse patch pipetinden difüzyon ile hücre içine verilir. Ancak bu tekniklerde hücrenin sitoplazmik ortamına müdahale olduğu göz önünde bulundurulmalıdır⁴⁷.

Kalibrasyon

Kimyasal boyalar ayrıca hücredeki floresans şiddet değişimi olarak kaydedilen sinyallerin, [Ca²⁺]_i bilgisine dönüştürülmesine de olanak sağlar. Uyarımın tek dalga boyu ile yapıldığı boyalarda;

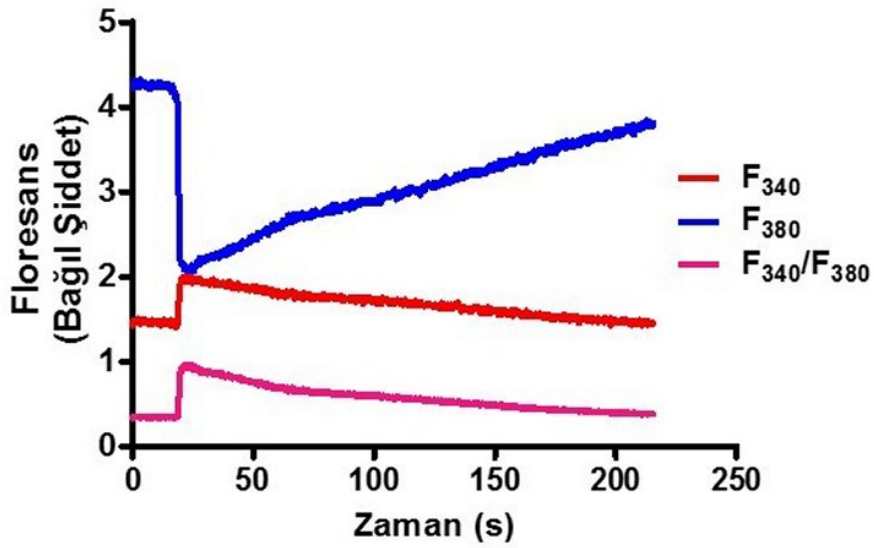
$$[Ca^{+2}]_i = K_d \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

İki dalga boyu (oran ölçümlü) ile yapıldığı uyarımlarda;

$$[Ca^{+2}]_s = K_d \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times F_{380max} / F_{380min}$$

Ölçüm değerlerinin sonucu denklemlere yerleştirildiğinde $[Ca^{+2}]_s$ değeri bulunur.

Üstteki denklemde F, deneysel olarak ölçülen floresans şiddeti, F_{min} ; ortamda Ca^{+2} olmadığı durumda, F_{max} ; boyanın Ca^{+2} 'a doydugu durumdaki floresans şiddetidir. Altta yer alan denklemde ise R, deneysel olarak ölçülen floresans şiddetlerinin oranı, R_{min} ortamda Ca^{+2} olmadığı durumdaki oran ve R_{max} boyanın Ca^{+2} 'a doydugu durumdaki oran bilgisidir. $F_{max}^{380} / F_{min}^{380}$ oranı ise 380 nm'de sıfır ve boyanın doydugu $[Ca^{+2}]$ için floresans şiddetleridir. K_d , kullanılan boyanın Ca^{+2} 'dan ayrışma sabitidir³⁶.

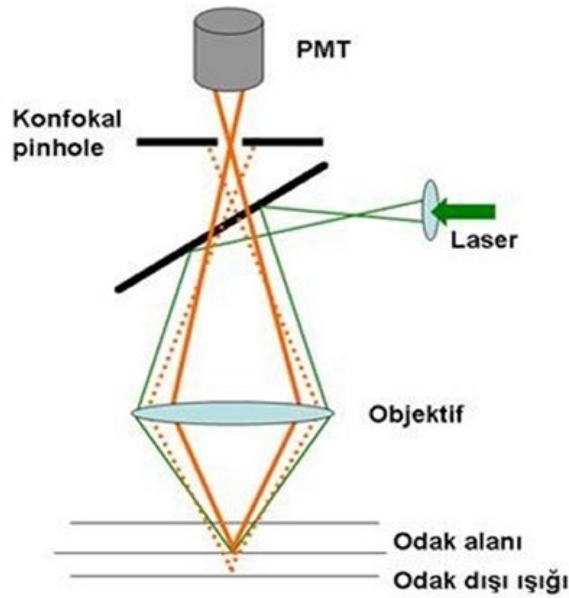


Şekil 3. Hürelere 25. saniyede agonist (10-4 M ACh) uygulanmasının ardından hücre içindeki fura-2'nin floresans şiddetindeki değişimler.

Uyarı ile birlikte sitoplazmada artan $[Ca^{+2}]_s$ ile birlikte, boyanın serbest formunun ışınması azalır (F380; mavi eğri), Ca^{+2} bağlı formunun ışınması artar (F340; kırmızı eğri). Cihaz sıralı bir şekilde bu ölçümleri gerçekleştirirken bilgisayar yazılımı ile de oran bilgisini hesaplar (F340/F380).

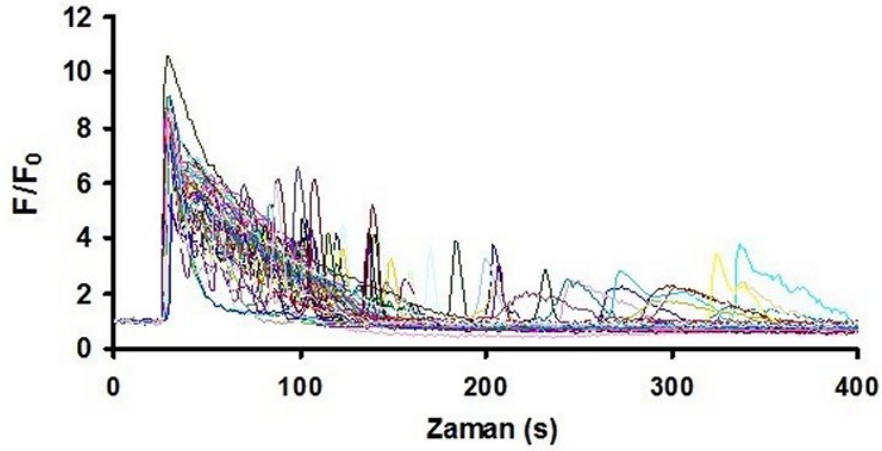
Ca²⁺'un uzay/zaman değişiminin ölçülmesi

Hücre içinde Ca²⁺ dinamiklerinin görüntülenebilmesi için spektrofotometre veya konfokal mikroskopisi kullanılmaktadır. Spektrofotometre ile yapılan ölçümlerde, florofora özgü uyarılma dalga boyu çoğunlukla bir monokromatör ile sağlanır. Bu sayede UV aralıkta uyarıma sahip oran ölçümlü boyalar (fura-2, indo-1 vb.) da kullanılabilir. Boyaların verdikleri foton emisyonları bir photon multiplier tüp (PMT) ya da CCDI kamera vasıtası ile elektrik sinyallerine ve bir bilgisayar yazılımı ile floresans şiddet bilgisine dönüştürülür. Yayılan sinyalin PMT'ye yönlendirilmesi ile odak bölgesindeki bütün hücrelerden aynı anda ortalama bir sinyal toplanmasına neden olur.



Şekil 4. Laser taramalı bir konfokal mikroskopta odak dışında kalan alandan gelen ışığın çözünürlüğe olan etkisini minimum boyutlarda tutmak için optik yola bir pinhole yerleştirilmiştir. Bu sayede optik çözünürlük artırılarak, istenilen odak alanına ait net görüntüler elde edilir. Bu görüntüler bilgisayar yazılımında çakıştırılarak hücreye ait 3 boyutlu yapılar da elde edilir.

CCDI kamera ile yapılan deneylerde ise odak alanı boyunca tek tek hücrelerden floresans bilgisi alınabilir. Ancak elde edilen görüntü de hücrenin topografik yapısı nedeniyle birçok hüresel katmanın ortalaması şeklinde olacaktır. Ayrıca optik kusurlarla birlikte, kırınım unsuru da Ca^{+2} sparkları gibi uzaysal Ca^{+2} değişim desenlerinin takibini zorlaştırır⁴⁹. Şekil 3'de Fura-2 ile yüklenen hücrelerin agonist (Asetilkolin) uyarısına yanıt olarak gelişen Ca^{+2} salınımı görülmektedir. PMT aracılığıyla toplanan sinyalde odak alanında bulunan yaklaşık 20 hücredeki floresans değişimi vardır. Data, yanıt veren ve vermeyen hücrelerin katkısını içerdiğinden ortalama bir yanıt biçimindedir.



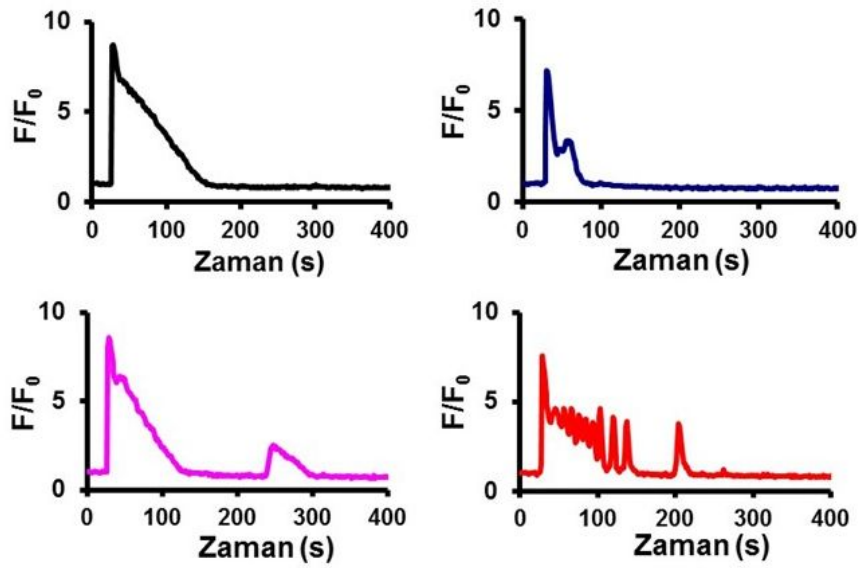
Şekil 5. Konfokal mikroskop kullanılarak yapılan deneyde hücreler fluo-3 ile boyanmıştır. ACh 10-4 M uyarısı ile birlikte yaklaşık 54 hücreden aynı deney zamanı boyunca toplanan Ca^{+2} yanıtları. Konfokal mikroskopun yazılımı, hücrenin zarı boyunca bir sınır çizerek sadece o hücrenin sitoplazmasındaki değişimin takip edilmesine olanak tanımaktadır. Bu deneyde odak içindeki 54 hücrenin sınırları çizilerek kayıt boyunca her bir hücredeki Ca^{+2} 'un zamansal değişimi görüntülenmiştir.

Laser Tarayıcı Konfokal Mikroskopi

Ca^{+2} ölçümlerinde konfokal mikroskopların kullanımı ile birlikte yüksek çözünürlüklü görüntüler elde edilmektedir⁴⁹. Florofor uyarımı laser ile yapıldığından, hücrenin z-ekseni boyunca istenilen bir katmana laser demeti odaklanabilmektedir. Ayrıca konfokal mikroskopisinin temel unsuru olan pinhole kırınım kusurlarını minimize ederek uzaysal Ca^{+2} değişim

desenlerinin elde edilmesini sağlar (Şekil 4). Çoklu PMT'lere yönlendirilmiş filtrelerle elde edilen sinyallerden hücrelere ait görüntüler oluşturulur.

Şekil 5'te asetilkolin uyarısı ile artan [Ca²⁺]_i, fluo-3 ile yüklenmiş hücrelerden bir konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir. Kaydedilmiş floresans şiddeti 54 hücreden aynı anda elde edilen artışları vermektedir. Konfokal mikroskopun taradığı odak alanında bulunan hücrelerin tek tek sınırları çizildiğinde her bir hücredeki Ca²⁺ yanıtlarının zamansal farklılıkları da kaydedilmiş olur (Şekil 6). Hücreler arasında bu kadar farklı Ca²⁺ yanıt desenleri görülmesinde, sitoplazmaya Ca²⁺ salınımını düzenleyen yapıların kinetikleri ve hücreden hücreye değişen ekspresyon yüzdeleri de bulunmaktadır⁵.



Şekil 6. Fluo-3 ile boyanmış hücrelerin 25. saniyede uygulanan ACh'e verdikleri Ca²⁺ yanıtları.

Örnek eğriler Şekil 4'teki 54 hücreli yanıt grafiğinden seçilmiştir. Her bir hücrenin deney süresince aynı miktar agonist uyarısına verdikleri farklı Ca²⁺ yanıt desenleri görülmektedir. Hücrelerdeki Ca²⁺ yanıt desenleri arasındaki farklılıklarda, sitoplazmaya Ca²⁺ salınımını düzenleyen yapıların hücreden hücreye değişen katkı yüzdeleri de rol oynamaktadır.

Sonuç

Ca²⁺ hücredeki en önemli ikinci habercilerden bir tanesidir. Pek çok sinyal yolağının aktivasyonu ise özellikle IP₃ reseptöründen sitoplazmaya Ca²⁺ salınması ve dinlenme durumunda nanomolar seviyelerinde bulunan [Ca²⁺]_i'un sitoplazmada artmaya başlaması ile gerçekleşir. Dolayısı ile bu iyonun sitoplazmadaki artış ve azalışının uzay ve zaman boyutu ile kusursuz şekilde düzenlenmesi gerekmektedir⁵⁰. Hücredeki pek çok aktivasyonda bu kadar kilit bir rol üstlenen Ca²⁺'un sitoplazmadaki dinamiklerinin araştırılması da hücre fiziolojisi hakkında birçok bilinmezi aydınlatmaktadır. Günümüzde floresans probalar Ca²⁺ dinamiğinin araştırılmasında bilim insanlarına önemli ölçüde yardım etmektedir. Gerek hücredeki global Ca²⁺ sinyal değişimlerinin doğrudan görüntülenmesi gerekse de lokal Ca²⁺ artışlarının takip edilmesi bu yöntemlerin kullanılması ile olanaklı bir duruma gelmiştir. Böylece hücredeki fizyolojik yanıt ağı daha mekanistik bir bakış açısı ile incelenerek, örneğin hastalık durumlarında yanıtlardaki olası değişimleri dinamik olarak takip etmenin yolu açılmıştır.

Kaynaklar

1. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P et al. Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol.* 2001;12:3-10.
2. Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron.* 1998;21:13-26.
3. Verkhratsky A. Calcium and cell death. *Subcell Biochem.* 2007;45:465-80.
4. Verkhratsky A, Petersen OH. The endoplasmic reticulum as an integrating signalling organelle: from neuronal signalling to neuronal death. *Eur J Pharmacol.* 2002;447:141-54.
5. Falcke M. Reading the patterns in living cells - the physics of Ca²⁺ signaling. *Advances in Physics.* 2004;53:255-440.
6. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793:933-940.
7. Cicek FA, Ozgur EO, Ozgur E, Ugur M. The interplay between plasma membrane and endoplasmic reticulum Ca(2+)ATPases in agonist-induced temporal Ca(2+) dynamics. *J Bioenerg Biomembr.* 2014;46:503-10.
8. Guerrero-Hernandez A, Dagnino-Acosta A, Verkhratsky A. An intelligent sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: release and leak channels have differential access to a concealed Ca²⁺ pool. *Cell Calcium.* 2010;48:143-9.
9. Brini M, Carafoli E. Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev.* 2009;89:1341-78.

10. Eisner V, Csordas G, Hajnoczky G. Interactions between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria in cardiac and skeletal muscle: pivotal roles in Ca²⁺(+) and reactive oxygen species signaling. *J Cell Sci.* 2013;126:2965-78.
11. Bossuyt J, Bers DM. Visualizing CaMKII and CaM activity: a paradigm of compartmentalized signaling. *J Mol Med (Berl).* 2013;91:907-16.
12. Swillens S, Champeil P, Combettes L, Dupont G. Stochastic simulation of a single inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ channel reveals repetitive openings during 'blip-like' Ca²⁺ transients. *Cell Calcium.* 1998;23:291-302.
13. Dickinson GD, Parker I. Temperature dependence of IP₃-mediated local and global Ca²⁺ signals. *Biophys J.* 2013;104:386-95.
14. Stern MD, Rios E, Maltsev VA. Life and death of a cardiac calcium spark. *J Gen Physiol.* 2013;142:257-74.
15. Cheng H, Lederer WJ. Calcium sparks. *Physiol Rev.* 2008;88:1491-1545.
16. Hove-Madsen L, Llach A, Bayes-Genis A, Roura S, Rodriguez Font E, Aris A et al. Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes. *Circulation.* 2004;110:1358-63.
17. Eisner DA, Trafford AW. A sideways look at sparks, quarks, puffs and blips. *J Physiol.* 1996;497(Pt 1):2.
18. Endo M. Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol Rev.* 2009;89:1153-76.
19. Dupont G. Modeling the intracellular organization of calcium signaling. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2014;6:227-37.
20. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., New York, Springer, 2006.
21. Borle AB. An overview of techniques for the measurement of calcium distribution, calcium fluxes, and cytosolic free calcium in mammalian cells. *Environ Health Perspect.* 1990;84:45-56.
22. Blinks JR, Wier WG, Hess P, Prendergast FG. Measurement of Ca²⁺ concentrations in living cells. *Prog Biophys Mol Biol.* 1982;40:1-114.
23. Beeler T. Oxidation of sulfhydryl groups and inhibition of the (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase by arsenazo III. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1027:264-67.
24. Alvarez J, Montero M. Measuring [Ca²⁺] in the endoplasmic reticulum with aequorin. *Cell Calcium.* 2002;32:251-60.
25. Solovyova N, Verkhatsky A. Monitoring of free calcium in the neuronal endoplasmic reticulum: an overview of modern approaches. *J Neurosci Methods.* 2002;122:1-12.
26. Shimomura O. Luminescence of aequorin is triggered by the binding of two calcium ions. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;211:359-63.
27. Montero M, Brini M, Marsault R, Alvarez J, Sitia R, Pozzan T et al. Monitoring dynamic changes in free Ca²⁺ concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells. *EMBO J.* 1995;14:5467-75.

28. Brini M, Pasti L, Bastianutto C, Murgia M, Pozzan T, Rizzuto R. Targeting of aequorin for calcium monitoring in intracellular compartments. *J Biolumin Chemilumin.* 1994;9:177-184.
29. Kendall JM, Badminton MN, Sala-Newby GB, Wilkinson GW, Campbell AK. Agonist-stimulated free calcium in subcellular compartments: delivery of recombinant aequorin to organelles using a replication deficient adenovirus vector. *Cell Calcium.* 1996;19:133-42.
30. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:509-44.
31. Dickson RM, Cubitt AB, Tsien RY, Moerner WE. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature.* 1997;388:355-8.
32. Loew LM. Where does all the PIP2 come from? *J Physiol.* 2007;582:945-51.
33. Hirose K, Kadowaki S, Tanabe M, Takeshima H, Lino M. Spatiotemporal dynamics of inositol 1,4,5-trisphosphate that underlies complex Ca²⁺ mobilization patterns. *Science.* 1999;284:1527-30.
34. Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M et al. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature.* 1997;388:882-7.
35. Takanishi CL, Bykova EA, Cheng W, Zheng J. GFP-based FRET analysis in live cells. *Brain Res.* 2006;1091:132-9.
36. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985;260:3440-50.
37. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. Chemical calcium indicators. *Methods.* 2008;46:143-51.
38. Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B. Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev.* 1999;79:1089-1125.
39. Mason WT. *Fluorescent and luminescent Probes for Biological Activity: A Practical Guide to Technology for Quantative Real-Time Analysis.* 2nd ed.. San Diego ; London, Academic Press, 1999.
40. Greimers R, Trebak M, Moutschen M, Jacobs N, Boniver J. Improved four-color flow cytometry method using fluo-3 and triple immunofluorescence for analysis of intracellular calcium ion ([Ca²⁺]_i) fluxes among mouse lymph node B- and T-lymphocyte subsets. *Cytometry.* 1996;23:205-17.
41. Pande G, Kumar NA, Manogaran PS. Flow cytometric study of changes in the intracellular free calcium during the cell cycle. *Cytometry.* 1996;24:55-63.
42. Tuncay E, Okatan EN, Vassort G, Turan B. ss-blocker timolol prevents arrhythmogenic Ca²⁺(+) release and normalizes Ca²⁺(+) and Zn²⁺(+) dyshomeostasis in hyperglycemic rat heart. *PLoS One.* 2013;8:e71014.
43. Kao JP, Harootunian AT, Tsien RY. Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J Biol Chem.* 1989;264:8179-84.

44. Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium*. 2000;27:97-106.
45. Brandes R, and Bers DM. Simultaneous measurements of mitochondrial NADH and Ca(2+) during increased work in intact rat heart trabeculae. *Biophys J*. 2002;83:587-604.
46. Hayashi H, and Miyata H. Fluorescence imaging of intracellular Ca²⁺. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1994;31:1-10.
47. Tsien RY. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*. 1981;290:527-8.
48. Jobsis PD, Rothstein EC, and Balaban RS. Limited utility of acetoxymethyl (AM)-based intracellular delivery systems, in vivo: interference by extracellular esterases. *J Microsc*. 2007;226:74-81.
49. Williams DA. Mechanisms of calcium release and propagation in cardiac cells. Do studies with confocal microscopy add to our understanding? *Cell Calcium*. 1993;14:724-35.
50. Miyazaki S. Inositol trisphosphate receptor mediated spatiotemporal calcium signalling. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7:190-6.

Correspondence Address / Yazışma Adresi

Figen Çiçek
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Biyofizik Anabilim Dalı,
Adana, Turkey
e-mail: fcicek@cu.edu.tr

Geliş tarihi/ Received: 09.12.2015**Kabul tarihi/ Accepted:** 06.01.2016