

METODY MĚŘENÍ KONCENTRACE Ca^{2+} IONTŮ POUŽITELNÉ PŘI STUDIU BUNĚČNÉ SIGNALIZACE

ONDŘEJ KRINKE^a, ZUZANA NOVOTNÁ^a,
OLGA VALENTOVÁ^a a JAN MARTINEC^b

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6, ^bÚstav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6
martinec@ueb.cas.cz

Došlo 29.6.04, přijato 20.1.05.

Klíčová slova: vápenaté ionty, buněčná signalizace

Obsah

1. Úvod: buněčná signalizace spojená s Ca^{2+}
2. Elektrochemické metody
3. Radiometrická metoda měření koncentrace Ca^{2+} *in vitro*
4. Bioluminiscenční indikátory Ca^{2+}
5. Fluorescenční indikátory Ca^{2+}
6. Fluorescenční proteiny
7. Závěr

1. Úvod: buněčná signalizace spojená s Ca^{2+}

Obecnou vlastností všech živých buněk je jejich schopnost reagovat na nejrůznější vnější podněty. Tyto vnější podněty (signály) jsou obvykle zachycovány na povrchu buněk receptory a přenášeny přes membrány dále do buněk tzv. signálními systémy. Významnou roli v mnoha buněčných signálních dráhách hrají ionty Ca^{2+} . Depolarizace plasmatické membrány, mechanické poškození nebo hormonální aktivace¹ živočišných buněk jakož i působení fytohormonů, modulačních faktorů a různých typů stresu na rostlinné buňky² jsou příklady podnětů, jež vedou ke změnám cytosolické koncentrace Ca^{2+} , která je v živé buňce udržována řadou mechanismů na velmi nízké hladině ($10^{-7} - 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$). Ve většině buněk se při tomto typu signalizace zvyšuje koncentrace Ca^{2+} v cytosolu, odkud tyto ionty difundují do jádra buňky nebo jsou odčerpávány do mitochondriální matrix, v rostlinných buňkách je jejich častým cílem vakuola. Koncentrace Ca^{2+} uvnitř buněk je regulována koordinací protichůdných mechanismů (tj. iontovými kanály specifickými pro Ca^{2+} a Ca^{2+} -transportujícími ATPasami). Látkami reagujícími na změny v koncentraci Ca^{2+} jsou nejčastěji nejrůznější proteinkiny, které následně fosforylací transkripčních faktorů vyvolávají změnu fyziologického stavu buňky. Dnes je zřejmé, že signály spojené se změnami v koncentraci Ca^{2+}

mají složité časoprostorové průběhy^{3,4}.

Ke studiu mechanismů vedoucích ke změně koncentrace Ca^{2+} je možno využít mnoha rozličných metod. Sledovat změny v koncentraci Ca^{2+} lze buď přímo v živých buňkách (*in vivo*), ať už v izolovaných buňkách či v buňkách, které jsou součástí tkání či pletiv nebo při studiu dílčích kroků či komponent signálního systému v izolovaných a rekonstituovaných membránových váčcích (*in vitro*) (např. studium iontových kanálů vyskytujících se v některé z buněčných membrán). Metody studia musí být tedy minimálně invazivní a nejlépe takové, které umožní odděleně studovat změny koncentrace Ca^{2+} v jednotlivých buněčných kompartmentech a následně také určit jejich vzájemné vazby. Tento článek popisuje nejrozšířenější metody založené na různých fyzikálních principech a diskutuje jejich výhody a úskalí.

2. Elektrochemické metody

Koncentraci vápenatých iontů lze měřit přímo potenciometricky iontově selektivními elektrodami⁵. Tuto metodu lze použít jak pro měření *in vivo* (elektroda je „zapíchnuta“ do buňky), tak i *in vitro*. Koncentrační rozsah Ca^{2+} se běžně vyjadřuje v logaritmické škále pCa ($\text{pCa} = -\log a_{\text{Ca}^{2+}}$). Iontově selektivní elektrody pro Ca^{2+} mají široký dynamický rozsah (pCa 1 až 9, komerčně dostupné jsou však pouze do pCa 7). Jsou též vynikající pro kalibraci roztoků Ca^{2+} a mohou být použity i *in vivo* ke kalibraci signálu získaného fluorescenčními indikátory⁶ (viz dále). Prodlěva odpovědi iontově selektivní elektrody na změnu v koncentraci volných Ca^{2+} je nicméně poměrně dlouhá (~0,5–1 s). Iontově selektivní elektrody lze v laboratoři vyrobit zabudováním některého chelatačního činidla (ligandu) do kapalné lipofilní membrány⁷.

Variantou této iontově selektivní elektrody je vibrující sonda selektivní pro Ca^{2+} (cit.⁸). Ta byla původně navržena pro měření malých extracelulárních iontových proudů. Vibrační sondy citlivé na rozdíl potenciálů mezi dvěma body (mezi měřeným a referenčním) probíhá autokalibrace, což zvyšuje poměr signálu k šumu. Takto je možno měřit pikomolární iontové toky. Vibrující iontově selektivní elektrody jsou neinvasivní (měření může trvat hodiny nebo dokonce dny) a mohou být umístěny ve vzdálenosti pouhých několika mikronů od povrchu buňky. Navíc mohou být snadno přemístovány kolem celé buňky k měření proudů na různých místech membrány. Zjevná nevýhoda této metody je, že vibrující elektroda nemůže být použita k měření vnitrobuněčných koncentrací Ca^{2+} . Nicméně tato metoda byla úspěšně použita k měření toku Ca^{2+} do cytoplasmy během růstu pylových láček v rostlinných buňkách⁹, acetylcholinem indukovaného toku Ca^{2+} přes sarkolemu v buňkách hladkého svalu¹⁰, toku Ca^{2+} do cyto-

plasmu během působení oxidačního stresu na neurony měkkýše rodu *Aplysia*¹¹ a k měření aktivizačních proudů během oplodnění různých druhů vajíček^{12,13}.

3. Radiometrická metoda měření koncentrace Ca^{2+} *in vitro*

Změny v koncentraci Ca^{2+} mohou být sledovány také přidávkem radionuklidu $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Tato metoda se používá např. při studiu ligandem otevíraných iontových kanálů specifických pro Ca^{2+} . Pracovat lze pouze v *in vitro* systému, kde biologickým materiálem jsou rekonstituované membránové váčky obsahující studovaný iontový kanál. Při těchto pokusech se sleduje množství $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uvnitř váček před a po aplikaci ligandu, tedy před a po otevření příslušného iontového kanálu. Při vyhodnocování výsledků je třeba věnovat pozornost izotopovému ředění běžným neradioaktivním Ca^{2+} , který je přítomen ve většině vzorků v nezanedbatelné koncentraci. V praxi se používají dva níže popsané postupy.

První postup zaznamenává obsah $^{45}\text{Ca}^{2+}$ v membránových váčkách naplněných směsí $\text{Ca}^{2+}/^{45}\text{Ca}^{2+}$ (cit.^{14,15}). Rekonstituované membránové váčky jsou nejprve inkubovány v médiu obsahujícím ATP-Mg a směs $\text{Ca}^{2+}/^{45}\text{Ca}^{2+}$ o dané radioaktivitě. Po určitém čase inkubace jsou tyto membránové váčky působením Ca^{2+} -transportujících ATPas přítomných v membránách naplněny vápenatými ionty. Po dosažení ustáleného stavu je možno přidat do inkubačního média ligand, který otevírá kanál specifický pro Ca^{2+} a uvolňuje tak z váček tyto ionty. K oddělení membránových váček od inkubačního média se používá vakuová filtrace přes membránu (z nitrocelulosy nebo polyvinylidendifluoridu) nebo přes skleněnou fritu s definovanou porozitou. Proto je tato metoda často označována jako filtrační. Radioaktivita zbývající na filtrační membráně (odpovídající obsahu $^{45}\text{Ca}^{2+}$ v membránových váčkách) je změřena metodou kapalné scintilace.

Při použití druhého postupu je vzorek (membránové váčky nebo celé živočišné buňky permeabilizované saponinem a naplněné směsí $\text{Ca}^{2+}/^{45}\text{Ca}^{2+}$) fixován mezi dvě membrány při konstantním průtoku promývacího pufru v tzv. superfuzním přístroji. Ionový kanál se aktivuje přepnutím na jiný zásobník promývacího pufru s danou koncentrací ligandu. Pufr, který opouští superfuzní komoru, je sbírán kolektorem frakcí a radioaktivita je měřena ve frakcích. Na konci experimentu jsou vápenaté ionty zbývající v membránových váčkách uvolněny přidávkem detergentu do promývacího pufru. Z takto stanoveného celkového množství $^{45}\text{Ca}^{2+}$ lze vypočítat podíl vápenatých iontů uvolnitelných použitým ligandem. Tato metoda je velmi užitečná pro měření rychlých změn obsahu Ca^{2+} v membránových váčkách s časovým rozlišením až 70 ms a byla úspěšně využita např. ke studiu živočišného iontového kanálu pro Ca^{2+} otevíraného D-*myo*-inositol-1,4,5-trisfosfátem¹⁶ jako ligandem (tento kanál se většinou nazývá receptor pro D-*myo*-inositol-1,4,5-trisfosfát).

4. Bioluminiscenční indikátory Ca^{2+}

Bioluminiscence je produkce světla biologickými systémy. V přírodě byly nalezeny fotoproteiny, které poté, co se na ně naváží ionty Ca^{2+} , emitují světlo (např. ekvorin, obelin, mitrokomin a klytin). Některé z nich jsou dnes využívány k měření koncentrace Ca^{2+} (cit.^{17,18}) především *in vivo*, použitelné jsou však i *in vitro*. Protože u těchto fotoproteinů způsobuje bioluminiscenci intramolekulární reakce s Ca^{2+} , vyžadují bioluminiscenční metody pouze jednoduchou instrumentaci a nejsou ovlivněny takovými jevy, jako je autofluorescence nebo snížení citlivosti v důsledku působení excitačního záření, jako je tomu v případě dále diskutovaných fluorescenčních indikátorů a proteinů. Největší překážky při použití těchto indikátorů jsou spojeny s metodami vpravování indikátoru na dané místo v buňce, s detekcí bioluminiscence a s její kalibrací (protože bioluminiscence je částečně zhasena každým vzorkem). Problém kalibrace, tedy zhasení bioluminiscence vzorkem, lze odstranit metodou standardního přidavku. Problémy s detekcí vznikají tím, že každá molekula fotoproteinu emituje po navázání Ca^{2+} pouze jeden foton. Pozorovaná bioluminiscence má proto velmi nízkou intenzitu, což vyžaduje nákladné detekční systémy.

Ekvorin (angl. aequorin), fotoprotein citlivý na Ca^{2+} izolovaný z medúzy *Aequorea victoria*, reaguje na fyziologické koncentrace Ca^{2+} a je v současnosti preferovaným bioluminiscenčním indikátorem pro Ca^{2+} . Ekvorin může být mikroinjikován nebo zaveden do buňky transfekcí genem pro apoekvorin. Po vnesení genu pro apoekvorin je třeba dále inkubace s jeho prostetickou skupinou koelentrazinem tak, aby se rekonstituoval funkční ekvorin uvnitř buňky. Ne všechny typy buněk mohou být snadno transfekovány tak, aby v nich posléze byl rekonstituován funkční ekvorin. Při mikroskopii jednotlivých buněk je třeba poměrně velké intenzity vyzařovaného světla. Metoda je proto omezena hlavně na větší buňky, které mohou být ekvorinem snadno mikroinjikovány, jako např. jikry ryby *Oryzias latipes*^{19,20}. Koelentrazin se po interakci ekvorinu s Ca^{2+} nevratně rozkládá, přičemž vyzařuje světlo. Proto luminescence ekvorinu v přítomnosti Ca^{2+} s časem klesá, což vyžaduje práci s naprostým vyloučením kontaminujících Ca^{2+} .

Obelin je fotoprotein aktivovaný Ca^{2+} získaný z polypovce *Obelia geniculata*. Pokud se na obelin naváží tři ionty Ca^{2+} , vzniká bioluminiscence, jejíž nástup je mnohem rychlejší než u ekvorinu (3 ms u obelinu proti 10 ms u ekvorinu). Tím se stává vhodným nástrojem pro pokusy vyžadující vysoké časové rozlišení. Nevýhodou obelinu je jeho nižší citlivost na Ca^{2+} , zejména při pCa vyšším než 5,5.

5. Fluorescenční indikátory Ca^{2+}

Fluorescenční indikátory se dnes široce využívají především pro mikroskopické sledování změn koncentrace Ca^{2+} *in vivo*, ale lze je stejně jako bioluminiscenční indi-

kátory použít i *in vitro*. Ve srovnání s elektrochemickými metodami mají tyto indikátory menší dynamický rozsah (např. u indikátoru indo-1 je pCa 5–7,5), ale jejich reakční časy jsou mnohem kratší (ms). V současnosti je k dispozici více než 100 různých indikátorů pro Ca^{2+} excitovaných UV nebo viditelným světlem založených převážně na struktuře kyseliny 1,2-bis(2-aminofenoxy)ethan-*N,N,N,N*-tetraoctové (označované akronymem BAPTA).

Fluorescenční indikátory dělíme na poměrové a nepoměrové. Poměrové mění po navázání Ca^{2+} polohu svého excitačního nebo emisního maxima. Sledovaný poměr intenzit fluorescence obou forem indikátoru (volné formy a komplexu s Ca^{2+}) v jejich excitačních nebo emisních maximech je potom nezávislý na absolutní koncentraci indikátoru v měřeném roztoku a závisí pouze na koncentraci volných Ca^{2+} . Nepoměrové indikátory tuto vlastnost nemají, a při výpočtech koncentrace Ca^{2+} je tedy nutno znát aktuální koncentraci indikátoru v měřeném vzorku.

Fluorescenční indikátory se běžně prodávají, používají a citují pod komerčními názvy, které zjednodušují orientaci v jinak komplikovaných systematických názvech těchto složitých organických sloučenin. Širokou škálu fluorescenčních indikátorů excitovaných UV nebo viditelným světlem pro nejrůznější použití nabízí např. firma Molecular Probes²¹. Jejich nabídka zahrnuje např. varianty s nízkou afinitou k Ca^{2+} vhodné pro měření rychlých kinetik nebo varianty nesoucí kladný náboj, který zadrží tyto indikátory déle v cytoplasmě. Vlastnosti zmíněných indikátorů jsou shrnuty v přehledném článku Takahashiho a spol.⁶

Nejdéle jsou známy indikátory excitované UV světlem. Prvním z generace nepoměrových fluorescenčních indikátorů pro Ca^{2+} byl quin2 s pouze pěti až šestinásobným zvýšením emise po navázání Ca^{2+} . Indo-1 je poměrový indikátor se dvěma emisními vlnovými délkami s vysokou selektivitou pro Ca^{2+} v porovnání s ostatními dvojjazynými kationty a s nižší afinitou k Ca^{2+} než quin2 (to je výhodné především pro kinetická měření). Naproti tomu fura-2 je poměrový indikátor se dvěma excitačními vlnovými délkami. Fluo-3 je jedním z nejvhodnějších nepoměrových indikátorů pro Ca^{2+} excitovaných viditelným světlem. Používá se hlavně v konfokální laserové skenovací mikroskopii a v průtokové cytometrii. Dalšími indikátory excitovanými viditelným světlem jsou např. calcium crimson vhodný pro časově rozlišenou fluorescenční mikroskopii a rhod-2, který je selektivně akumulován mitochondriemi některých buněk²².

Pro měření *in vivo* může být do mnoha typů buněk indikátor zaveden jednoduše inkubací s příslušným acetylmethylesterem tohoto indikátoru²³. Tento proces spoléhá na intracelulární hydrolýzu, která vytvoří z esteru volný anion „uvězněný“ díky svému náboji v cytoplasmě. Aplikace indikátoru ve formě jeho esteru však přináší některé komplikace a možnost vzniku artefaktů, z nichž nejzávažnější je vytěsňování indikátoru do určitých buněčných organel²⁴. Navíc ne všechny typy buněk akumulují tyto indikátory a některé je zase příliš rychle uvolňují, což dále snižuje spolehlivost měření. Pro některé typy indikátorů

byly vyvinuty formy konjugované s dextranem, které jakmile jsou jednou dopraveny do buňky, zůstávají v cytoplasmě. Indikátory konjugované s dextranem musí být za normálních podmínek mikroinjikovány, nebo vpraveny mikropipetou, a proto je jejich použití omezeno na vhodné typy velkých buněk. Další velkou nevýhodou fluorescenčních indikátorů je jejich vlastní pufrací kapacita (vůči Ca^{2+}), a je proto třeba mít spolehlivý odhad intracelulární koncentrace indikátoru, aby bylo možno posoudit stupeň tohoto pufrování.

Závažným problémem při měření cytosolické koncentrace Ca^{2+} touto metodou je autofluorescence pyridinových nukleotidů, flavinadenindinukleotidu a flavinmononukleotidu^{25,26}. V současné době jsou velmi využívány indikátory excitované dlouhými vlnovými délkami jako je rhod-2 nebo fura-red právě z důvodu omezení vlivu autofluorescence^{27–29}. Mezi další problémy spojené s fluorescenčními indikátory patří fotodestrukce, která snižuje jejich citlivost^{30,31}. Proto musí být vhodnou kombinací doby a intenzity excitace nalezena rovnováha mezi snižováním citlivosti a dostatečným poměrem signálu k šumu. Esterové deriváty indikátorů reagují přesně na koncentraci určitých iontů teprve po hydrolýze. Bylo však prokázáno, že neúplně hydrolyzované indikátory jsou často necitlivé na Ca^{2+} , ale přesto emitují více fluorescence než jejich esterové formy³².

Základní informace o fluorescenčních mikroskopických metodách sledování změn koncentrace Ca^{2+} v živých buňkách včetně popisu multiparametrové digitální video-mikroskopie, konfokální laserové skenovací mikroskopie, dvoufotonové laserové skenovací mikroskopie, pulsní laserové mikroskopie pro záznam strmých gradientů Ca^{2+} a časově rozlišené fluorescenční mikroskopie jsou shrnuty v přehledném článku⁶.

6. Fluorescenční proteiny

Již mnoho let je znám a v biochemii pro fluorescenční značení proteinů hojně využíván tzv. zelený fluorescenční protein izolovaný z již zmíněné medúzy *Aequorea victoria*. Během posledního desetiletí se objevila nová generace fluorescenčních indikátorů pro Ca^{2+} – fúzních fluorescenčních proteinů, anglicky tzv. cameleons^{31,32}. Ty jsou založeny na modifikacích zeleného fluorescenčního proteinu, mají však změněné spektrální vlastnosti (využívá se modrá, modrozelená a žlutá modifikace). Dvojice různých fluorescenčních proteinů je spojena můstkem tvořeným kalmodulinem a peptidem M13, který váže kalmodulin. Navázání Ca^{2+} na kalmodulin způsobí konformační změnu celého fúzního proteinu, která vyústí ve fluorescenční rezonanční přenos energie mezi danými dvěma fluorescenčními proteiny. Tyto fúzní fluorescenční proteiny jsou neobyčejně vhodné pro *in vivo* měření, protože spojují výhody fotoproteinů a fluorescenčních indikátorů včetně možnosti cílení do organel transfekovaných buněk a byly použity k měření koncentrace Ca^{2+} s velkým prostorovým rozlišením v řadě typů živočišných buněk i v buňkách rostlinných^{31,32}.

7. Závěr

Koncentraci iontů Ca^{2+} v biologických systémech je možné měřit rozličnými metodami založenými na různých fyzikálních principech. Z biologické podstaty měřených vzorků vyplývá nutná podmínka, kterou musí splňovat všechny relevantní metody, a tou je šetrnost ke zvolenému experimentálnímu materiálu.

Elektrochemické metody využívající iontově selektivní elektrody jsou jednoduché a vykazují vynikající dynamický rozsah. Nejsou však vhodné k měření rychlých změn koncentrace kvůli jejich poměrně dlouhým reakčním dobám. Navíc může být jejich signál ovlivněn změnami koncentrace dalších přítomných iontů.

Radiometrické metody jsou velmi robustní a odolné k mnoha rušivým vlivům, není ale snadné je použít v kontinuálním provedení a navíc se jejich použití omezuje pouze na měření *in vitro*.

Bioluminescenční metody naproti tomu nabízí několik výhod nejen pro měření *in vivo*, ale i *in vitro*. Ekvorin i přes svůj nízký kvantový výtěžek vykazuje poměrně výrazné změny luminiscence v reakci na vyšší fyziologické koncentrace Ca^{2+} , umožňuje detegovat velký rozsah koncentrací Ca^{2+} , může být cílen do určitých buněčných kompartmentů a změna koncentrace Ca^{2+} v důsledku vazby na indikátor nepředstavuje problém, protože ekvorin se běžně aplikuje v nízké koncentraci. Tyto výhody musí být nicméně zváženy s ohledem na nemožnost použití konfokálních a jiných mikroskopických metod s vysokým rozlišením použitelných jen ve spojení s fluorescenčními indikátory a proteiny. Instrumentace metody je též poměrně náročná.

Fluorescenční indikátory se staly převažujícím nástrojem pro měření volné koncentrace iontů Ca^{2+} jak *in vivo*, tak *in vitro* díky své citlivosti a rychlosti odezvy. Indikátory excitované delšími vlnovými délkami (např. deriváty fluo-3 a rhod-2) mohou být použity v kombinaci s dalšími sloučeninami, které je třeba aktivovat fotolýzou UV světlem. Problémem může být snižování citlivosti těchto indikátorů fotolýzou a autofluorescence studovaného biologického materiálu.

Fluorescenční proteiny jsou nástrojem budoucnosti pro přesná lokalizovaná měření koncentrace Ca^{2+} *in vivo*. Interpretace experimentálních výsledků získaných s těmito proteiny vyžaduje nicméně velkou opatrnost a dobrou znalost hranic jejich použitelnosti. Správné sestavení kontrolních pokusů je pak klíčem k správné interpretaci získaných experimentálních dat.

Z předchozího vyplývá, že metody měření koncentrace Ca^{2+} v buňkách jsou početné a jsou založeny na různých principech. Každá tato metoda má svá úskalí a výhody. Pro některé úkoly je možno tyto metody zaměňovat, ale často daný úkol vyžaduje specifický metodický přístup. Opatrná interpretace experimentálních dat a použití všech dostupných kontrol jsou nezbytné u každého z výše popsaných měření. Optimální je pak použití více metod založených na odlišných fyzikálních principech.

LITERATURA

- Berridge M. J., Lipp P., Bootman M. D.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 11 (2000).
- Anil V. S., Rao K. S.: *J. Plant Physiol.* 158, 1237 (2001).
- Thomas D., Lipp P., Tovey S. C., Berridge M. J., Li W., Tsien R. Y., Bootman M. D.: *Curr. Biol.* 10, 8 (2000).
- Parker I., Choi J., Yao Y.: *Cell Calcium* 20, 105 (1996).
- Prentki M., Janjic D., Wollheim C. B.: *J. Biol. Chem.* 258, 7597 (1983).
- Takahashi A., Camacho P., Lechleiter J. D., Herman B.: *Physiol. Rev.* 79, 1089 (1999).
- Tsien R. Y., Ring T. J.: *Biochim. Biophys. Acta* 599, 623 (1980).
- Jaffe L. F., Nuccitelli R.: *J. Cell Biol.* 63, 614 (1974).
- Pierson E. S., Miller D. D., Callahan D. A., van Aken J., Hackett G., Hepler P. K.: *Dev. Biol.* 174, 160 (1996).
- Devlin C. L., Smith P. J.: *J. Comp. Physiol.* 166, 270 (1996).
- Duthie G. G., Shipley A., Smith P. J.: *Free Radical Res.* 20, 307 (1994).
- Nuccitelli R.: *Dev. Biol.* 122, 522 (1987).
- Nuccitelli R., Kline D., Busa W. B., Talevi R., Campanella C.: *Dev. Biol.* 130, 120 (1988).
- Schumaker K. S., Sze H.: *Plant Physiol.* 79, 1111 (1985).
- Takahashi M., Tanzawa K., Takahashi S.: *J. Biol. Chem.* 269, 369 (1994).
- Finch E. A., Turner T. J., Goldin S. M.: *Science* 252, 443 (1991).
- Shimomura O.: *Symp. Soc. Exp. Biol.* 39, 351 (1985).
- Tsuji F. I., Ohmiya Y., Fagan T. F., Toh H., Inouye S.: *Photochem. Photobiol.* 62, 657 (1995).
- Gilkey J. C., Jaffe L. F., Ridgway E. B., Reynolds G. T.: *J. Cell Biol.* 76, 448 (1978).
- Fluck R. A., Miller A. L., Jaffe L. F.: *J. Cell Biol.* 115, 1259 (1991).
- Molecular Probes: *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 9. vydání 2002 (USA), str. 767. <http://www.probes.com/>, staženo 21.6.2004.
- Trollinger D. R., Cascio W. E., Lemasters J. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 738 (1997).
- Tsien R. Y.: *Nature* 290, 527 (1981).
- Gunter T. E., Restrepo D., Gunter K. K.: *Am. J. Physiol.* 255 (Cell Physiol. 24), C304 (1988).
- Paddle B. M.: *Pfluegers Arch.* 404, 326 (1985).
- Sick T. J., Rosenthal M.: *J. Neurosci. Methods* 28, 125 (1989).
- Kurebayashi N., Harkins A. B., Baylor S. M.: *Biophys. J.* 64, 1934 (1993).
- Mitani A., Kadoya F., Kataoka K.: *Brain Res.* 562, 159 (1991).

29. Takahashi M. P., Sugiyama M., Tsumoto T.: *Neurosci. Res.* 17, 217 (1993).
30. Becker P. L., Fay F. S.: *Am. J. Physiol.* 253 (Cell Physiol. 22), C613 (1987).
31. Scheenen W. J. J. M., Makings L. R., Gross L. R., Pozzan T., Tsien R. Y.: *Chem. Biol.* 3, 765 (1996).
32. Scanlon M., Williams D. A., Fay F. S.: *J. Biol. Chem.* 262, 6308 (1987).

O. Krinke^a, Z. Novotná^a, O. Valentová^a, and J. Martinec^b (^a*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^b*Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic*): **Methods for Measuring Ca²⁺ Concentration Applicable to Study Cell Signaling**

The Ca²⁺ signaling system seems to be ubiquitous in living organisms. It stands at crossroads of many signaling pathways and its study has brought many exciting facts about the stimulus response coupling in the cell. The Ca²⁺ concentration in the cytosol is regulated. The diverse problems associated with its study often require study of separate events in different cell compartments. This review briefly summarizes possible approaches to the study of Ca²⁺ signaling based on various physical principles and points out their advantages and also possible pitfalls. The approaches include electrochemical techniques, radiometric methods, bioluminescent and fluorescent indicators of Ca²⁺ and fluorescent proteins. The methods are not discussed comprehensively; the presented information should rather give a general insight into the topic.



Ústav anorganické chemie AV ČR

vypisuje konkurs na obsazení míst absolventů VŠ v
Oddělení chemie pevné fáze a Analytické laboratoři

a nabízí ve spolupráci s vysokými školami

doktorské studium v oborech

Anorganická chemie, Anorganická technologie, Analytická chemie a Chemie a technologie anorganických materiálů.

Vědecká experimentální práce pod vedením školitelů Úřad AV ČR probíhá v Řeži u Prahy. Přednášky, zkoušky a udělení titulu zajišťují vysoké školy. Podmínky studia jako na VŠ.

Příklady témat:

Příprava a studium tenkých filmů připravovaných metodou sol – gel

- I. téma: Příprava a studium tenkých filmů hexagonálních a granátových feritů
II. téma: Studium tenkých feroelektrických filmů s perovskitovou strukturou

Kalixarenové sloučeniny pro molekulární rozpoznávání

Studium nových receptorů, molekulárních pinzet, skládajících se z kalixarenového skeletu a vhodných funkčních skupin, s potenciálním využitím pro molekulární rozpoznávání. Cílem je vyvinout sloučeniny pro selektivní komplexaci fullerenu a anorganických aniontů.

Více informací o Ústavu a další témata pro doktorské studium na <http://www.iic.cas.cz>

Pisemné přihlášky s krátkým odborným životopisem do 31. května 2005,
na adresu: **Ústav anorganické chemie AV ČR, 250 68 Řež**
nebo na e-mail: sekretar@iic.cas.cz