

# Kalzium-Oszillationen und Genexpression

Sebastian Köhler

13. Februar 2006

## Zusammenfassung

In dem referierten Paper [2] wurde eine neue Methode zur Generierung von homogenen Kalzium-Oszillationen in T-Lymphozyten entwickelt. Diese wurde zur Untersuchung der Auswirkung von Kalzium-Wellen, die sich in Amplitude und Frequenz unterschieden, auf die Aktivität bestimmter Transkriptionsfaktoren genutzt. Man konnte auf diesem Weg nachweisen, dass Oszillationen auch bei geringen Konzentrationen (niedrige Amplituden) Genexpression aktivieren können. Des Weiteren konnte man zeigen, dass die Frequenz der Oszillationen kodiert, welche Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Mit diesem Mechanismus können Zellen steuern, welche speziellen Gene in der Zelle exprimiert werden sollen.

## 1 Einleitung

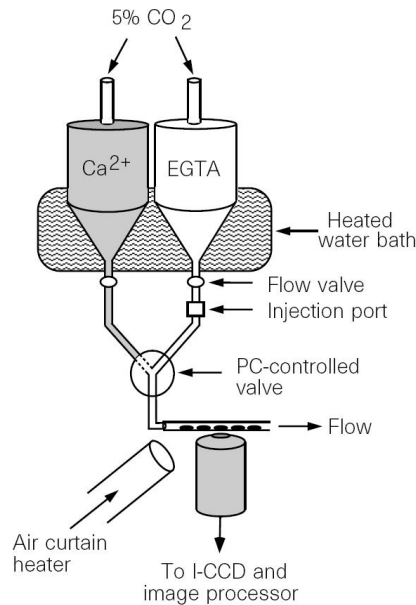
Kalzium ist eines der wichtigsten Mineralien von vielen Organismen. So enthält zum Beispiel der menschliche Körper 1 bis 1.5 kg Kalzium, wovon natürlich ca. 98% zum Knochenbau gehören. Die restlichen 2% sind allerdings nicht minder wichtig, denn Kalzium ist unter anderem an diversen Signalwegen beteiligt [3]. Ein wichtiges Beispiel ist die Befruchtung einer Eizelle, bei der die gesamte Zelloberfläche möglichst schnell erfahren muss, dass die Zelle befruchtet wurde, damit nur ein Spermium in sie eindringt. Dieses Signal wird mit einer Kalziumwelle verbreitet.

Im Normalfall halten Zellen die zytosolische Kalzium-Konzentration sehr gering (10-100 nM). Sie nutzen dazu spezielle Mechanismen, die das Kalzium aus der Zelle heraus oder in intrazelluläre Speicher-Kompartimente, wie das Endoplasmatische Retikulum oder die Mitochondrien pumpen. Des Weiteren existiert eine Vielzahl von Kalzium-bindenden Proteinen im Inneren von Zellen, die eine Art Pufferwirkung besitzen. Durch bestimmte Signale kann jedoch ein plötzlicher Anstieg der intrazellulären Konzentration hervorgerufen werden. Diese liegt dann bei 500 bis 1000 nM. Allerdings verfügen Zellen neben den oben genannten Mechanismen zur Senkung der intrazellulären Kalzium-Konzentration noch über weitere Möglichkeiten dies zu erreichen, so dass hohe Konzentrationen die Form von Spikes besitzen. Es wird in kurzer Zeit wieder die Ausgangssituation erreicht und die Kalziumkonzentration auf niedrigem Level gehalten. Dieser Vorgang kann sich periodisch wiederholen. Man spricht dann von Kalzium-Oszillationen oder Kalzium-Wellen.

Die genaue Funktion von Kalzium-Oszillationen bei Signaltransduktionsprozessen ist noch nicht komplett aufgeklärt. Es gibt jedoch Anzeichen dafür, dass diese die Genauigkeit gerade bei Signalprozessen auf niedrigem Level steigern können. Außerdem können sie Zellen dabei unterstützen für Signale sensibel zu bleiben (bei konstantem Signaleingang) und die Spezifität dieser zu steigern. Diese Vermutungen ließen sich aber bisher schwer nachweisen, da sowohl die Amplitude als auch die Frequenz solcher Wellen von Zelle zu Zelle und über die Zeit sehr variabel sind. Weiterhin sind die entsprechenden Oberflächenrezeptoren, welche den Anstieg der Konzentration induzieren, meist an diverse Signalwege gekoppelt, wodurch die Effekte auf die weiteren Teilnehmer der Signalkaskade der Kalzium-Ionen schwer nachzuprüfen sind.

## 2 Generierung von Kalzium-Signalen

Es wurde eine sehr genaue Methode entwickelt, mit der man kontrolliert homogene Kalzium-Wellen in T-Lymphozyten generieren kann. Man kann in den Zellen Oszillationen mit einer beliebigen



**Abbildung 1:** Funktionsweise der Apparatur zur Erzeugung homogener Kalzium-Wellen in speziell behandelten T-Lymphozyten. Die intrazellulären Oszillationen werden über die kontrollierte Änderung der extrazellulären Kalzium-Konzentration ermöglicht. Man kann somit die Amplituden, Frequenzen und den Zeitraum der Oszillationen frei wählen.

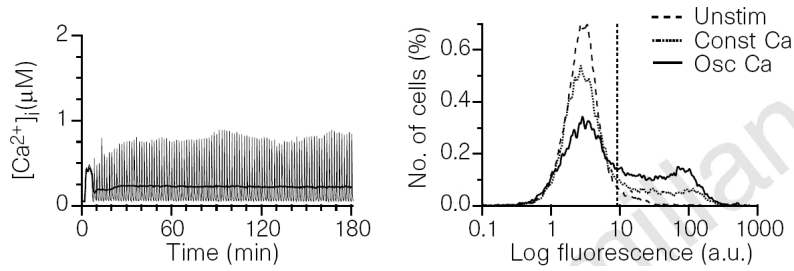
Amplitude und Frequenz auslösen. Um dies zu erreichen hat man die Zellen mit Thapsigargin behandelt, welches den Mechanismus zur Kalzium-Entleerung des Endoplasmatischen Retikulums inhibiert. Außerdem führt dies zur irreversiblen Aktivierung von Kanälen, durch die Kalzium in die Zelle gelangen kann. Somit kann man über den extrazellulären Kalziumgehalt die intrazelluläre Konzentration steuern. Die Arbeitsweise der zu diesem Zweck konstruierten Maschine ist in Abbildung 1 zu sehen.

### 3 Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Kalzium

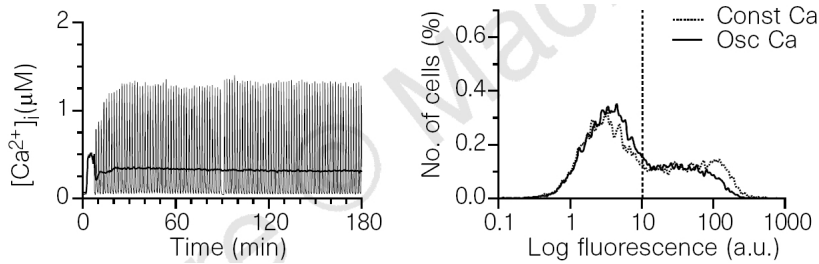
Die in Abschnitt 2 erwähnte Technik wurde zur Untersuchung der Abhängigkeit von Genexpressionswegen von der Amplitude und der Frequenz von Kalzium-Oszillationen verwendet. NF-AT ist ein Kalzium-Ionen abhängiger Transkriptionsfaktor, welcher durch Kalzium stimulierte Dephosphorylierung in den Zellkern transloziert wird [4].

#### Steuerung der Effizienz der Aktivierung von TF's

Um die Steuerung der Effizienz der Aktivierung von NF-AT durch Kalzium-Signale zu testen, wurden die T-Lymphozyten konstant bzw. oszillatorisch für 3 Stunden mit Kalzium behandelt. Dabei wurden die Konzentrationen so gewählt, dass im Durchschnitt die gleiche Menge (bei oszillatorischem und konstantem Signal) in die Zelle gelangt. Anschließend wurde mit einem Reportergenassay die Aktivität des Transkriptionsfaktors gemessen. Bei einer durchschnittlichen Konzentration von 225 nM konnte in 19% der Zellen ein signifikanter Anstieg in der Aktivität von NF-AT beobachtet werden. Von den mit einem oszillatorischen Signal behandelten T-Lymphozyten waren es 39% der Zellen, die eine höhere Aktivität von NF-AT aufwiesen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 zu erkennen. Dieser Effekt ist allerdings von der Konzentration des Kalziums abhängig. In Abbildung 3 kann man erkennen, dass bei höheren Konzentrationen kein Unterschied mehr zwischen den mit einem konstanten und den mit einem oszillatorischen Kalziumsignal versorgten Zellen mehr besteht.



**Abbildung 2:** Unterschiede in der Aktivierung von NF-AT in T-Lymphozyten. Verglichen wurden unstimulierte Zellen, Zellen die mit einem konstanten Kalzium-Signal behandelt wurden und oszillatorisch aktivierte Zellen. Die Konzentration des Kalziums betrug 225 nM.

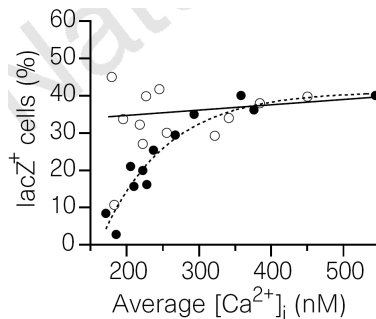


**Abbildung 3:** Bei höheren Kalzium-Konzentrationen sind kaum noch Unterschiede in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-AT in Zellen mit konstantem bzw. oszillatorischem Kalzium-Signal zu erkennen. Hier wurden die Zellen mit einer Konzentration von 359 nM behandelt.

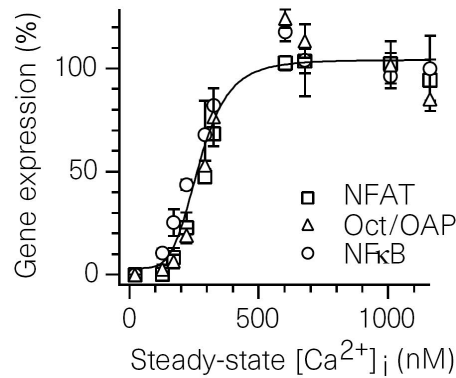
Bei niedrigen Konzentrationen tritt der Effekt auf, dass das konstante Kalzium-Signal zu fast keiner Aktivierung von NF-AT mehr führt, wohingegen Oszillationen auch in diesem Bereich eine stetige Aktivierung induzieren. Diese Zusammenhänge sind noch einmal in Abbildung 4 gezeigt. Dort ist gut zu erkennen, dass eine Steigerung der Expression der von NF-AT abhängigen Gene durch Oszillationen nur bis zu einer Kalzium-Konzentration von 300 nM erreicht werden kann.

### Spezifische Aktivierung von Genexpression

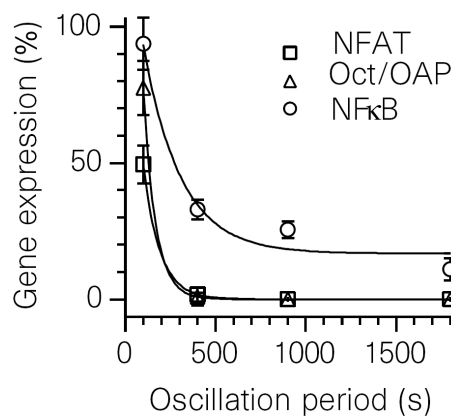
Da Kalzium-Ionen auf diverse intrazelluläre Ziele wirken und bekannt ist, dass Kalzium-Signale trotzdem gezielt einzelne Signalwege ansprechen können, wurde untersucht ob Amplitude und/oder Frequenz von Kalzium-Oszillationen kodieren können, welcher Signalweg angesprochen wird. Dazu



**Abbildung 4:** Bis zu einer Konzentration von 300 nM kann eine Steigerung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-AT durch ein oszillatorisches Kalzium-Signal gegenüber einem konstanten Signal gleicher Konzentration erreicht werden.



**Abbildung 5:** Um zu überprüfen, ob die Spezifität der Kalzium-Wellen in der Amplitude kodiert ist, wurden die Zellen mit konstanten Kalzium-Signalen diverser Konzentrationen behandelt. Allerdings zeigen alle drei Transkriptionsfaktoren die gleiche Abhängigkeit von der Kalzium-Konzentration.

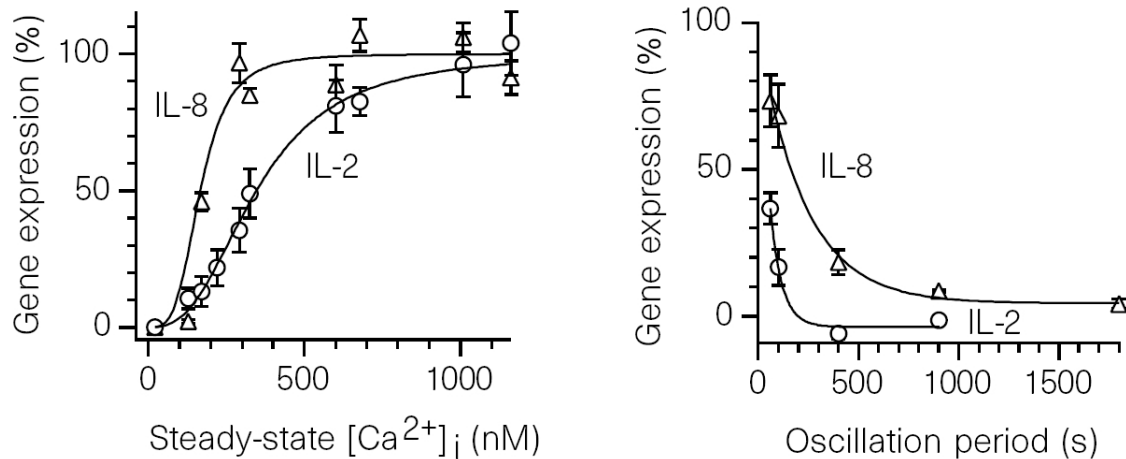


**Abbildung 6:** Mit steigender Periode zwischen den Oszillations-Spikes sinkt die Aktivierung aller drei Transkriptionsfaktoren. Wichtig ist jedoch, dass NF- $\kappa$ B auch noch bei sehr niedrigen Frequenzen auf einem Level von ca. 20% exprimiert wird. Die beiden anderen untersuchten Transkriptionsfaktoren zeigen schon ab einer Periodenlänge von 400s keine Aktivität mehr.

untersuchte man drei Transkriptionsfaktoren die Kalzium-abhängig sind. Diese sind NF-AT, NF- $\kappa$ B und Oct/OAP.

Um zu überprüfen, ob verschiedene Amplituden ein unterschiedliches Aktivitätsprofil in diesen drei Transkriptionsfaktoren hervorrufen können, wurde die Expression der jeweiligen Reportergene bei einem konstanten Kalzium-Signal unterschiedlicher Konzentration gemessen. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 5 zu sehen. Die Aktivitäten der drei Transkriptionsfaktoren zeigen eine gleiche nichtlineare Abhängigkeit von der konstanten Kalzium-Konzentration. Daraus wurde geschlossen, dass die Spezifität nicht in der Amplitude der Oszillationen kodiert sein kann.

Um zu testen, ob das gezielte Ansprechen nur eines Signalweges in der Frequenz von Kalzium-Oszillationen kodiert ist, wurden Oszillationen mit hoher Amplitude und Perioden von 100s bis 1800s zwischen den Oszillationen erzeugt. In Abbildung 6 ist zu erkennen, dass die Aktivierung aller drei untersuchten Transkriptionsfaktoren mit dem Anstieg der Perioden (Abfall der Frequenz) fällt. Allerdings kann man sehen, dass NF- $\kappa$ B auch bei niedrigen Frequenzen aktiviert werden kann. Die beiden anderen Transkriptionsfaktoren zeigen im Gegensatz dazu schon ab Periodenlängen von 400 s zwischen den Oszillationen keine Aktivität mehr. Eine Erklärung dafür ist, dass NF- $\kappa$ B, wenn es einmal aktiviert wurde bis zu 16 Minuten im Zellkern bleibt, wohingegen die anderen beiden Transkriptionsfaktoren dort nur kurz bleiben [1]. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolge-



**Abbildung 7:** *links:* Gene, deren Expression von den drei untersuchten Transkriptionsfaktoren gesteuert werden, zeigen fast gleiche Abhängigkeit von der Konzentration des steady-state Kalzium-Signals. Somit kann die Amplitude von Kalzium-Wellen nicht die Spezifität der Expression steuern.

*rechts:* Die Expression der untersuchten Gene zeigt eine Abhängigkeit von Periode zwischen den Kalzium-Oszillationen. Das vor allem von  $NF-\kappa B$  gesteuerte IL-8 wird auch noch bei niedrigen Frequenzen exprimiert. IL-2, das hauptsächlich von  $NF-AT$  und Oct/OAP abhängig ist, wird nur bis Perioden von 400 Sekunden exprimiert.

zung zu, dass die Frequenz der Kalzium-Oszillationen bestimmt, welche Signalwege angesprochen werden. Niedrige Frequenzen aktivieren lediglich  $NF-\kappa B$ , hohe Frequenzen aktivieren hingegen alle drei Transkriptionsfaktoren. Die Kalzium-Oszillations-Frequenz kann also zwischen verschiedenen Signalwegen unterscheiden.

Dies war ein Indiz dafür, dass auch die Expression der Gene, die von diesen Transkriptionsfaktoren reguliert werden, unterschiedlich auf Oszillations-Frequenzen reagieren. Dazu führte man einen ähnlichen Versuch durch. Untersucht wurde nun die Frequenz-Sensitivität der Expression der Gene für IL-2 und IL-8. IL-2 ist ein Wachstumsfaktor für T-Zellen und IL-8 ist ein Chemokin zur Rekrutierung von Immunzellen zur Infektion. Die Expression kann bei beiden Genen durch Kalzium-Ionen induziert werden. Ihre Expression wird jedoch von verschiedenen Kombinationen von Transkriptionsfaktoren gesteuert. Bei IL-2 steuern  $NF-AT$  und Oct/OAP die Expression, wohingegen bei IL-8 vor allem  $NF-\kappa B$  diese Funktion übernimmt. Für die Untersuchung hat man in die Zelle Luciferase-Reportergenkonstrukte eingebaut, deren Expression von den IL-2 und IL-8 Promotern gesteuert wurden. Bei konstantem Signal zeigte sich, dass beide Gene, wenn auch IL-8 etwas sensitiver, auf das konstante Signal reagieren. Dies ist auch noch einmal in Abbildung 7 (links) dargestellt.

Wenn man die Zellen hingegen mit Kalzium-Oszillationen behandelt kann man erkennen (Abbildung 7 (rechts)), dass IL-2 nur exprimiert wird, wenn die Perioden zwischen den Oszillations-Spikes länger als 400 Sekunden betragen. Unter diesen Bedingungen hat IL-8 allerdings noch 20% seiner maximalen Expressionsaktivität. Es konnte somit gezeigt werden, dass Oszillationen in verschiedenen Frequenzen zur Aktivierung verschiedener Signalwege führen - vermutlich durch die Effekte auf die entsprechenden Transkriptionsfaktoren.

## 4 Ergebnisse

Es wurden zwei wichtige Eigenschaften des Signalling durch Kalzium-Oszillationen untersucht.

Die Effektivität kann besonders im Bereich niedriger Stimulationen gesteigert werden. Dieser Effekt kommt durch die hoch-nichtlineare Abhängigkeit der Transkription vom zytosolischen Kalziumgehalt zustande. Somit können Oszillationen periodisch den Schwellenwert für die Akti-

vierung überschreiten, wohingegen ein konstantes Signal mit gleicher durchschnittlicher Stärke das nicht schafft. Die Tendenz zu oszillieren, wenn die Rezeptoren nur wenig besetzt sind, dient der Optimierung der Sensitivität zur Erkennung schwacher externer Signale.

Oszillationen geben einem Signal ( $\text{Ca}^{2+}$ ), dass sehr viele Signalwege beeinflusst, die Möglichkeit spezifische daraus anzusprechen. Durch getrennte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und somit Expression verschiedener Mengen an Genen, könnte die Oszillationsfrequenz ein wichtiges Werkzeug sein um Zellen in bestimmte Entwicklungsphasen zu lenken. Dafür spricht auch, dass die Transkriptionsfaktoren NF-AT und NF- $\kappa$ B in vielen Zelltypen vorhanden sind und Oszillationen mit Perioden von Sekunden bis Stunden auftreten können.

## Literatur

- [1] Ricardo E. Dolmetsch et al. Differential activation of transcription factors induced by  $\text{Ca}^{2+}$  response amplitude and duration. *Nature*, 386:855–858, April 1997.
- [2] Ricardo E. Dolmetsch et al. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*, 392:933–936, April 1998.
- [3] Jan Koolman. *Color Atlas of Biochemistry*. Thieme, 2005.
- [4] Gerhard Krauss. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Wiley, 2001.