

UNIVERZA V MARIBORU  
FAKULTETA ZA NARAVOSLOVJE IN MATEMATIKO

DOKTORSKA DISERTACIJA

**OJAČITEV IN GLAJENJE KALCIJEVIH CELIČNIH  
SIGNALOV S PRIMERJAVO PRENOSA SIGNALOV V TEHNIKI**

Maribor, december 2008

avtor: mag. Vladimir Grubelnik  
mentor: izr. prof. dr. Marko Marhl







Avtor: mag. Vladimir Grubelnik  
Naslov: Ojačitev in glajenje kalcijevih celičnih signalov s primerjavo prenosa signalov v tehniki  
Mentor: izr. prof. dr. Marko Marhl  
UDK: 53:621.3:577.3 (043.3)  
Ključne besede: celična signalizacija, kalcijeve oscilacije, proteinske kaskade, glajenje signalov, ojačitev signalov, elektronski sistemi, operacijski ojačevalnik  
Število izvodov: 10  
Obdelava teksta: mag. Vladimir Grubelnik  
Obdelava slik: mag. Vladimir Grubelnik



## ***Zahvala***

*Delo je nastalo na Fakulteti za naravoslovje in matematiko Univerze v Mariboru s finančno podporo Fakultete za naravoslovje in matematiko in Fakultete za elektrotehniko, računalništvo in informatiko Univerze v Mariboru.*

*Za strokovno vodenje in usmerjanje pri raziskovalnem delu ter pomoč pri oblikovanju doktorske disertacije se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Marku Marhlu.*

*Sodelavcem na Fakulteti za naravoslovje in matematiko Univerze v Mariboru ter prijateljem, ki so mi stali ob strani, se zahvaljujem za podporo pri izdelavi dela.*

*Za vso pomoč, podporo in potrpežljivost se zahvaljujem tudi mojim staršem, ženi Lidiji in hčerki Klari.*





# KAZALO

<b>Povzetek:</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abstract:</b> .....	<b>XI</b>
<b>Seznam kratic</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 Celična signalizacija .....	1
1.2 Analogije celične signalizacije v tehniki .....	6
1.3 Teze doktorske disertacije .....	11
1.4 Kratak pregled doktorske disertacije .....	13
<b>2 KALCIJEVE OSCILACIJE IN CELIČNA SIGNALIZACIJA</b> .....	<b>15</b>
2.1 Kalcijevi signali v neekscitabilnih celicah .....	15
2.2 Modeliranje kalcijeve dinamike .....	16
<b>3 PROTEINSKE KASKADE IN DEKODACIJA CELIČNIH SIGNALOV</b> .....	<b>27</b>
3.1 Fiziološki pomen proteinskih kaskad .....	29
3.2 Modeliranje dekodacijskih kaskadnih mehanizmov .....	33
<b>4 GLAJENJE SIGNALOV S KRATKIM ODZIVNIM ČASOM</b> .....	<b>37</b>
4.1 Pomen kratkih odzivnih časov v procesu glajenja signalov .....	38
4.2 Matematični model glajenja celičnih signalov .....	39
4.3 Rezultati .....	41
4.4 Glajenja električnih signalov .....	52
4.5 Rezultati s primerjavo bioloških in tehniških sistemov .....	54
<b>5 OJAČITEV SIGNALOV Z OHRANITVIJO PULZNE OBLIKE</b> .....	<b>61</b>
5.1 Pomen ohranitve oblike pulzov v procesu ojačitve signalov .....	61
5.2 Matematični model ojačitve celičnih signalov .....	63
5.3 Rezultati .....	64
5.4 Ojačitve električnih signalov .....	72
5.5 Rezultati s primerjavo bioloških in tehniških sistemov .....	75

<b>6 ZAKLJUČEK .....</b>	<b>77</b>
<b>LITERATURA.....</b>	<b>83</b>
<b>DODATEK.....</b>	<b>91</b>
A Vloga kaskad pri pretvorbi oscilirajočih signalov v stacionarne stopničaste odzive .....	93
B Ojačitev signalov v bioloških in električnih sistemih. Univerzalna vloga kaskad .....	105
Kratek življenjepis s prikazom znanstveno-raziskovalnega in strokovnega dela .....	123

# OJAČITEV IN GLAJENJE KALCIJEVIH CELIČNIH SIGNALOV S PRIMERJAVO PRENOSA SIGNALOV V TEHNIKI

## ***Povzetek:***

Tema doktorske disertacije sodi na področje celične signalizacije. Predstavljena je teoretična obravnava celične signalizacije, ki temelji na proteinskih kaskadah, katerih aktivacija je pogojena s koncentracijo prostih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v znotrajceličnem prostoru. Proučujemo vlogo proteinskih kaskad pri glajenju celičnih signalov s kratkim odzivnim časom in vlogo proteinskih kaskad pri ohranjanju pulzne oblike ojačanih signalov. Izdelana je analogija s prenosom signalov v elektrotehniko, pri čemer primerjamo delovanje bioloških sistemov z znanimi mehanizmi delovanja v električnih vezjih. V delu sta predstavljena dva ključna izvorna znanstvena prispevka. Pokažemo, da je glajenje pulznih signalov s hitrimi vklopno-izklopnimi karakteristikami zagotovljeno že z malim številom kaskadnih ciklov. Za ojačitev signalov, pri katerih je potrebno ohraniti njihovo obliko, pokažemo, da so večstopenjski kaskadni ojačevalci rešitev tako v bioloških kakor tudi v tehničnih sistemih.

***Ključne besede:*** celična signalizacija, kalcijeve oscilacije, proteinske kaskade, glajenje signalov, ojačitev signalov, elektronski sistemi, operacijski ojačevalnik.

**UDK:** 53:621.3:577.3 (043.3)



# **AMPLIFICATION AND SMOOTHENING OF CELLULAR CALCIUM SIGNALS WITH COMPARISON TO SIGNAL TRANSDUCTION IN ENGINEERING**

## ***Abstract:***

The doctoral thesis is in the field of cellular signalling. It is theoretically investigated the cellular signalling, which is based on protein cascades activated by an increased intracellular calcium concentration. In particular, it is analysed the role of protein cascades in smoothening of cellular signals with short reaction time and the role of protein cascades in amplification of signals which should preserve their form. An analogy with signal transduction in electrical engineering systems is conducted. The behaviour of biological systems is directly compared with known solutions in electrical engineering systems. In the thesis two main original scientific contributions are presented. First, it is shown that smoothening of oscillatory signals with fast on-off characteristics can be realised by a small number of cascade levels. Second, cascade amplifiers are also appropriate for amplifying signals which should preserve their form. This is a successful solution in biological as well as in electro engineering systems.

***Keywords:*** Cellular Signalling, Calcium Oscillations, Protein Cascade, Signal Amplification, Smoothening of Signals, Electrical Engineering Systems, Operational Amplifier.

**UDK:** 53:621.3:577.3 (043.3)



## Seznam kratic

$A_{U,N}$	ojačanje električnih signalov
$A_N$	ojačanje bioloških signalov
$A_{U,SS}$	ojačanje op. ojačevalnika v stacionarnem stanju
$\omega_e$	mejna frekvenca operacijskega ojačevalnika
$Ca^{2+}$	kalcij
$x (Ca_{cyt})$	koncentracija prostih $Ca^{2+}$ ionov
$d$	širina pulza $Ca^{2+}$ oscilacij
$p$	perioda $Ca^{2+}$ oscilacij
$f$	gladkost signala
$k_{on}$	deaktivacijska konstanta proteinov
$k_{off}$	aktivacijska konstanta proteinov
$K = k_{off} / k_{on}$	disociacijska konstanta
MAPK	mitogeno aktivirana protein kinazna kaskada
$N$	število kaskadnih ciklov
$t_{on}$	aktivacijski čas
$t_{off}$	deaktivacijski čas
$t_m$	spominski čas
$z$	koncentracija aktiviranih proteinov
$\tilde{z}$	koncentracija neaktiviranih proteinov
$z_{tot}$	totalna koncentracija proteinov
$\langle z \rangle$	povprečna koncentracija aktiviranih proteinov
$C$	kapacitivnost kondenzatorja
$R$	upornost upora
$U$	napetost





# 1 UVOD

V doktorski disertaciji obravnavamo matematično modeliranje dinamičnih sistemov na področju celične signalizacije. Izpostavljena sta dva ključna poudarka, pri katerih proučujemo vlogo proteinskih kaskad pri glajenju signalov s kratkim odzivnim časom in ohranjanje pulzne oblike ojačanega signala. Na podlagi matematičnega modeliranja iščemo mehanizme delovanja, ki v smislu boljšega razumevanja omogočajo neposredno primerjavo delovanja celične signalizacije s prenosom signalov v tehniki.

V uvodu doktorske disertacije je podrobneje predstavljeno področje našega dela s pregledom bistvenih študij, ki področje zaznamujejo. Podrobneje je opredeljen problem celične signalizacije ([poglavje 1.1](#)) z možnostmi analogije celične signalizacije v tehničnih oziroma elektronskih sistemih ([poglavje 1.2](#)). Posebej so poudarjeni cilji doktorske disertacije z izpostavljenimi tezami ([poglavje 1.3](#)), ki se nanašajo na izvirne znanstvene prispevke, predstavljene v nadaljevanju doktorske disertacije ([glej poglavje 4 in 5](#)).

## 1.1 Celična signalizacija

Celična signalizacija je eden od odločilnih procesov za delovanje bioloških sistemov, saj se s prenosom celičnih signalov uravnavajo številne celične funkcije, ki zagotavljajo normalno fiziološko delovanje celic in s tem celotnega organizma. V celično signalizacijo so vključeni procesi zaznavanja stanj zunaj in znotraj celice, komuniciranje med celicami, prevajanje signalov znotraj celice in tudi procesiranje signalov. Vse to je potrebno za zagotovitev optimalnega odziva celice glede na zunanje in notranje stanje celice, s katerim se celica sooča.

Da je celica zaščitena pred zunanjimi vplivi, je obdana s plazemsko membrano, ki je nepropustna za večino kemikalij. Celična membrana s tem predstavlja pregrado, ki je potrebna za avtonomnost celice, hkrati pa predstavlja kraj, kjer se zaznavajo zunanji in notranji pogoji celice, ki vplivajo na njeno funkcioniranje. Celice kot samostojne enote morajo namreč biti sposobne zaznavati spremembe v njihovem okolju in znati na te spremembe tudi reagirati, da lahko funkcionirajo kot enocelični organizem ali pa kot del večjega večceličnega organizma, pri katerem je pomembno tudi komuniciranje med posameznimi celicami. Posledično so celice dobro opremljene s senzorskimi sistemi oziroma receptorji, ki celicam omogočajo opazovanje zunanjih in notranjih stanj celice. Sensorji torej sodelujejo pri zaznavanju signalov pri medceličnem in znotraj celičnem signaliziranju ter s tem predstavljajo nekakšne sprožilce raznih procesov v celici.

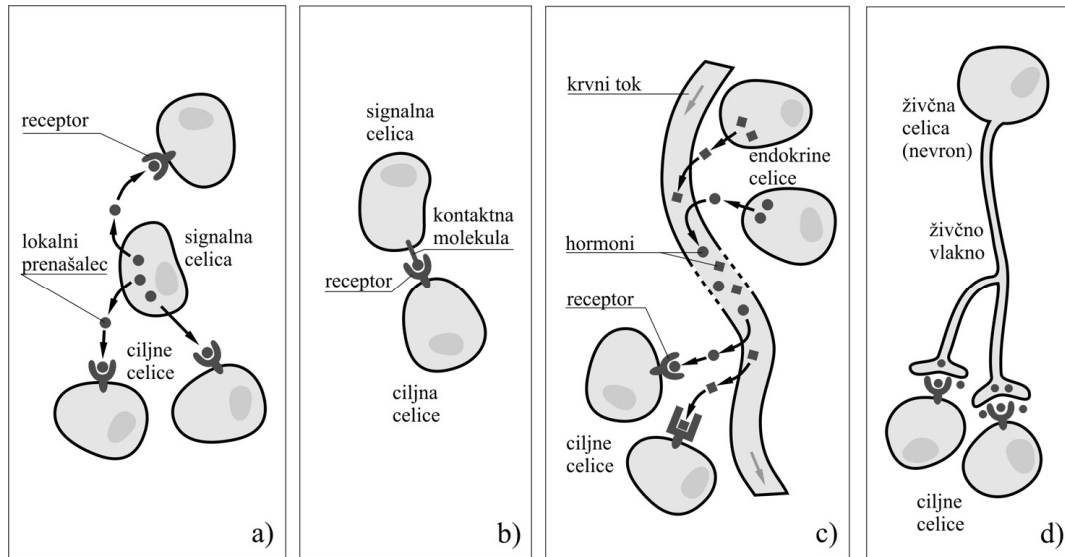
## Medcelična signalizacija

Najprej si podrobneje oglejmo signalizacijo na medcelični ravni (slika 1). Danes vemo, da signalizacija v živih bitjih poteka na več nivojih, v katere so vključeni različni organi in sistemi. Komunikacija med celicami lahko poteka med bližnjimi molekulami (parakrino in kontaktno sporočanje) preko lokalnih posrednikov (slika 1a) in kontaktnih molekul (slika 1b) kot tudi med oddaljenimi celicami s pomočjo raznih sistemov za celično sporočanje. Tako danes poznamo različne načine medceličnega sporočanja oziroma signaliziranja, kot je na primer komuniciranje s pomočjo živčnega sistema (slika 1d), endokrino sporočanje (slika 1c), limfni sistem in drugo.

Za živčni sistem je značilno, da komunikacija v živčnih vlaknih poteka s pomočjo električnih in kemijskih signalov, ki se prenašajo med živčnimi celicami. Signal se prenese od živčne celice preko celotne dolžine vlakna do živčnih končičev in od tam v naslednjo celico s pomočjo kemijskih spojin – nevrottransmitterjev, kot je na primer adrenalin (glej sliko 1d). Na ta način potekajo komunikacije med različnimi sistemi telesa, se izvaja kontrola nad telesnimi funkcijami in prepoznava različne dražljaje. V splošnem so učinki živčnih impulzov hitri in kratkotrajni.

Za razliko od živčnega sistema pa endokrini sistem opravlja počasne in dolgotrajne regulacije. Sestavljajo ga specifične žleze (trebušna slinavka, nadledvična žleza, hipofiza, ščitnica), ki so razširjene preko celega telesa in izločajo posebne kemične snovi – hormone (adrenalin, insulin, testosteron) neposredno v krvni obtok. Hormoni nato potujejo po krvi do oddaljenih celic, kjer sprožijo za hormon značilen biološki učinek, ki pa je odvisen od hormonskih receptorjev v celicah (glej sliko 1c). Kot primer omenimo delovanje hormona, ki ga imenujemo adrenalin. Ko se na primer prestrašimo, se iz nadledvične žleze v kri izloči večja količina adrenalina. Kri nato raznese adrenalin po vsem telesu do celic, ki imajo receptorje za zaznavo tega hormona. To so mišične celice, ki obdajajo krvne žile in se ob zaznavi adrenalina skrčijo. Žila se zato zoži, kri začne teči hitreje in celice s tem dobijo več kisika in sladkorja. Zgorevanje v celicah je s tem za nekaj časa večje, kar zaznamo tako, da se počutimo močnejše in lažje premagamo nevarnost.

Seveda pa pri medcelični signalizaciji velja omeniti tudi to, da so omenjeni sistemi, kot sta živčni sistem in endokrini sistem, med seboj tudi povezani in delujejo usklajeno. Tako na primer osrednji živčni sistem sprejema podatke (temperatura, krvni tlak, krvni sladkor in različne druge hormonske vrednosti) in jih neposredno prenese v center podatkov vseh endokrinih hormonov (hipotalamus), ki opravlja možgansko žlezo (hipofiza). Ta izloči ustrezne hormone neposredno v kri, lahko pa ti hormoni odpotujejo tudi do drugih žlez (nadledvična žleza, ščitnica), kjer povzročijo izločanje drugih hormonov, pomembnih za normalno funkcioniranje organizma.



**Slika 1:** Prikaz različnih načinov medceličnega sporočanja. **(a)** Komunikacija med bližnjimi celicami z lokalnimi posredniki. **(b)** Kontaktno sporočanje preko kontaktnih molekul. **(c)** Endokrino sporočanje preko hormonov, ki jih izločajo posebne žleze (endokrine celice). **(d)** Komunikacija s pomočjo živčnega sistema.

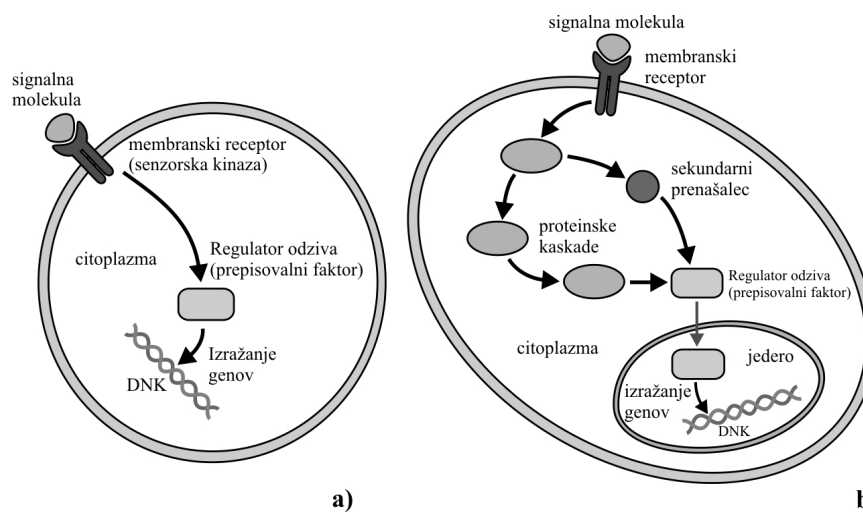
Kot vidimo, je za delovanje organizma potrebno, da celice med seboj komunicirajo na različne načine (slika 1). S tem so izpostavljene množici signalov, na katere morajo reagirati. Pri tem celice reagirajo le na tiste signale, za katere imajo receptorje, vendar je kljub temu odziv celic zelo kompleksen, saj ima celica več receptorjev, s katerimi se lahko hkrati odziva na različne signale. Seveda pa obstajajo tudi različne celice, ki se lahko na enak signal odzivajo različno. Odziv celic je torej zelo kompleksen in se odraža na primer v tem, da celica normalno živi, se deli, diferencira ali pa doživi celično smrt.

## Znotrajcelična signalizacija

Do sedaj smo spoznali, da celica z receptorji zaznava signale, kar celici omogoča prevajanje sporočil preko znotrajceličnih poti do ustreznega mesta, kjer se mora zgoditi določen proces oziroma akcija, ki je pomembna za odziv celice glede na sprejeto sporočilo. V nadaljevanju pa si podrobneje pogledjmo, kako s prenosom signalov v celici pride do ustreznega odziva celice. V celici namreč potekajo različni sporočilni nizi, naloga katerih je sprejemanje in pretvarjanje signalov v obliko, primerno za prenos znotraj celice in nato prenos signala do mesta odziva. Pri tem se signal običajno tudi ojači in razporedi na različne signalne poti, kar vodi do sočasnega vpliva na tarčne molekule in kompleksnega odziva celice.

Prenos signala v celici torej poteka vse od aktivacije receptorjev na celični membrani pa do raznih ciljev v celici. Ti cilji so lahko encimi, ki delujejo kot katalizatorji kemijskih reakcij in lahko v odvisnosti od zunaj celičnih vplivov pospešujejo oziroma zavirajo življenjske procese v celici (Oancea in Mayer 1998, Koninck in Schulman 1998, Putney 1998). Brez njih bi bili nekateri procesi, kot je prebava, tako počasni, da življenje sploh ne bi bilo mogoče. Kot cilj signalne poti je lahko tudi ekspresija genov (Dolmetsch in sod. 1998, Li in sod. 1998). Geni predstavljajo posamezna navodila, shranjena v molekulah DNK, ki narekujejo izdelavo novih beljakovin. Na primer geni lahko proizvedejo beljakovine oziroma encime, ki zaščitijo celico pred zunanjimi vplivi, kot je na primer stradanje ali ekstremne temperature, če dobijo ustrezen signal, ki opisuje te vplive.

Kompleksnost celične signalizacije je lahko zelo različna in je odvisna od kompleksnosti živih organizmov in od tipa celice (glej sliko 2). Obstajajo enostavni organizmi (prokarioti – npr. bakterija E. Coli), pri katerih se informacija prenaša med zunanjim signalom in celičnim odzivom le med dvema proteinoma (Alves in Savageau 2003, Ulrich in sod. 2005). To sta tako imenovana senzorska kinaza in regulator odziva (slika 2a). Senzorska kinaza se nahaja v celični membrani in vsebuje senzorsko domeno, ki se nahaja zunaj celice. Ko ta zazna dražljaj, se kinaza aktivira, kar nadalje vpliva na domeno regulatorja, ki s svojo aktivnostjo povzroči ekspresijo genov oziroma ustrezen odziv celice glede na zaznan signal (slika 2a).



**Slika 2:** Prikaz prenosa informacije od zunaj celičnega signala do celičnega odziva, kot je na primer izražanje genov. **(a)** Prokariotski organizmi, pri katerih se informacija prenaša med dvema proteinoma (senzor – regulator). **(b)** Evkariotski organizmi, pri katerih se informacija prenaša preko različnih posrednikov (sekundarni obveščevalci, proteinske kinaze).

V rastlinskih in živalskih celicah (evkarioti) pa je prenos signala veliko bolj kompleksen. Ko senzorji zaznajo dražljaje, ki so lahko kemični, električni ali mehanski, ti običajno sprožijo različne nize posrednikov, kot so proteinske kaskade oziroma tako imenovani sekundarni prenašalci informacij (slika 2b).

Kot primer sekundarnega prenašalca oziroma posrednika informacije izpostavimo kalcij, vlogo katerega so v procesu prenosa signalov v neekscitabilnih celicah odkrili že v osemdesetih letih (Cuthbertson in Cobbold 1985, Woods in sod. 1986, Berridge 1989, Cuthbertson 1989, Rooney in sod. 1989). Tako je danes znano, da kalcij sodeluje že pri samem nastanku živega bitja in nato v vseh najpomembnejših bioloških ciklih razvoja živega bitja, kot sta delitev in rast celic. Podrobneje bomo njegovo vlogo spoznali v naslednjem poglavju v okviru kalcijevih oscilacij (glej poglavje 2). Sedaj pa omenimo le, da sekundarne prenašalce lahko najdemo tako v evkariotskih kakor tudi v prokariotskih organizmih. Te signalne molekule omogočajo prenos signalov na različna območja celice, ker se zaradi svoje dobre difuzivnosti z lahkoto razpršijo. Zaradi velikega števila molekul in njihovih struktur je molekulam sekundarnih prenašalcev omogočeno razporejanje signala na različne signalne poti in sodelovanje z raznovrstnimi proteini. Sekundarni prenašalci sodelujejo tudi pri modulaciji signalov, kot je na primer frekvenčna kodiranost informacije, kar bomo podrobneje spoznali v poglavju 2.2 v okviru modeliranja kalcijeve dinamike. Vse to omogoča kompleksen in s tem ustrezen odziv celice glede na delovanje stimula.

Poleg sekundarnih prenašalcev, ki so odgovorni za prenos informacij znotraj celice, pa lahko v celicah zasledimo tudi posamezne tako imenovane signalne kaskade (Ferrell 1996, Pearson in sod. 2001, Stadtman in Chock 1977, Koshland in sod. 1982, Widmann in sod. 1999). Poznane so proteinske kaskade, kjer je eden od ključnih mehanizmov pri prenosu signalov fosforilizacija proteinov (proteinske kinaze). Za odkritje, kako se uporablja fosforilizacija proteinov za uravnavanje bioloških procesov, je bila na področju medicine leta 1992 podeljena tudi Nobelova nagrada. Med seboj je lahko povezanih na desetine proteinov v kompleksne signalne mreže (Sauro in Kholodenko 2004, Neves in Iyengar 2002). Te predstavljajo dovršene signalno procesne enote, ki zagotavljajo optimalno reakcijo pri danih pogojih.

Pokazano je bilo, da proteinske kaskade delujejo kot ojačevalci signalov (Stadtman in Chock 1977, Koshland in sod. 1982, Chock 1980, Goldbeter in Koshland 1981, Goldbeter in Koshland 1982, Goldbeter in Koshland 1984, Heinrich 2002, Mayawala 2004), da lahko delujejo kot tako imenovana »ultrasenzitivna« stikala (Stadtman in Chock 1977, Goldbeter in Koshland 1981, Goldbeter in Koshland 1984, Koshland in sod. 1982, Fell 1997) in omogočajo selektivno regulacijo celičnih procesov (Marhl s sod. 2005).

Podrobneje bomo vlogo proteinskih kaskad spoznali v poglavju 3 v smislu dekodacije celičnih signalov. Še posebej pa bomo poudarili vlogo proteinskih kaskad

pri glajenju signalov s kratkim odzivnim časom (glej poglavje 4), kar omogoča učinkovito aktivacijo določenih procesov, ki so vzpodbujeni z oscilirajočimi stimuli, kot je oscilirajoče spreminjanje kalcija v znotraj celičnem prostoru (glej poglavje 2). V nadaljevanju pa bomo podrobneje izpostavili vlogo proteinskih kaskad tudi pri ojačitvi signalov v smislu ohranjanja oblike pulznih signalov (poglavje 5). Omenjena poudarka bomo proučili v okviru matematičnega modeliranja in sta tudi ključna znanstvena prispevka tega dela. Naredili bomo tudi primerjavo delovanja mehanizmov med biološkimi sistemi (celično signalizacijo) in tehničnimi sistemi (prenos signalov v elektrotehniki), kar omogoča boljše razumevanje omenjenih mehanizmov in daje možnosti nadaljnjega proučevanja direktnih analogij med biološkimi in tehničnimi sistemi.

## 1.2 Analogije celične signalizacije v tehniki

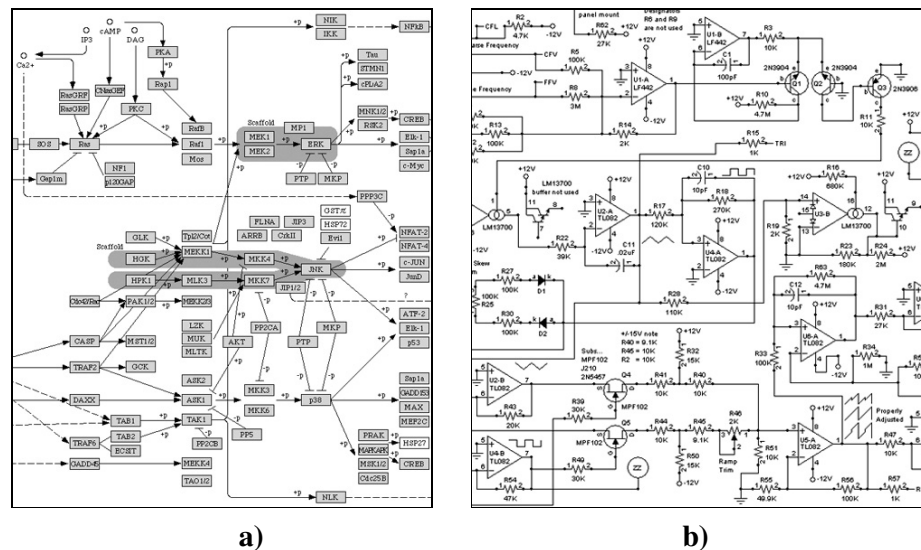
S signalizacijo se srečujemo pri najrazličnejših komunikacijah, pri katerih predstavlja signal sporočilo oziroma informacijo s fizikalno količino, kot je na primer električni tok, napetost, hitrost, pritisk, koncentracija različnih snovi itd. S prenosom informacij oziroma signalizacijo se torej srečujemo na različnih področjih, kot na primer pri komuniciranju med posameznimi sestavnimi deli tehničnih sistemov in tudi med posameznimi organi oziroma deli bioloških organizmov tako na celični kot medcelični ravni.

V bioloških kot tudi v tehničnih sistemih, poteka prenos informacije pogosto preko zelo kompleksnih signalnih mrež (glej sliko 3). Primerjava signalnih mrež v bioloških in tehničnih sistemih je smiselna z vidika njihovih funkcij, saj v vseh sistemih služijo za procesiranje oziroma integracijo ter interpretacijo zunanjih in notranjih signalov obravnavanega sistema. Ne glede na področje signalizacije, kjer predstavlja signal funkcijo ene ali več neodvisnih spremenljivk, se pri prenosu informacij med posameznimi deli sistemov običajno srečujemo z enakimi problemi oziroma načini obravnave. Neodvisno od sistema predstavitev signala zajema opis in analizo signalov, medtem ko se procesiranje signalov ukvarja s pretvorbo oziroma povezovanjem signalov pri prenosu in rekonstrukciji avdio, video in radijskih signalov kot tudi vseh bioloških signalov.

Prenos signalov v bioloških sistemih običajno poteka preko proteinskih kaskadnih ciklov, ki so sestavljeni iz proteinskih kinaz in nasprotnih fosfataz. Ti kaskadni cikli so pogosto povezani med seboj v tako imenovane proteinske kaskade, ki jih bomo podrobneje obravnavali v nadaljevanju v poglavju 3. Proteinske kaskade so lahko med seboj povezane še z raznimi navzkrižnimi in povratnimi vezavami v prave kompleksne signalne mreže (glej sliko 3a). O kompleksnosti teh mrež priča tudi dejstvo, da danes

poznamo v posameznih organizmih že več sto različnih kinaz (Sauro 2004). Na medcelični ravni pa imamo opravka s še kompleksnejšimi sistemi, pri katerih biološke signalne mreže dodatno zapletejo različni načini medceličnega sporočanja, kot je na primer komuniciranje s pomočjo živčnega sistema, endokrino sporočanje, limfni sistem in drugo (glej poglavje 1.1).

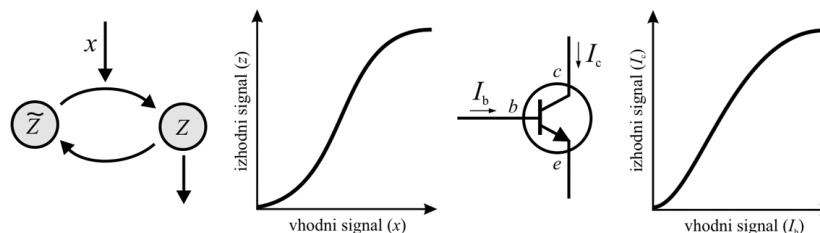
Kompleksne signalne mreže najdemo tudi v tehničnih oziroma elektronskih sistemih (glej sliko 3b). S pojavom tranzistorja v 40-tih letih prejšnjega stoletja se je začel razvoj elektronskih elementov oziroma integriranih vezij bliskovito razvijati. Pojavila so se integrirana vezja, kot so operacijski ojačevalniki (Ragazzini in sod. 1947), ki so vsebovali več deset tranzistorjev, leta 1971 pa se je že pojavil prvi komercialni procesor (Intel 4004, [www.intel.com](http://www.intel.com)), ki je vseboval 2300 tranzistorjev. Sodobni mikroprocesorji računalnikov so sestavljeni že iz več sto milijonov tranzistorjev. Na primer sodobni 64-bitni Intelov procesor, Intel Core 2 (Yorkfield), sestavlja 820 milijonov tranzistorjev ([www.intel.com](http://www.intel.com)). Tako danes tranzistor predstavlja osnovni element sodobnih elektronskih vezij, pri katerih ga uporabljamo za ojačanje signalov, preklapljanje, modulacijo signalov in številne druge namene. Pri tem ostaja izziv, kako združevati vse več tranzistorjev na čim manjšem prostoru.



**Slika 3:** Kompleksen prenos signalov v biološkem in tehničnem sistemu. **a)** Shematični prikaz dela mitogeno aktivirane protein kinazne signalne poti (Kegg 2007), ki je sestavljena iz več kot sto proteinskih kinaz (bioloških stkal). **b)** Del sheme napetostno krmiljenega nizkofrekvenčnega oscilatorja, ki omogoča generiranje signalov različnih oblik (Wilson 2006). Vezje je sestavljeno iz več operacijskih ojačevalnikov, ki skupaj vsebujejo več sto tranzistorjev.

Primerjava med tranzistorjem in kaskadnim ciklom proteinskih kaskad je v smislu osnovnih elementov elektronskih in bioloških signalnih mrež upravičena tudi z vidika

njunih odzivnih karakteristik. Značilnost proteinskih kaskad je namreč tako imenovana »ultrasenzitivnost« (Goldbeter in Koshland 1981, 1984, Ferrell 1998, Arkin 2000), ki omogoča hiter preklon med aktivnim ( $z$ ) in neaktivnim ( $\tilde{z}$ ) stanjem kaskadnega cikla v smislu majhnih sprememb vhodnega signala oziroma koncentracije stimula  $x$  (slika 4a). Kaskadni cikli torej delujejo kot molekulska stikala, katerih odzivna karakteristika (slika 4a) je presenetljivo podobna odzivni karakteristiki kolektorskega toka tranzistorja  $I_c$ , ki ga reguliramo z baznim tokom  $I_b$  (slika 4b).



**Slika 4:** Primerjava odzivnih karakteristik med tranzistorjem in kaskadnim ciklom.

- a)** Koncentracija aktiviranih proteinov ( $z$ ) v odvisnosti od koncentracije stimula  $x$ .  
**b)** Odziv kolektorskega toka  $I_c$  v odvisnosti od baznega toka  $I_b$ .

Omenjena primerjava med kaskadnim ciklom in tranzistorjem (slika 4) kot osnovnima elementoma bioloških in elektronskih signalnih mrež ponuja številne nadaljnje možnosti medsebojnih analogij pri prenosu signalov v bioloških in elektronskih sistemih. Pri tem se seveda pojavi vprašanje, kako razumeti kompleksne signalne mreže bioloških in tehničnih sistemov (glej sliko 3). V elektrotehniki to rešujemo s pomočjo modularne izgradnje kompleksnih elektronskih vezij, pri čemer je poudarek na razumevanju posameznih podenot oziroma modulov elektronskih vezij. Vsaka od teh enot ima pri prenosu signalov svojo specifično funkcijo. Tako danes v kompleksnih elektronskih vezjih prepoznamo posamezne podenote kot razna stikala, oscilatorje, filtre, ojačevalnike itd.

Pri obravnavi bioloških signalnih mrež se pojavi vprašanje, ali je evolucija tudi sledila omenjenemu modularnemu pristopu, ki bi omogočal razumevanje kompleksnih signalnih mrež bioloških sistemov. V zadnjem času se kaže vse več primerov, iz katerih lahko razberemo, da je veliko zasnov oziroma mehanizmov delovanja elektronskih sistemov zelo podobnih mehanizmom delovanja bioloških sistemov, v katerih lahko prav tako najdemo osnovne biološke mehanizme, ki imajo specifične naloge pri prenosu signalov v bioloških sistemih (Arkin 2000, Tyson in sod. 2003, Wolf in Arkin, 2003).

Kot bomo spoznali v nadaljevanju (glej poglavje 3), je danes znano, da je eden najbolj razširjenih mehanizmov celične signalizacije v evkariotskih organizmih mitogensko aktivirana protein kinazna kaskada (MAPK, slika 3). Pokazano je bilo, da proteinske kaskade lahko delujejo kot zelo občutljiva (ultrasenzitivna) stikala

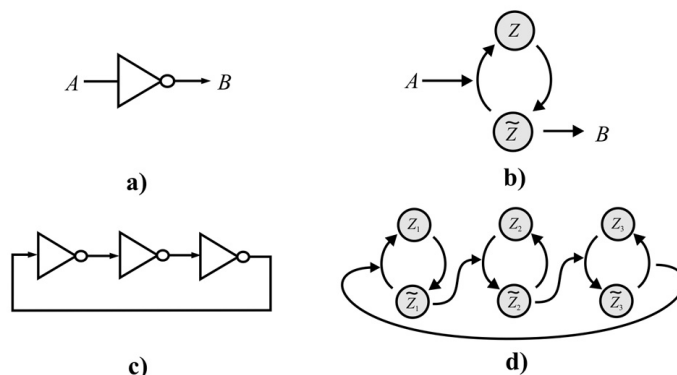


(Goldbeter in Koshland 1981, Goldbeter in Koshland 1984, Koshland in sod. 1982, Fell 1997), kot ojačevalci signalov (Heinrich 2002), oscilatorji (Kholodenko 2000) in filtri (Arkin 2000, Marhl in sod. 2005a, Marhl in sod. 2005b, Chiam in sod. 2005, Gomez 2007), ki omogočajo glajenje signalov (Marhl in Grubelnik 2007) in selektivno regulacijo celičnih procesov (Marhl in sod. 2005a). Iz tega lahko sklepamo, da je tudi narava razvila mehanizme, kot so na primer razni oscilatorji, ojačevalniki, filtri, povratne vezave in drugi. Te analogije omogočajo boljše razumevanje bioloških sistemov v smislu razumevanja osnovnih mehanizmov, ki so odgovorni za prenos informacije v bioloških sistemih.

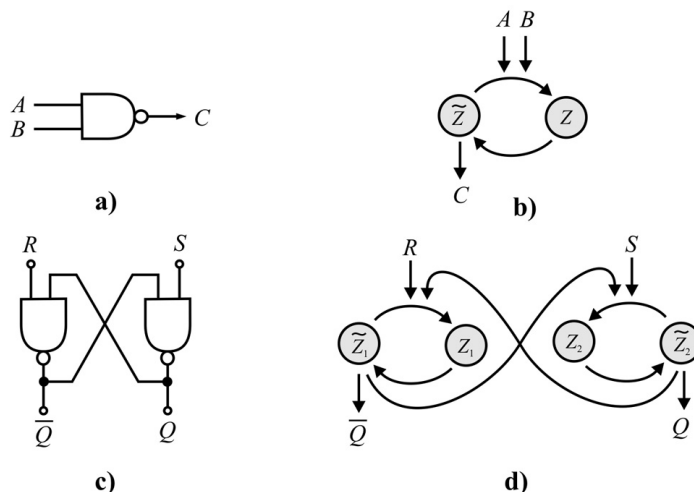
Omenjene analogije med biološkimi in analognimi tehničnimi sistemi lahko z razvojem digitalne tehnike srečamo tudi na tem področju (slika 5). Delovanje digitalne tehnike temelji na osnovnih logičnih vratih, ki omogočajo hitre preklope med aktivnim in neaktivnim stanjem. To so osnovni binarni elementi, ki so z usmerjenimi povezavami povezani med seboj v tako imenovane Boolove mreže. V bioloških sistemih lahko kot uspešno preklopno stikalo obravnavamo proteinski kaskadni cikel, ki deluje v ultrasenzitivnem načinu in omogoča hiter preklon med aktivnim in neaktivnim stanjem (slika 4a). S tega vidika lahko kompleksne signalne mreže bioloških sistemov obravnavamo tudi kot Boolove mreže (Kauffman 1993), ki danes predstavljajo kompleksne matematične modele za modeliranje kompleksnih dinamičnih sistemov.

V nadaljevanju si pogledjmo nekaj preprostih analogij med proteinskimi kaskadnimi cikli in osnovnimi binarnimi elementi digitalne tehnike. Kot osnoven najbolj preprost element, ki ga lahko skonstruiramo s pomočjo kaskadnega cikla so logična *NE* (*NOT*) vrata (slika 5a, b), ki v primeru aktivnega signala na vhodu *A* dajo ničelni signal na izhodu *B*, ničelni signal na vhodu pa povzroči pozitiven signal na izhodu. Kot preprost primer vezja, zgrajenega iz treh logičnih *NE* vrat, je oscilator (slika 5c), ki ga v elektroniki zelo dobro poznamo, možno pa je najti njegove analogije tudi v bioloških sistemih (slika 5d). Ta tip oscilatorja je bil zasnovan z uporabo gensko regulatornih komponent v bakteriji *E. Coli* (Elowitz in Leibler 2000), teoretično pa bi ga lahko zasnovali tudi iz treh kaskadnih ciklov (slika 5d, Gonze in Goldbeter 2001, Sauro 2004). Nadalje si pogledjmo še en primer logičnih *NE-IN* (*NAND*) vrat (slika 6a), ki predstavljajo osnovni element kateregakoli logičnega vezja v digitalni tehniki. Skonstruiramo jih lahko z enim kaskadnim ciklom, katerega aktivacija je pogojena z dvema signaloma *A* in *B* (glej sliko 6b), pri čemer en sam signal ne zadošča za preklon v aktivno stanje. Kot primer vezja zgrajenega iz *NE-IN* vrat omenimo osnovno enobitno spominsko enoto *flip-flop* (slika 6c), ki jo teoretično lahko skonstruiramo tudi iz dveh kaskadnih ciklov (slika 6d). Nadalje lahko s sestavljanjem spominskih enot skonstruiramo večbitne binarne števec, seštevavnike oziroma katerokoli digitalno napravo. S tem se odpirajo tudi nove možnosti iskanja analogij med biološkimi in

tehničnimi sistemi, ki bi dale odgovor, ali biološki sistemi zares komunicirajo na takšen način.



**Slika 5:** Primerjava med logičnimi *NE* (*NOT*) vrati v digitalni tehniki s kaskadnim ciklom celične signalizacije. **a)** Shema logičnih *NE* vrat. **b)** Shema proteinske kaskade z vhodnim signalom  $A$  in izhodnim signalom  $B$ . **c)** Oscilator, zgrajen iz treh *NE* vrat. **d)** Biološki oscilator (Ring oscilator), zgrajen iz treh kaskadnih ciklov (Gonze in Goldbeter 2001, Sauro 2004).



**Slika 6:** Primerjava med logičnimi *NE-IN* (*NAND*) vrati v digitalni tehniki s kaskadnim ciklom celične signalizacije. **a)** Shema logičnih *NE-IN* vrat. **b)** Shema proteinske kaskade z vhodnima signaloma  $A$  in  $B$  ter izhodnim signalom  $C$ . **c)** Enostavna spominska enota *flip-flop*. **d)** Enostavna biološka spominska enota, zgrajena iz dveh kaskadnih ciklov (Sauro 2004).

Iz omenjenih primerov lahko vidimo, da je mogoče najti številne analogije celične signalizacije tako v analogni kot digitalni tehniki, kar priča o tem, da je evolucija verjetno izbrala oboje. Tako danes poznamo primere, kot sta um in delitev celic, ki so naravnani bolj digitalno, po drugi strani pa so analogno zasnovane signalne mreže precej bolj fleksibilne za zaznavanje podatkov v veliko večjem obsegu. Omenjene

analogije nam tudi omogočajo boljše razumevanje kompleksnih bioloških sistemov. Po vzoru kompleksnih elektronskih vezij, zgrajenih iz posameznih modulov, tudi v bioloških sistemih iščemo osnovne mehanizme delovanja, ki so odgovorni za posamezne procese pri prenosu signalov. V ta namen si bomo v nadaljevanju podrobneje pogledali še eno analogijo med biološkimi in tehničnimi sistemi. Proučevali bomo vlogo kaskad pri glajenju signalov s kratkim odzivnim časom (glej poglavje 4) in pri ojačitvi signalov z ohranjanjem pulzne oblike ojačanega signala (poglavje 5).

Pri proučevanju analogij oziroma razumevanju bioloških sistemov velja omeniti še, da se vse bolj uporablja inženirski pristop v smislu obravnave prenosnih funkcij in njihovih frekvenčnih karakteristik (Detwiler in sod. 2000). Glede na podoben način obravnave se v zadnjem času pojavljajo tudi podobne računalniške aplikacije, ki omogočajo dokaj natančne simulacije prenosov signalov, tako v bioloških kot tudi tehničnih sistemih. Kot primer omenimo »Systems Biology Workbench« za proučevanje bioloških sistemov in »Electronics Workbench« za proučevanje analognih in digitalnih elektronskih vezij.

### 1.3 Teze doktorske disertacije

V delu se ukvarjamo s teoretično obravnavo celične signalizacije, ki temelji na proteinskih kaskadah. Te omogočajo fosforilizacijo in defosforilizacijo proteinov, ki je pogojena s koncentracijo kalcija v znotrajceličnem prostoru. Pri tem se omejimo na matematični model, ki obravnava linearno povezovanje posameznih ciklov proteinske aktivacije v kaskade. Model je bil že večkrat uporabljen (Heinrich in sod. 2002, Chaves in sod. 2004, Nakabayashi in Sasaki 2005, Detwiler in sod. 2000) in dovolj dobro opisuje prenos signala od stimula preko posameznih kaskadnih ciklov do končnega odziva celice.

Osrednji cilj doktorske disertacije je pokazati, da lahko proteinske kaskade, katerih aktivacija je pogojena s koncentracijo kalcija v znotrajceličnem prostoru, delujejo kot mehanizem za glajenje signalov. S tem je omogočena konstantna aktivacija proteinov pri oscilirajočem spreminjanju stimula. V našem primeru želimo pokazati, kako lahko s pomočjo proteinskih kaskad z oscilirajočim spreminjanjem kalcija v znotraj celičnem prostoru povzročimo konstantno aktivacijo proteinov, kar je biološkega pomena za regulacijo najrazličnejših celičnih procesov.

Kot drug pomemben cilj je predstaviti proteinske kaskade kot ojačevalce signalov, pri katerih se ohranja pulzna oblika ojačanega signala. To omogoča takojšnjo aktivacijo in deaktivacijo proteinov v smislu sledenja porasta in padanja koncentracije kalcija v znotrajceličnem prostoru. Proteinske kaskade želimo predstaviti kot mehanizem, ki

zagotavlja ojačanje signalov v širokem frekvenčnem območju, kar zagotavlja ohranjanje oblike neharmoničnih signalov.

V smislu razumevanja omenjenih mehanizmov je narejena tudi analogija s tehničnimi sistemi, kjer ne iščemo novih sistemov, temveč želimo poiskati skupne mehanizme bioloških sistemov in električnih vezij. Cilj te analogije je boljše razumevanje bioloških sistemov oziroma proteinskih ojačevalnikov signalov, saj so nam mehanizmi ojačanja signalov v elektrotehniko danes že dobro znani, vse od pojava aktivnih elektronskih elementov, ki omogočajo generiranje in ojačanje signala.

Pri iskanju analogij med mehanizmi delovanja ojačevalnikov signala v celici in v tehniki, obravnavamo lineariziran model proteinskih kaskad ([Heinrich in sod. 2002](#), [Chaves 2004](#), [Nakabayashi in sod. 2005](#), [Detwiler in sod. 2000](#)), katerega uporaba je opravičena pri nizki koncentraciji aktivirane kinaze v primerjavi z njeno totalno aktivacijo. V našem delu želimo pokazati, da obstaja praktično popolna analogija med operacijskim ojačevalnikom in lineariziranim modelom proteinskih kaskad.

Glede na predstavljena stališča in cilje doktorske disertacije v okviru ojačitve in glajenja kalcijevih celičnih signalov s primerjavo modifikacij signalov v tehniki lahko zapišemo naslednje teze:

- Počasna deaktivacija posameznih proteinov omogoča, da oscilirajoče delovanje stimula povzroči konstantno aktivacijo proteinov, vendar ne omogoča kratkih odzivnih časov pri aktivaciji in deaktivaciji proteinov glede na časovno omejeno delovanje stimula.
- Z vezavo proteinov v kaskade je omogočena konstantna aktivacija proteinov tudi pri hitrejši deaktivaciji posameznega proteina. Že malo število proteinskih kaskad omogoča konstantno aktivacijo proteinov s kratkim odzivnim časom glede na časovno omejeno oscilirajoče delovanje stimula.
- Pri vezavi večjega števila proteinov v kaskade se pojavi časovna zakasnitev deaktivacije proteinov glede na prenehanje delovanja stimula.
- Vezava proteinov v kaskade omogoča ojačitev signala v širšem frekvenčnem območju v primerjavi z enako ojačitvijo signala z eno kaskadno stopnjo, kar omogoča ohranjanje oblike pulznih neharmoničnih signalov.
- Mehanizmi delovanja celične signalizacije kažejo analogijo s sistemi v tehniki, kar omogoča njihovo direktno primerjavo in s tem boljše razumevanje bioloških sistemov. Vezava proteinov v kaskade pokaže popolno analogijo mehanizmov

delovanja med operacijskim ojačevalnikom in lineariziranim modelom proteinskih kaskad.

Predstavljene teze predstavljajo osnovno vodilo doktorske disertacije, ki je izključno teoretično delo, v katerem na podlagi matematičnega modeliranja pridemo do novih znanstvenih spoznanj. Namen matematičnega modeliranja je predstaviti mehanizme delovanja celične signalizacije z vključevanjem minimalnih členov v modele, ki še zadovoljivo opišejo delovanje posameznega mehanizma. Simulacije matematičnih modelov vključujejo klasične numerične metode za integracijo dinamičnih sistemov, kot so na primer Runge-Kutta metode za časovne sisteme. Rezultati matematičnih modelov, ki jih dajejo numerične simulacije, bodo podani grafično v obliki raznih karakteristik posameznih količin, ki določajo stanje sistema. Pri primerjavi mehanizmov delovanja ojačevalnikov signalov v elektrotehnik in celici se poslužujemo frekvenčne karakteristike posameznih ojačevalnikov. Izhajamo iz frekvenčne karakteristike operacijskih ojačevalnikov, pri čemer za opis v časovnem prostoru uporabimo Laplacevo transformacijo.

## 1.4 Kratek pregled doktorske disertacije

Prvi del disertacije je posvečen kalcijevim oscilacijam v znotrajceličnem prostoru. Predstavljena je znotrajcelična signalizacija, pri čemer so podrobneje predstavljeni kalcijevi signali v neekscitabilnih celicah, s poudarkom na modeliranju kalcijeve dinamike. Nadalje so predstavljene proteinske kaskade v okviru dekodacije celičnih signalov. Poudarek je na modeliranju dekodacijskih kaskadnih mehanizmov in fiziološkem pomenu proteinskih kaskad v smislu ojačitve signalov in selektivne regulacije celičnih procesov.

V osrednjem delu disertacije so predstavljeni izvorni znanstveni prispevki. Najprej predstavljamo pomen proteinskih kaskad pri glajenju signalov s kratkim odzivnim časom. V naslednjem prispevku pa je predstavljen pomen proteinskih kaskad pri ohranjanju pulzne oblike ojačanih signalov. V obeh primerih je izdelan in predstavljen matematični model z rezultati ter narejena primerjava z modifikacijo signalov v elektrotehnik. Primerjava med biološkimi in električnimi sistemi je narejena v smislu splošnega razumevanja vloge kaskadnih mehanizmov pri glajenju in ojačitvi signalov.

V sklepnem delu disertacije so v okviru zastavljenih tez povzeti glavni rezultati ter nakazane nadaljne možnosti proučevanja direktnih analogij delovanja mehanizmov bioloških in tehničnih sistemov.



## **2 KALCIJEVE OSCILACIJE IN CELIČNA SIGNALIZACIJA**

Za delovanje bioloških sistemov je pomembna celična signalizacija, saj se s prenosom celičnih signalov uravnavajo številne celične funkcije, tako v enostavnih organizmih (prokarioti) (Alves in Savageau 2003, Ulrich in sod. 2005) kot v rastlinskih in živalskih celicah, v katerih je prenos signala veliko bolj kompleksen (Sauro in Kholodenko 2004, Neves in Iyengar 2002). Več o celični signalizaciji je bilo na splošno povedano že uvodoma. V nadaljevanju pa si nekoliko podrobneje pogledjmo vlogo kalcijevih oscilacij pri celični signalizaciji.

Znano je, da je mnogo celičnih procesov reguliranih z oscilirajočimi stimuli. Eden pomembnejših oscilirajočih signalov, ki vplivajo na regulacijo celičnih procesov, so znotrajcelične kalcijeve oscilacije. Gre za oscilirajoče spreminjanje koncentracije prostega kalcija v znotrajceličnem prostoru, kar bomo podrobneje spoznali v nadaljevanju. Osredotočili se bomo na kalcijeve signale v neekscitabilnih celicah, v katerih gre za oscilirajočo izmenjavo kalcija med citoplazmo in celičnimi organeli. Podrobneje bomo predstavili matematično modeliranje kalcijeve dinamike, kar omogoča razumevanje celičnih mehanizmov kalcijevih oscilacij.

### **2.1 Kalcijevi signali v neekscitabilnih celicah**

Kalcij ima pomembno vlogo v bioloških sistemih, sodeluje namreč pri formiranju in stabilizaciji različnih celičnih struktur. Njegova vloga je pomembna tudi v številnih celičnih procesih, kar bomo podrobneje spoznali v nadaljevanju.

Zastopanost kalcija v celičnih strukturah je precej različna. Pri človeku je na primer skoraj ves kalcij (99 %) v kosteh in zobeh, preostanek pa v izvenceličnih raztopinah, v krvi in nekaterih celičnih organelih, predvsem v endoplazemskem retikulumu (ER). Zanimivo je, da je v citoplazmi celice zelo majhen delež kalcija. Tako je na primer povprečna koncentracija prostih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v citoplazmi več tisočkrat manjša kot na primer koncentracija klorovih in kalijevih ionov ter znaša okoli  $0,2 \mu\text{mol l}^{-1}$  (Maurer in sod. 1996). Ravno ta nizka koncentracija prostega kalcija v notranji celični raztopini pa je velikega biološkega pomena pri procesu širjenja signalov. Nizka koncentracija prostega kalcija v citosolu namreč omogoča velike relativne spremembe prostega kalcija, ki prepričljivo odražajo spremembe v celici, ne da bi bilo pri tem ogroženo delovanje celice.

Pomembno vlogo kalcija v procesu prenosa signalov v neekscitabilnih celicah so odkrili in eksperimentalno potrdili že leta 1943 (glej Campbell 1983), ko so prvič pokazali kontrakcijo mišičnih celic z vbrizgavanjem kalcija. Po štiridesetih let je prišlo

tudi do odkritja in eksperimentalnih opazovanj kalcijevih oscilacij, ki imajo pomembno vlogo v procesu prenosa signalov v neekscitabilnih celicah (Cuthbertson in Cobbold 1985, Woods in sod. 1986, Berridge 1989, Cuthbertson 1989, Rooney in sod. 1989). Ugotovljeno je bilo, da se pod vplivom delovanja hormona na celico začne koncentracija kalcija v citoplazmi oscilirajoče spreminjati. To je povzročilo iskanje razlag mehanizmov tega pojava in vse do danes so se pojavili številni matematični modeli (Somogy in Stucki 1991, Dupond in Goldbeter 1993, Kummer 2000, Marhl s sod. 2000, Grubelnik s sod. 2001; za pregled glej Schuster s sod. 2002), ki poskušajo podati čim ustrežnejši opis eksperimentalnih rezultatov znotrajcelične kalcijeve dinamike. Proučevanje kalcijevih oscilacij s tem predstavlja aktualno področje eksperimentalne in teorijske biofizike.

Tako je danes znano, da je kalcij pomemben dejavnik v procesu prenosa informacij v vseh bioloških sistemih, tako v prokariotskih kakor tudi v evkariotskih organizmih. Pomen kalcija se kaže že pri samem nastanku živega bitja, saj ima ključno vlogo v procesu fertilizacije in nato v vseh najpomembnejših bioloških ciklih razvoja živega bitja, kot sta delitev in rast celic. Glede na specifično funkcijo različnih celic se njegova prisotnost odraža v regulaciji številnih pomembnih celičnih funkcij, kot je na primer regulacija metabolizma, kontrakcija mišičnih celic, sekrecija, eksocitoza, kemotaksa, izločanje neurotransmiterjev, biosinteza fosfolipidov ter tudi staranje in apoptoza (Campbell 1983, Alberts in sod. 1994, Berridge 1997, Dumaourier in sod. 1997).

## **2.2 Modeliranje kalcijeve dinamike**

Modeliranje kalcijeve dinamike je aktualno področje znanstveno raziskovalnega dela, ki se ukvarja s prenosom informacij v celici. Pri modeliranju kalcijeve dinamike gre za proučevanje oscilirajočih sprememb koncentracije prostih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v citosolu, kar poznamo kot znotrajcelične kalcijeve oscilacije. Kot smo že omenili, imajo te pomembno vlogo pri prenosu celičnih signalov, saj uravnavajo številne celične funkcije oziroma procese.

Danes je poznanih veliko matematičnih modelov (Somogy in Stucki 1991, Dupond in Goldbeter 1993, Kummer 2000, Marhl s sod. 2000, Grubelnik s sod. 2001; za pregled glej Schuster s sod. 2002), ki opisujejo znotrajcelično kalcijevo dinamiko. Ti modeli vključujejo različne procese znotraj celice, s katerimi skušajo opisati eksperimentalne rezultate znotrajcelične kalcijeve dinamike. Seveda se glede na modelne napovedi in težnje po vključevanju minimalnega števila procesov, ki še zadostno opisujejo določen pojav, modeli med seboj razlikujejo. Nekateri opisujejo enostavne kalcijeve oscilacije (Somogyi in Stucki 1991, Dupond in Goldbeter 1993),



medtem ko so drugi kompleksnejši in vključujejo še dodatne procese na receptorskem delu (Kummer in sod. 2000) oziroma znotrajceličnih shrambah (Marhl in sod. 2000).

Za lažje razumevanje modeliranja kalcijevih oscilacij si v nadaljevanju pogledimo splošno shemo matematičnih modelov kalcijevih oscilacij, pri čemer bomo podrobneje opisali posamezne procese v celici. Seveda se moramo pri tem zavedati, da ne želimo opisati vseh procesov, ki se dogajajo znotraj celice, temveč želimo predstaviti le tiste, ki so ključnega pomena pri nastanku kalcijevih oscilacij in so vključeni v različne matematične modele, tako za enostavne kot kompleksne kalcijeve oscilacije. Na nekaterih konkretnih matematičnih modelih pa si še pogledimo, kako tip dražljaja (H) oziroma njegova koncentracija vpliva na spremembo frekvence  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacij, s čimer je omogočeno frekvenčno kodiranje signala oziroma informacije.

### **Splošna shema matematičnih modelov kalcijevih oscilacij**

Kot je bilo že omenjeno, je danes znanih precej matematičnih modelov, ki opisujejo oscilirajoče spreminjanje kalcija v neekscitabilnih celicah, pri čemer gre za oscilirajočo izmenjavo kalcija med citoplazmo in celičnimi organeli. Glede na modelne napovedi eksperimentalnih rezultatov se modeli med seboj razlikujejo in vključujejo različne procese znotraj celice. V nadaljevanju si zato pogledimo nekaj ključnih procesov, ki so pomembni pri formiranju kalcijevih oscilacij v različnih matematičnih modelih in jih vključimo v splošno shemo matematičnih modelov (slika 7).

Slika 7 prikazuje celico, obdano z zunajceličnim prostorom, pomembne znotraj celične shrambe kalcija in posamezne procese, ki so vključeni v matematične modele in so ključnega pomena pri nastanku kalcijevih oscilacij. Simboli posameznih modelov so med seboj poenoteni in za lažjo primerjavo z modeli zapisani v angleščini (glej Grubelnik s sod. 2001).



koncentracija kalcija v citosolu še dodatno pospeši izločanje kalcija iz ER. Ta pozitiven povraten učinek oziroma mehanizem je znan kot CICR ("Calcium-Induced Calcium Release"; Heinrich in Schuster 1996, Goldbeter 1996) in je tudi eden poglavitnih mehanizmov, ki so odgovorni za nastanek kalcijevih oscilacij. Pri visokih koncentracijah kalcija pa se pojavi negativni povratni učinek kalcija in kanali ( $J_{ER, ch}$ ) se pri dovolj visoki koncentraciji zaprejo (Bezprozvany in sod. 1991). Kalcij se veže tudi na vezavna mesta proteinov, kar si bomo podrobneje ogledali v nadaljevanju pri aktivaciji proteinskih kaskad (poglavje 3). S povečanjem koncentracije prostega kalcija v citosolu se vse bolj povečuje tudi aktivnost ATP-az v zunajcelični membrani in membrani ER, ki prečrpavajo kalcij izven celice ( $J_{out}$ ) in nazaj v ER ( $J_{ER, pump}$ ). Koncentracija prostega kalcija v citosolu se tako vrne nazaj na osnovno vrednost in celoten cikel se lahko ponovno ponovi, kar se odraža v oscilirajočem spreminjanju koncentracije prostega  $Ca^{2+}$  v citosolu. Nekateri modeli (Marhl in sod. 1998) vključujejo kot znotrajcelično shrambo  $Ca^{2+}$  tudi mitohondrije, za katere je bilo pokazano (Grubelnik in sod. 2001), da učinkovito vplivajo na regulacijo amplitude  $Ca^{2+}$  oscilacij. To jim omogoča hitro zajemanjem prostega  $Ca^{2+}$  ( $J_{m, in}$ ), ki sledi (RaM) mehanizmu (Gunter in sod 2000), ko koncentracija prostega  $Ca^{2+}$  v citosolu preveč naraste in bistveno počasnejše izločanje  $Ca^{2+}$  nazaj v znotrajcelični prostor ( $J_{m, out}$ ), ki je odvisno od koncentracije prostega kalcija v mitohondrijih ( $Ca_m$ ). Na pomen mitohondrijev kažejo tudi eksperimentalni rezultati (Ichas in sod. 1994, Ichas in sod. 1997, Jouaville in sod. 1998, Rizzuto in sod. 1999, Rizzuto in sod. 2000, Rutter in Rizzuto 2000, Jacony in sod 2000, Duchon 2000), ki so pokazali, da imajo mitohondriji pomembno vlogo pri oblikovanju  $Ca^{2+}$  oscilacij. Kot znotrajcelična shramba namreč aktivno sodelujejo pri shranjevanju kalcija.

Opisan mehanizem torej omogoča oscilirajoče spremembe koncentracije prostega kalcija v citosolu, ki so znane kot kalcijeve oscilacije in imajo pomembno vlogo pri prenosu celičnih signalov. Kot primer omenimo pojav različnih vzorcev in frekvenc  $Ca^{2+}$  oscilacij v odvisnosti od vrste in koncentracije stimula (H). S tem je omogočeno frekvenčno kodiranje informacije v kalcijevih oscilacijah, kar bomo podrobneje spoznali v nadaljevanju.

## **Frekvenčno kodiranje kalcijevih oscilacij**

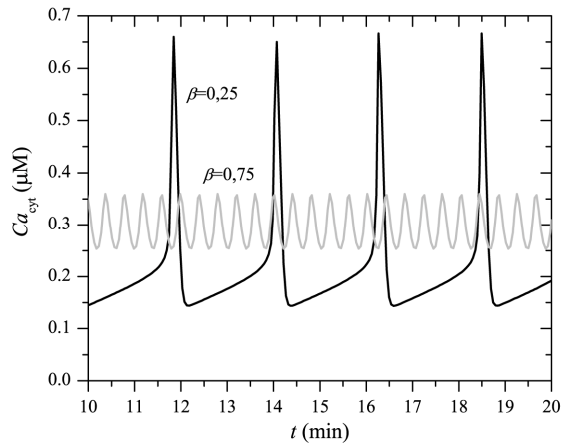
Veliko celičnih procesov je reguliranih tako, da se v odvisnosti od tipa dražljaja kot tudi njegove koncentracije pojavijo različni vzorci in frekvence  $Ca^{2+}$  oscilacij, kar omogoča frekvenčno kodiranje signala oziroma informacije, ki se prenaša s kalcijevimi oscilacijami. Eksperimentalni rezultati namreč kažejo, da spreminjanje frekvence  $Ca^{2+}$  oscilacij resnično vpliva na nekatere celične procese, kot je na primer ekspresija genov

(Dolmetsch in sod. 1998, Li in sod. 1998) in delovanje encimov (Oancea in Mayer 1998, Koninck in Schulman 1998, Putney 1998, Dupont in Goldbeter 1998, Gall in Dupont 2000), kar potrjuje kodiranje informacij v frekvenci  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacij. V nekaterih celicah se časovni interval med dvema  $\text{Ca}^{2+}$  pulzoma spreminja od nekaj sekund do nekaj minut ali celo do nekaj deset minut (Goldbeter 1996), medtem ko ostaja amplituda oscilacij v večini primerov konstantna. Tako danes na podlagi eksperimentalnih rezultatov že skoraj vsi teoretični modeli vključujejo frekvenčno spreminjanje kalcijevih oscilacij v odvisnosti od stimuliranosti celice.

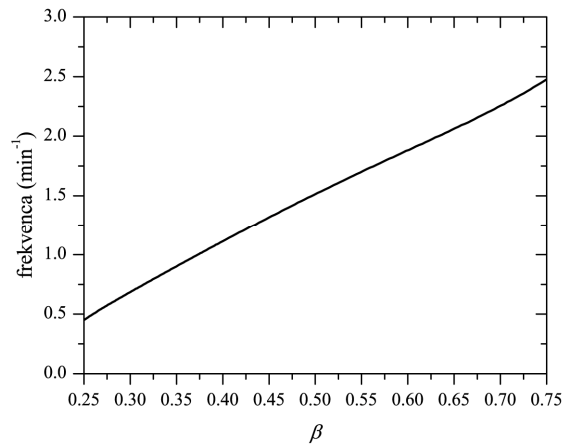
Pri nekaterih enostavnih matematičnih modelih (Somogy in Stucki 1991, Dupond in Goldbeter 1993, Kummer 2000), ki opisujejo kalcijeve oscilacije, se je sicer pojavil problem zagotavljanja konstantne amplitude  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacij v citosolu pri spreminjanju frekvence oscilacij. To pomeni, da koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  v citosolu lahko pri določeni frekvenci naraste preko zgornje meje, ki je sprejemljiva za normalno delovanje celice. Povišanje koncentracije, ki je bodisi previsoko ali pa traja predolgo, je namreč toksično in povzroči v celici trajne nepopravljive poškodbe, ki lahko celico tudi uničijo.

Z vključevanjem mitohondrijev v različne matematične modele (Marhl in sod. 1998, Grubelnik in sod. 2001) pa je bila omogočena tudi amplitudna regulacija  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacij. Za različne matematične modele, tako za enostavne (Somogyi in Stucki 1991, Dupond in Goldbeter 1993) kot tudi kompleksne kalcijeve oscilacije (Kummer in sod. 2000, Marhl in sod. 2000), je bilo pokazano, da mitohondriji kot znotrajcelična shramba  $\text{Ca}^{2+}$  učinkovito vplivajo na regulacijo amplitude  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacij (Grubelnik s sod. 2001). S tem je bila zagotovljena konstantna amplituda pri spreminjanju frekvence  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacij, kar omogoča kodiranje informacije v frekvenci kalcijevih oscilacij.

V nadaljevanju si na konkretnem modelu (Dupond in Goldbeter 1993), ki opisuje enostavne znotrajcelične kalcijeve oscilacije, pogledimo, kako se spreminja oblika in frekvenca kalcijevih oscilacij v citosolu v odvisnosti od stimuliranosti celice. Stimuliranost celice je v tem primeru zasnovana na aktivaciji inositol trifosfata ( $\text{IP}_3$ ; parameter  $\beta$ , glej Dupond in Goldbeter 1993), ki kot prenašalec signala v citosolu zelo hitro difundira in aktivira  $\text{IP}_3$ -receptorje, ki se nahajajo na kalcijevih kanalih v zunajcelični membrani ( $J_{\text{in}}$ , slika 7) in v membrani ER ( $J_{\text{ER, ch}}$ , slika 7), kar povzroči oscilirajoče spreminjanje koncentracije kalcija v znotrajceličnem prostoru. Na sliki 8 so razvidne oscilirajoče spremembe kalcija v citosolu za dve različni vrednosti parametra  $\beta$ . Iz slike je razvidno, da v odvisnosti od stimuliranosti celice, dobimo različno obliko in frekvenco oscilacij. O spreminjanju frekvence oscilacij oziroma o možnosti frekvenčnega kodiranja priča tudi slika 9, s katere je razvidno skoraj linearno naraščanje frekvence z večanjem parametra  $\beta$  oziroma koncentracije  $\text{IP}_3$ .

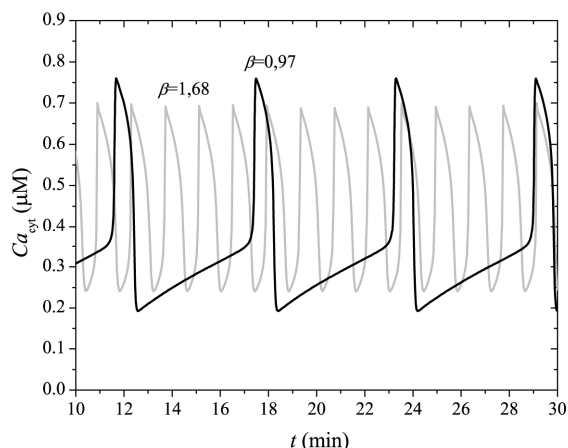


**Slika 8:** Prikaz oscilirajočega spreminjanja prostega kalcija v citosolu ( $Ca_{\text{cyt}}$ ) za dve različni vrednosti parametra  $\beta$  v modelu, ki sta ga zasnovala Dupond in Goldbeter leta 1993. Ostale vrednosti parametrov so enake kot v prispevku (Grubelnik in sod. 2001; slika 4a).

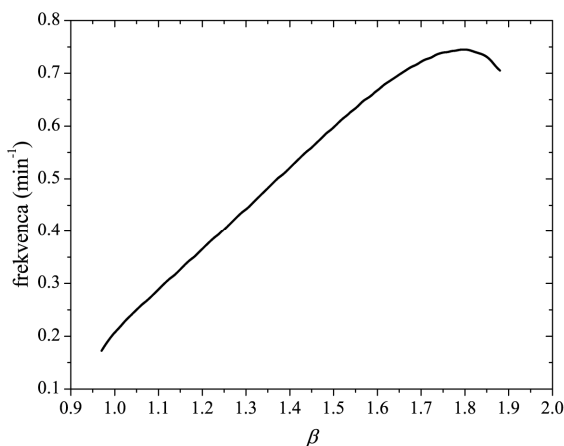


**Slika 9:** Prikaz spreminjanja frekvence  $Ca^{2+}$  oscilacij v odvisnosti od stimulanosti celice (parameter  $\beta$ , Dupond in Goldbeter leta 1993). Ostale vrednosti parametrov so enake kot v prispevku (Grubelnik in sod. 2001; slika 4a).

Pri omenjenem modelu je s spremembo frekvence mogoče zaznati tudi spremembo amplitude oscilacij (glej sliko 8), ki pa z dodatnim vključevanjem mitohondrijev v model ostaja približno konstantna (glej Grubelnik in sod. 2001). To lahko razberemo tudi s slike 10, na kateri je prikazan časovni potek oscilacij za dva različna primera stimulanosti celice ( $\beta$ ). Vidimo lahko, da amplituda oscilacij ostaja približno konstantna, medtem ko se frekvenca oscilacij tudi v tem primeru spreminja v odvisnosti od stimulanosti celice (slika 11), kar omogoča kodiranje informacije v frekvenci kalcijevih oscilacij.



**Slika 10:** Oscilirajočo spreminjanje prostega kalcija v citosolu ( $Ca_{\text{cyt}}$ ) za dve različni vrednosti parametra  $\beta$  v modelu (Dupond in Goldbeter, 1993), kateremu so bili dodani mitohondriji. Ostale vrednosti parametrov so enake kot v prispevku (Grubelnik in sod. 2001; slika 4a).



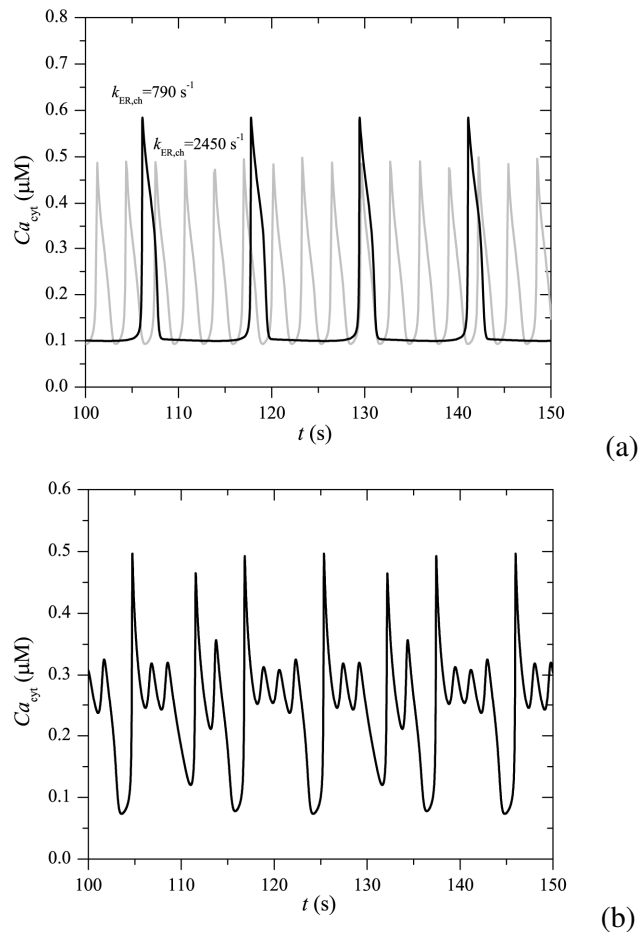
**Slika 11:** Prikaz spreminjanja frekvence  $Ca^{2+}$  oscilacij v odvisnosti od parametra  $\beta$  za model (Dupond in Goldbeter, 1993), kateremu so dodani mitohondriji kot znotrajcelična shramba kalcija. Ostale vrednosti parametrov so enake kot v prispevku (Grubelnik in sod. 2001; slika 4a).

Ker je bilo eksperimentalno pokazano, da v celici ne gre vedno za enostavno pulziranje prostega  $Ca^{2+}$  (slika 8 in 10), ampak lahko nastopajo tudi bolj kompleksni vzorci  $Ca^{2+}$  oscilacij, so bili izdelani tudi matematični modeli, ki omogočajo kompleksne oscilacije (Kummer s sod., 2000; Marhl s sod., 2000).

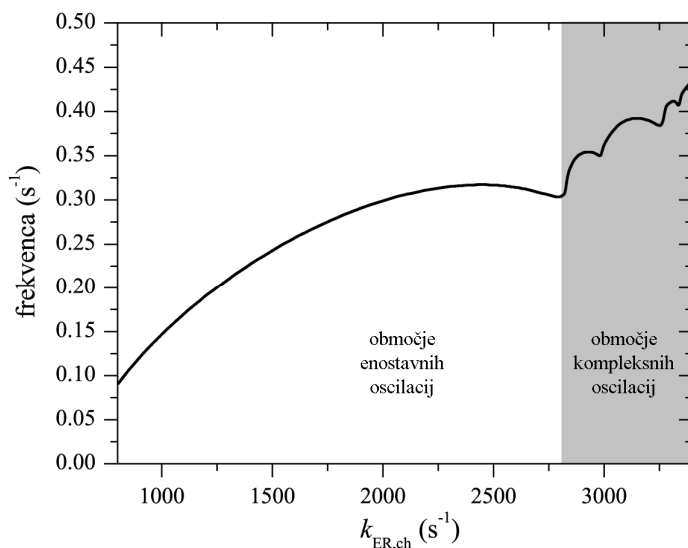
Kot primer vzemimo model (Marhl s sod., 2000), ki omogoča v odvisnosti od stimuliranosti celice tako enostavne (slika 12a) kot tudi kompleksne kalcijeve oscilacije (slika 12b). Pri določenih pogojih pa je mogoče zaznati tudi kaotično obnašanje oscilacij (Grubelnik in sod. 2001). Na sliki 12a lahko vidimo značilno pulzno obliko

enostavnih oscilacij za dve različni vrednosti parametra  $k_{ER, ch}$ , s katerim je simulirana stimulanost celice. Sprememba parametra ( $k_{ER, ch}$ ) povzroči spremembo frekvence oscilacij, kar je dobro razvidno iz [slike 13](#), ki ponazarja spreminjanje frekvence  $Ca^{2+}$  oscilacij v odvisnosti od stimulanosti celice. To je mogoče zaznati tako v območju enostavnih oscilacij ([slika 13, belo območje](#)) kot tudi kompleksnih ([slika 13, sivo območje](#)), pri katerih opazujemo prevladujočo frekvenco kompleksnih oscilacij.

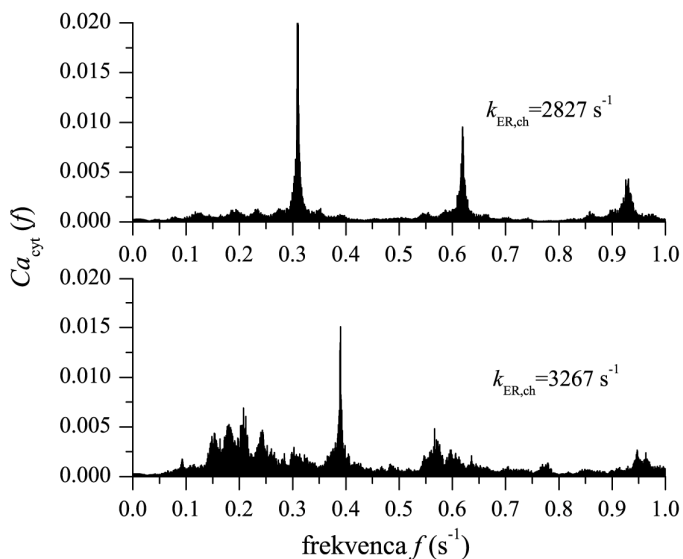
Spremembo prevladujoče frekvence oscilacij je mogoče zaznati tudi v območju kaotičnega obnašanja. Te oscilacije niso periodične, vendar imajo določeno prevladujočo frekvenco. S [slike 14](#), na kateri sta prikazana frekvenčna spektra kaotičnih oscilacij, lahko razberemo, da je za vrednost  $k_{ER, ch}=2827 \text{ s}^{-1}$  izrazita frekvenca pri  $f=0,31 \text{ s}^{-1}$ , za vrednost  $k_{ER, ch}=3267 \text{ s}^{-1}$  pa  $f=0,39 \text{ s}^{-1}$ , kar priča o tem, da omogoča model frekvenčno kodiranost tudi v primeru kaotičnih  $Ca^{2+}$  oscilacij.



**Slika 12:** Oscilirajoče spreminjanje koncentracije  $Ca^{2+}$  v znotrajceličnem prostoru za model (Marhl s sod., 2000). **(a)** Prikaz enostavnih pulznih oscilacij za dve različni vrednosti parametra  $k_{ER, ch}$ , s katerim simuliramo stimulanost celice. **(b)** Prikaz kompleksnih oscilacij ( $k_{ER, ch}=3570 \text{ s}^{-1}$ ). Ostale vrednosti parametrov so enake kot v prispevku (Grubelnik in sod. 2001; slika 6b).



**Slika 13:** Prikaz prevladujoče frekvence  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacij v odvisnosti od stimuliranosti celice za model (Marhl s sod., 2000). Ostale vrednosti parametrov so enake kot v prispevku (Grubelnik in sod. 2001; slika 6b).



**Slika 14:** Prikaz prevladujoče frekvence  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacij v odvisnosti od stimuliranosti celice za model (Marhl s sod., 2000). Ostale vrednosti parametrov so enake kot v prispevku (Grubelnik in sod. 2001; slika 6b).

Iz omenjenih matematičnih modelov tako za opis enostavnih kot kompleksnih kalcijevih oscilacij, lahko torej zaznamo spreminjanje frekvence  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacij v odvisnosti od tipa oziroma koncentracije dražljaja (slika 9, 11, 13, 14). Ker je bil



pokazan vpliv spreminjajoče frekvence  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacij na celične procese tudi eksperimentalno (Dolmetsch in sod. 1998, Li in sod. 1998, Oancea in Mayer 1998, Koninck in Schulman 1998, Putney 1998, Dupont in Goldbeter 1998, Gall in Dupont 2000), lahko na podlagi eksperimentalnih rezultatov in napovedih omenjenih matematičnih modelov vidimo, da imamo dejansko opraviti s frekvenčnim kodiranjem signala oziroma informacije, ki se prenaša s kalcijevimi signali.

Do sedaj smo torej spoznali možnosti frekvenčnega kodiranja pri prenosu signalov znotraj celice, v nadaljevanju pa si pogledajmo možnosti dekodiranja teh signalov, kar privede do aktivacije posameznih procesov znotraj celice. Pomembno vlogo pri tem imajo proteinske kaskade, pri katerih je eden od ključnih mehanizmov pri prenosu signalov fosforilacija proteinov. Proteinske kaskade namreč aktivno sodelujejo pri prenosu signalov znotraj celice kot na primer pri ojačanju signalov (Stadtman in Chock 1977, Koshland in sod. 1982, Chock 1980, Goldbeter in Koshland 1981, Goldbeter in Koshland 1982, Goldbeter in Koshland 1984, Heinrich 2002, Mayawala 2004), filtriranju (Marhl in sod. 2005a, Marhl in sod. 2005b, Chiam in sod. 2005, Arkin 2000) in glajenju oscilirajočih signalov (Marhl in Grubelnik 2007), kar si bomo podrobneje pogledali v nadaljevanju.

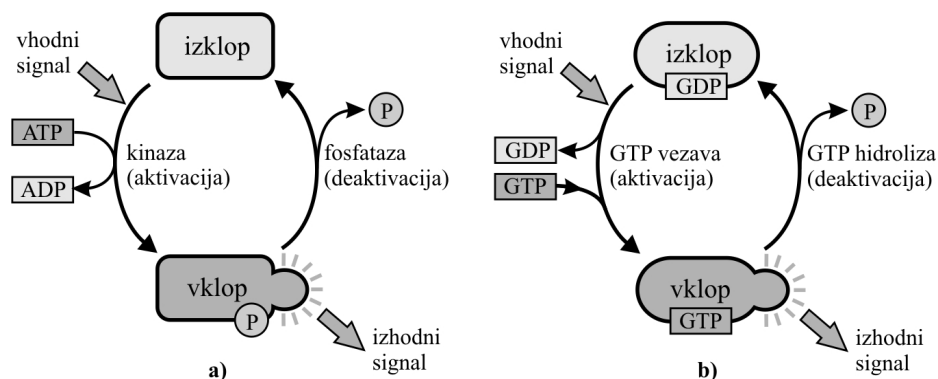


### 3 PROTEINSKE KASKADE IN DEKODACIJA CELIČNIH SIGNALOV

Kot smo spoznali uvodoma (glej poglavje 1.1), se celice v telesu nenehno odzivajo na določene dražljaje, ki so lahko kemični, električni ali mehanski. To so signalne molekule, kot so razni hormoni (adrenalin, inzulin), lokalni posredniki (rastni faktorji), nevrottransmiterji in kontakne molekule. Te signalne molekule (stimuli) običajno ne delujejo direktno na ciljna mesta v celici, kjer se odražajo spremembe, kot je na primer ekspresija genov, ampak se prenos signala znotraj celice običajno prenaša preko več različnih posrednikov.

Velike hidrofilne molekule se vežejo na receptorje na površini celice, manjše hidrofobne (steroidni hormoni) pa na receptorje v celici. Ko se pod vplivom signalne molekule (stimula) aktivira receptorski kompleks, ta nadalje aktivira sintezo posrednih prenašalcev informacije v celici. Ti posredniki so lahko razne proteinske kinaze in drugi sekundarni prenašalci informacije, kot so kalcijevi ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , o čemer smo več povedali v [predhodnem poglavju](#). V nadaljevanju pa si nekoliko podrobneje pogledimo vlogo proteinov pri prenosu signalov.

V celici se nahajajo tako imenovani signalni proteini, ki delujejo kot molekulska stikala ([Goldbeter in Koshland 1981, 1984, Ferrell 1998, Arkin 2000](#)), ki usmerjajo oziroma posredujejo informacije znotraj celice. Delovanje teh molekulskih stikal, oziroma prenos signala znotraj celice, pa seveda zahteva tudi porabo energije. Molekulska stikala zato vključujejo mehanizem za dodajanje oziroma odzemanje ene ali več visoko energijskih fosfatnih skupin, pri čemer ločimo dve vrsti teh stikal ([slika 15](#)). Veliko število signalnih proteinov se aktivira s fosforilacijo serinskih, treoninskih ali tirozinskih ostankov ([Li in Qian 2003](#)). To so proteinske kinaze, ki pod vplivom sprejete informacije s fosforilacijo aktivirajo protein ([slika 15a](#)), ki s svojo nadaljnjo aktivnostjo omogoča nadaljnji prenos informacije oziroma signala. Defosforilacija, ki jo pospešujejo fosfataze, signalne proteine deaktivira in s tem izklopi prenos signala ([slika 15a](#)). Kot biološka stikala delujejo tudi tako imenovani G proteini ([slika 15b](#)), ki smo jih omenili že pri [modeliranju kalcijeve dinamike](#) (glej poglavje 2.2). Ti proteini omogočajo komunikacijo med receptorji in encimi ali ionskimi kanali, ter imajo sposobnost interakcije z gvaninskimi nukleotidi, kar jim daje tudi ime. Sestavljeni so iz treh podenot, pri čemer se gvaninski nukleotidi vežejo na alfa podenoto. V neaktivnem stanju G protein tvori stabilen in neaktiven kompleks, ki vsebuje gvanozin difosfat (GDP) vezan na alfa podenoto. Po vezavi liganta na receptor, pa GDP disocira in ga nadomesti gvanozin trifosfat (GTP) ([Li in Qian 2003](#)). S tem postane protein aktiven ([slika 15b](#)) in lahko reagira z različnimi encimi in ionskimi kanali. V neaktivno stanje se protein vrne s hidrolizo GTP v GDP ([slika 15b](#)).

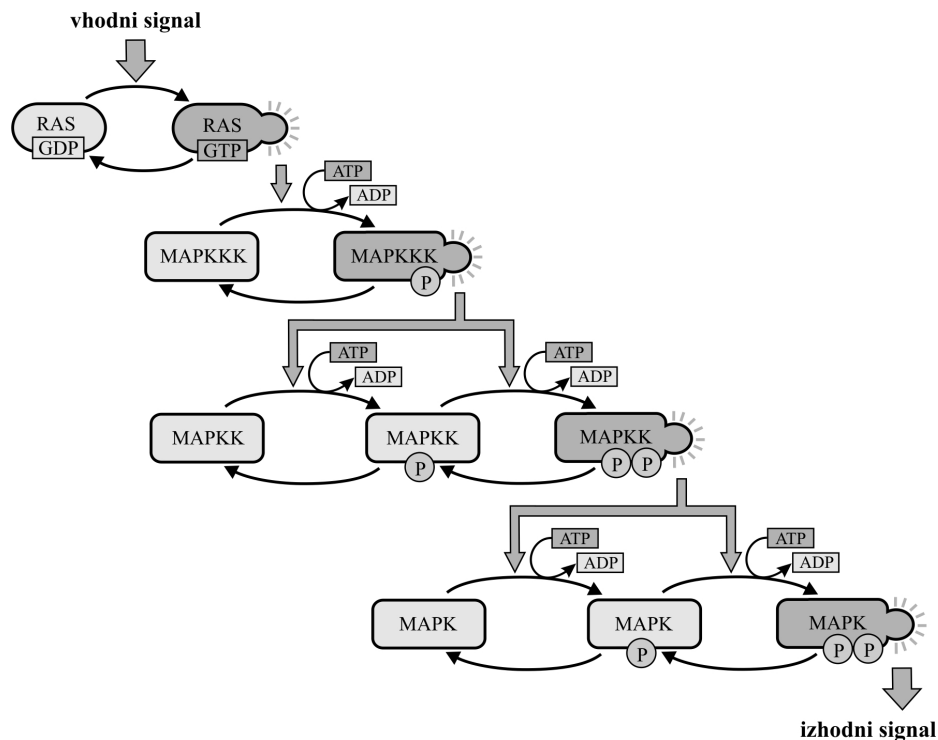


**Slika 15:** Znotrajcelični signalni proteini delujejo kot molekulska stikala. **(a)** Aktivacija proteinov s fosforilizacijo in deaktivacija s fosfatazo. **(b)** Aktivacija G proteina z vezavo GTP in deaktivacija s hidrolizo GTP.

Omenjena biološka stikala (slika 15) pa v celici običajno sodelujejo med seboj, pri čemer so posamezne proteinske kinaze povezane med seboj v razne signalne kaskade (Ferrell 1996, Pearson in sod. 2001, Stadtman in Chock 1977, Koshland in sod. 1982, Widmann in sod. 1999), ki so lahko med seboj prepletene v kompleksne signalne mreže (Sauro in Kholodenko 2004, Neves in Iyengar 2002), kar omogoča kompleksno in s tem učinkovito odzivnost celice glede na delovanje stimulov.

Kot primer omenimo mitogeno aktivirano protein kinazno kaskado (MAPK), aktivacija katere je pogojena z G proteinom RAS (glej sliko 16). Ko celica zazna ustrezen signal, se aktivira protein RAS, ki nadalje vpliva na fosforilacijo kinaze MAPKKK. Ta se s fosforilacijo aktivira in s tem vpliva na fosforilacijo naslednje kinaze MAPKK, ki postane aktivna in vpliva na fosforilacijo kinaze MAPK. Aktivacija te kaskade nadalje povzroči ustrezen odziv celice v smislu regulacije ustreznih prepisovalnih faktorjev, ki vplivajo na ekspresijo genov (Li in Qian 2003).

Podrobnejšo vlogo vključevanja proteinsko kinaznih kaskad, kot je omenjena MAPK kaskada, v znotrajcelično signalizacijo, pa bomo spoznali v nadaljevanju. V okviru fiziološkega pomena proteinskih kaskad bomo izpostavili njihovo vlogo predvsem v smislu dekodacije celičnih signalov.



**Slika 16:** Mitogeno aktivirana protein kinazna kaskada (MAPK), ki se aktivira pod vplivom G proteina RAS. Kinaza MAP3K se fosforilira in aktivira, kar nadalje vpliva na fosforilacijo MAP2K kinaze v dveh stopnjah, ta pa nadalje na aktivacijo oziroma fosforilacijo MAPK kinaze.

### 3.1 Fiziološki pomen proteinskih kaskad

Že večkrat smo omenili, da je odzivanje celice na spremembe v okolici in s tem v celici omogočeno z različnimi receptorji, ki zaznavajo signalne molekule. Aktivacija receptorjev pa nadalje sproži prenos informacije preko različnih posrednikov, vse do končnega cilja, ki je odgovoren za ustrezen odziv celice. Običajno so to razni encimi, ki pospešujejo posamezne procese v celici in prepisovalni faktorji, ki regulirajo ekspresijo genov, kar privede do različnih bioloških posledic, kot je celična rast, celična diferenciacija ali celična smrt.

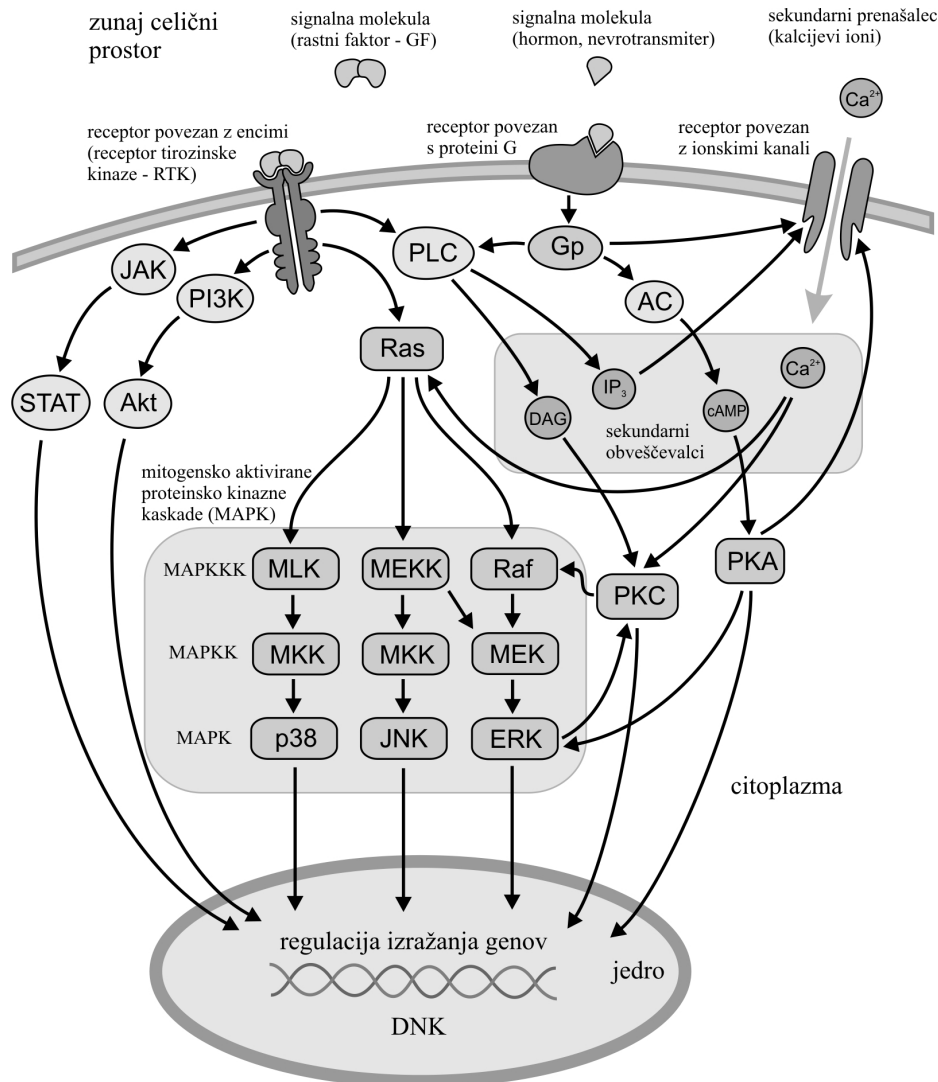
Tako danes poznamo različne receptorje, ki s svojo aktivnostjo sprožijo različne nize signalnih kaskad (glej sliko 17). Kot primer omenimo receptorje povezane z encimi, kot je receptor tirozinske kinaze (RTK). Deluje kot encim in se aktivira pod vplivom signalnih molekul, kot so na primer razni rastni faktorji (GF). Z aktivacijo receptorskega kompleksa se sprožijo različni nizi signalnih kaskad, kot so na primer

Jak-Stat, Ras-Raf-Mek-Erk in PI3K-Akt signalne poti. Tako pri Jak-Stat signalni poti receptor aktivira Janusovo (JAK) tirozin-kinazo, ki se fosforilira in nadalje aktivira STAT gen regulatorni protein. Ta potuje v jedro in deluje kot transkripcijski faktor, ki regulira izražanje genov. Podobno je tudi pri PI3K-Akt signalni poti, kjer fosfatidilinozitol 3-kinaza vpliva na aktivacijo protein kinaze PKB/Akt, ki nadalje aktivira različne procese znotraj celice. Preko aktivacije G proteina RAS oziroma protein kinaze C se lahko aktivira tudi Raf-Mek-Erk signalna pot, ki jo poznamo kot mitogensko aktivirano protein kinazno kaskado (MAPK), ki smo jo predhodno že omenili (glej sliko 16), njen fiziološki pomen v smislu dekodacije celičnih signalov po bomo opisali v nadaljevanju.

Podobno kot receptorji povezani z encimi, tudi receptorji povezani s proteini G povzročijo aktivacijo različnih nizov signalnih poti (glej sliko 17), ki povzročajo različne fiziološke učinke. Tako na primer v ledvicah sodelujejo pri zadrževanju vode, v možganskih nevronih pri spremembi električne aktivnosti in v posebnih celicah v nosu pri vohanju. Ko se signalna molekula (hormon) veže na receptor, se aktivira alfa podenota G proteina (glej sliko 15b), ki lahko direktno vpliva na receptorje povezane z ionskimi kanali, ali pa nadalje aktivira fosfolipazo C (PLC) oziroma adenil ciklazo (AC). Fosfolipaza C nadalje formira diacil-glicerol (DAG) in inositol trifosfat ( $IP_3$ ), ki vpliva na odprtje ionskih kanalov prepustnih za  $Ca^{2+}$  ione, kar smo podrobneje opisali že pri modeliranju kalcijeve dinamike (glej sliko 7). Aktivna adenil ciklaza (AC) pa nadalje formira ciklični adenozin monofosfat cAMP, ki podobno kot  $Ca^{2+}$ , DAG in  $IP_3$  deluje kot sekundarni prenašalec informacije znotraj posameznega niza signalnih kaskad (glej sliko 17). Pod vplivom sekundarnih prenašalcev se tako lahko aktivira protein kinaza A (PKA) oziroma protein kinaza C (PKC), ki lahko nadalje aktivira že omenjeno MAPK kaskado, ali pa direktno vpliva na regulacijo izražanja genov v celičnem jedru. Prenos signala vzdolž MAPK kaskade lahko poteka tudi po različnih poteh, kjer različni zunajcelični signali aktivirajo različne MAPK kaskadne poti, kot so tako imenovane ERK, JNK in p38 signalne poti (glej sliko 17), ki vodijo do različnih celičnih odzivov oziroma bioloških posledic.

Kot smo lahko videli (glej sliko 17), je prenos signala znotraj celice lahko izvršen preko različnih signalnih poti, kjer imamo zaporedno vezanih več proteinskih kinaz v tako imenovane signalne kaskade, aktivacijo katerih lahko sprožijo tudi različni sekundarni prenašalci informacij. Seveda velja pri tem omeniti, da smo nakazali le nekaj izmed mnogih signalnih poti, ki sodelujejo pri kompleksni znotrajcelični signalizaciji. Znotraj posamezne signalne poti tudi nismo prikazali vseh znanih komponent, temveč smo nakazali le nekatere bistvene povezave s katerimi smo želeli pokazati možnosti prenosa signala vzdolž posameznih signalnih kaskad. Pri tem velja omeniti tudi to, da lahko posamezne signalne poti med seboj navzkrižno sodelujejo, da je znotraj posamezne kinaze možna fosforilacija več vezavnih mest (glej sliko 16) in da

so vzdolž prenosa signala lahko prisotne tudi razne povratne vezave. Znotrajcelična signalizacija je torej zasnovana na kompleksnih signalnih mrežah (Sauro in Kholodenko 2004, Neves in Iyengar 2002), ki omogočajo zaznavanje številnih dražljajev, kompleksno regulacijo in s tem optimalen odziv celice glede na zunanje dražljaje.



**Slika 17:** Primer signalnih poti pri znotrajcelični signalizaciji. Signalna molekula rastnega faktorja (GF) aktivira receptor tirozin kinaze (RTK), kar vodi do aktivacije različnih signalnih poti (JAK-STAT, Ras-MAPK, PI3K-Akt, PLC-DAG-PKC signalna pot). Signalna molekula (hormon) aktivira receptor povezan s proteini G, ki nadalje aktivira fosfolipazo C (PLC) oziroma adenil ciklazo (AC). Te nadalje sprožijo sintezo sekundarnih prenašalcev informacij, kot so diacilglicerol (DAG), inozitol trifosfat (IP<sub>3</sub>) in kalcijevi ioni (Ca<sup>2+</sup>). Na shemi seveda niso prikazane vse znane komponente posamezne signalne poti in njihove navzkrižne povezave, ki vodijo signal do ustreznega cilja (regulacija izražanja genov).

Zaradi kompleksnosti znotrajcelične signalizacije se v nadaljevanju omejimo na pomen posameznih kaskadno vezanih kinaz, kot je mitogensko aktivirana protein kinazna kaskada (MAPK, [glej sliko 16](#)), ki je bila v preteklosti že večkrat proučena. To je upravičeno z vidika razumevanja osnovnih mehanizmov znotrajcelične signalizacije, delovanje katerih je omogočeno na podlagi proteinskih kaskad.

Precej je bilo narejeno v smislu ojačanja signalov, kjer je bilo pokazano, da proteinske kaskade resnično delujejo kot ojačevalci signalov ([Stadtman in Chock 1977](#), [Koshland in sod. 1982](#), [Chock 1980](#), [Goldbeter in Koshland 1981](#), [Goldbeter in Koshland 1982](#), [Goldbeter in Koshland 1984](#), [Heinrich 2002](#), [Mayawala 2004](#)). Proteinskim kaskadam pripisujejo poleg ojačitve signalov tudi generiranje ultra senzitivnih odzivov. Pokazano je bilo, da kaskade omogočajo spreminjaje stopnjevanih vhodnih signalov v občutljive vklopno-izklopne odzive, kar jim daje vlogo učinkovitih kemijskih stikal, občutljivih na spremembe vhodnih signalov ([Stadtman in Chock 1977](#), [Goldbeter in Koshland 1981](#), [Goldbeter in Koshland 1984](#), [Koshland in sod. 1982](#), [Huang in Ferrell 1996](#), [Ferrell 1996](#), [Bagowski in Ferrell 2001](#), [Bagowski in sod. 2003](#)). Za MAPK kaskado je bilo to potrjeno tudi eksperimentalno ([Ferrell in Machleder 1998](#), [Bagowski in Ferrell 2001](#), [Bagovski in sod. 2003](#)). Proteinske kaskade lahko delujejo tudi kot filtri ([Detwiler 2000](#), [Chiam 2005](#)). V smislu pasovno prepustnih filtrov je bilo pokazano, da proteinske kaskade omogočajo selektivno regulacijo celičnih procesov za časovno omejene signale ([Marhl in sod. 2005a](#), [Marhl in sod. 2005b](#)). S tega vidika delujejo proteinske kaskade kot dekodacijski mehanizem za prepoznavanje informacije zapisane v znotrajceličnih kalcijevih oscilacijah, kjer gre običajno za frekvenčno kodiranje informacije ([glej poglavje 2.2](#)). Vloga proteinskih kaskad se kaže tudi pri hitrosti razširjenja signalov, kjer optimalna dolžina oziroma število kaskad omogoča hitrejšo razširjanje signalov ([Heinrich in sod. 2002](#), [Nakabayashi in Sasaki 2005](#), [Chaves in sod. 2004](#)).

Kot lahko vidimo je vloga proteinskih kaskad v znotrajcelični signalizaciji zelo razširjena, vse od ojačitve signalov, prepuščanja signalov v smislu občutljivih vklopno-izklopnih stikal, filtriranja in hitrosti razširjanja signalov. V nadaljevanju pa bomo vlogo proteinskih kaskad proučili še v primeru prenosa oscilirajočih signalov. Znano je namreč, da lahko prenos signala preko MAPK kaskade povzroči tudi povečana koncentracija kalcija ([Kamp in Hell 2000](#), [Walker in sod. 2003](#), [Kupzig in sod 2005](#)), za katerega je znano oscilirajoče spreminjanje ([glej poglavje 2.2](#)). V okviru tega si bomo pogledali vlogo proteinskih kaskad pri glajenju oscilirajočih signalov s kratkim odzivnim časom ([glej poglavje 4](#)). Kot drug pomemben poudarek pa bomo v nadaljevanju izpostavili še vlogo proteinskih kaskad pri ojačitvi signalov v smislu ohranjanja oblike pulznih signalov ([poglavje 5](#)). Omenjena poudarka sta proučena na podlagi matematičnega modeliranja in sta tudi ključna znanstvena prispevka tega dela,



kjer je v smislu boljšega razumevanja teh mehanizmov narejena tudi primerjava s tehničnimi sistemi v elektrotehniko. Pri tem je bil uporabljen matematičen model, kjer so posamezne proteinske kinaze linearno vezane v kaskade. Podrobneje bomo omenjen model opisali v nadaljevanju v okviru modeliranja dekodacijskih kaskadnih mehanizmov.

### **3.2 Modeliranje dekodacijskih kaskadnih mehanizmov**

V smislu matematičnega modeliranja kaskadnih mehanizmov, je bilo izdelanih precej matematičnih modelov, ki opisujejo različne fiziološke pomene proteinskih kaskad, ki smo jih omenili predhodno. Precej matematičnih modelov je bilo narejenih v okviru opisa MAPK kaskadne poti, ki poudarjajo različne pomene proteinskih kaskad. Tako sta na primer Huang in Ferrell razvila model, ki opisuje MAPK kaskadno pot kot vklopno-izklopno stikalo občutljivo na vhodni signal (Huang in Ferrell 1996), kjer je upoštevana fosforilacija več vezavnih mest znotraj posamezne kaskade. Nekateri avtorji pri tem upoštevajo tudi vpliv povratne vezave (Kholodenko 2000, Sauro in Kholodenko 2004, Wolkenhauer 2000), vpliv signalnih molekul, kot so razni rastni faktorji (Brightman in sod. 2000, Kholodenko in sod. 1999, Schoeberl in sod. 2002) in navzkrižne povezav z ostalimi kaskadami (Hatakeyama in sod. 2002, Moelling in sod. 2002). Nekateri primerjajo vezavo proteinskih kinaz v kaskade tudi z elektronskimi elementi, kot so tranzistorji, oscilatorji in razni digitalni elementi v elektronskih vezjih (glej Sauro in Kholodenko 2004).

Kot lahko vidimo, so matematični modeli bolj ali manj kompleksni. Pri tem velja omeniti, da ni želja izdelati čim bolj kompleksen model, ampak je težnja po vključevanju minimalnega števila komponent v matematični model, ki še zadostno opisuje dinamiko obravnavanega sistema oziroma eksperimentalne rezultate. V ta namen je bil izdelan enostaven matematični model linearno povezanih proteinskih kaskad, ki zadovoljivo opisuje določene pomene proteinskih kaskad, kot je ojačanje signala, hitrost prenosa signala, trajanje signala (Heinrich in sod. 2002, Nakabayashi in Sasaki 2004) in nekatere primerjave s tehničnimi sistemi (Detwiler in sod. 2000). S tem je omogočeno boljše razumevanje delovanja osnovnih mehanizmov, ki povzročajo omenjene pojave. Zato si v nadaljevanju pogledimo predpostavke, ki opravičujejo uporabo matematičnega modela linearno povezanih proteinskih kinaz v kaskado.

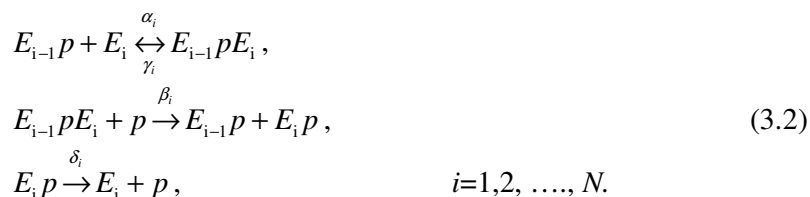
## Matematični model linearne signalne kaskade

Model sestavlja niz linearno povezanih kinaz vzdolž kaskade, kjer je znotraj posamezne stopnje omogočena fosforilacija kinaze, ki aktivira naslednjo stopnjo kaskade. Vsaka aktivirana stopnja kaskade torej vpliva na fosforilacijo naslednje kinaze in s tem aktivacijo naslednje stopnje, kar omogoča prenos signala vzdolž kaskadnega niza, dokler se ne aktivira zadnja kaskada, ki določa ustrezen odziv celice. Pri tem predpostavimo, da ima vsaka kinaza le eno fosforilacijsko mesto. Znotraj posamezne kaskadne stopnje nastopa tudi defosforilacija, ki povzroči deaktivacijo (slika 15b) in s tem prekinitvev signala vzdolž kaskade. Predpostavimo še, da so vse komponente homogeno porazdeljene znotraj celice, kar pomeni, da zanemarimo lokalno porazdelitev komponent. Upoštevajmo tudi, da je pri prenosu signala vzdolž kaskadnega niza vloga vseh proteinov enaka, pri čemer se pri procesu prenosa signala noben protein ne sintetizira na novo.

V okviru omenjenih predpostavk zapišimo matematični model (glej sliko 18a), kjer signalna molekula  $S$  reagira s kinazo  $E_1$ , pri čemer nastane kompleks  $SE_1$ . Nastanek kompleksa določa sklopitvena konstanta  $\alpha_1$ , razpad pa razklopitvena konstanta  $\gamma_1$ . Nato se kinaza  $E_1$  v kompleksu  $SE_1$  fosforilira z reakcijsko konstanto  $\beta_1$ . S tem postane kinaza aktivna  $E_1p$  in je podvržena defosforilaciji, hitrost katere določa konstanta  $\delta_1$ . Omenjene procese zapišimo v obliki reakcij, kjer lahko za prvo stopnjo kaskade zapišemo naslednje reakcije (glej sliko 18a):



Nadalje upoštevajmo, da aktivna kinaza  $E_1p$  reagira z naslednjo kinazo  $E_2$ , pri čemer se proces aktivacije ponavlja vzdolž posameznih stopenj kaskade. Tako se  $i$ -ta kinaza  $E_i$  aktivira z aktivno kinazo  $E_{i-1}p$ . Pri tem nastane kompleks  $E_{i-1}pE_i$ , nastanek katerega določa sklopitvena konstanta  $\alpha_i$ , razpad pa razklopitvena konstanta  $\gamma_i$ . Reakcijska konstanta  $\beta_i$  nato določa fosforilacijo kinaze  $E_i$  v kompleksu, konstanta  $\delta_i$  pa njeno defosforilacijo. Za  $i$ -to stopnjo kaskade lahko torej zapišemo naslednje reakcijske enačbe (glej sliko 18a):



Zapisane reakcijske enačbe (enačba 3.2) so enake za vse kaskadne stopnje ( $i=1, 2, 3, \dots, N$ , kjer je  $N$  število stopenj znotraj kaskade), pri čemer je  $E_0p=S$  (glej enačbo 3.1). Reakcijske enačbe (enačba 3.2) torej opisujejo prenos signala vzdolž posameznih stopenj signalne kaskade, vse do aktivacije prve stopnje s signalno molekulo  $S$ , pa do aktivacije zadnje  $N$ -te stopnje, ki določa ustrezen odziv celice.

Za proučevanje dinamike omenjenega sistema zapišimo reakcijske enačbe (enačba 3.2) v časovnem prostoru v obliki diferencialnih enačb, pri čemer za poenostavitev zapisa uporabimo naslednje oznake spremenljivk:  $\tilde{z}_i = E_i$ ,  $y_i = E_{i-1}pE_i$ ,  $z_i = E_i p$  in  $z_0=S$ . Diferencialne enačbe lahko torej zapišemo kot:

$$\begin{aligned} \frac{d\tilde{z}_i}{dt} &= -\alpha_i z_{i-1} \tilde{z}_i + \delta_i z_i + \gamma_i y_i, \\ \frac{dy_i}{dt} &= \alpha_i z_{i-1} \tilde{z}_i - \beta_i y_i p - \gamma_i y_i, \\ \frac{dz_i}{dt} &= \beta_i y_i p - \delta_i z_i - \alpha_{i+1} z_i \tilde{z}_{i+1} + \beta_{i+1} y_{i+1} p + \gamma_{i+1} y_{i+1}, \quad i=1,2, \dots, N. \end{aligned} \quad (3.3)$$

Nadalje upoštevajmo še, da je koncentracija fosfata  $p$  precej večja od koncentracije kinaz in njihovih kompleksov. Ob upoštevanju te predpostavke, lahko razberemo iz enačbe 3.3, da je koncentracija kompleksa  $y_i$  zelo mala in s tem njena časovna sprememba zanemarljiva ( $dy_i/dt \approx 0$ ). Če predpostavimo še, da so reakcijske konstante  $\alpha_i$ ,  $\beta_i$ ,  $\gamma_i$  in  $\delta_i$  enake v posameznih stopnjah kaskade, lahko zapišemo naslednji diferencialni enačbi:

$$\frac{d\tilde{z}_i}{dt} = -k_{\text{on},i} z_{i-1} \tilde{z}_i + k_{\text{off},i} z_i, \quad (3.4a)$$

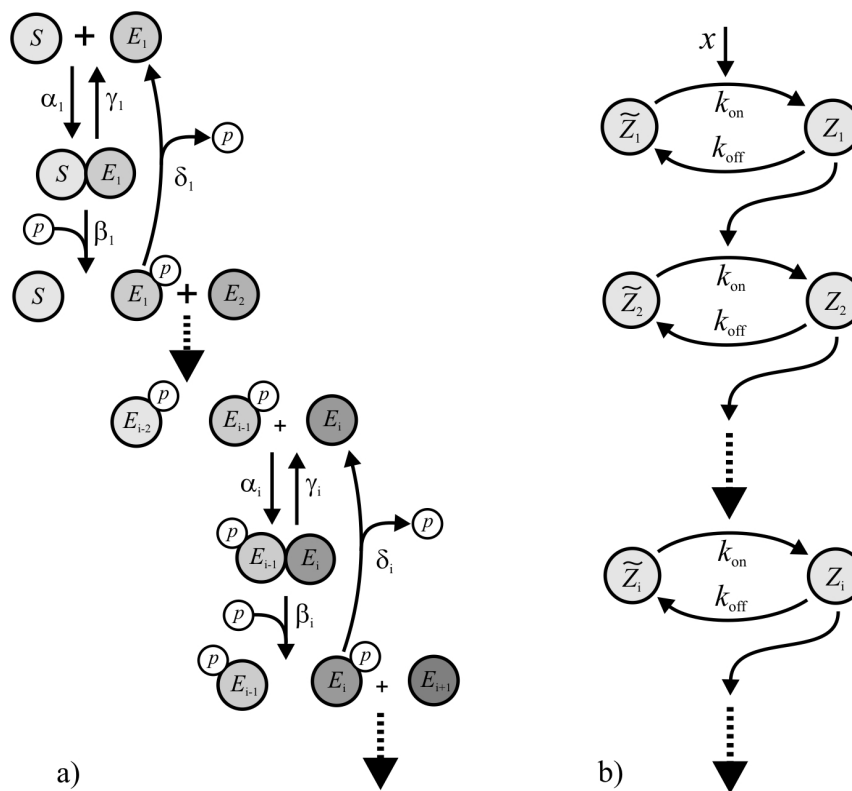
$$\frac{dz_i}{dt} = k_{\text{on},i} z_{i-1} \tilde{z}_i - k_{\text{off},i} z_i, \quad i=1,2, \dots, N, \quad (3.4b)$$

kjer je konstanta  $k_{\text{on},i} = \alpha_i \beta_i p / (\gamma_i + \beta_i p)$  in konstanta  $k_{\text{off},i} = \delta_i$ . Zapisan niz diferencialnih enačb (enačba 3.4) lahko prikažemo tudi v obliki sheme, ki prikazuje linearno signalno kaskado (glej sliko 18b). Na shemi so prikazani vplivi na aktivacijo in deaktivacijo posamezne kaskadne stopnje, ki sodeluje pri prenosu signala vzdolž kaskade. Signal oziroma signalna molekula  $S$ , ki sproži aktivacijo prve stopnje, je označena z  $x$  in lahko predstavlja poljuben časovno se spreminjajoč signal, kot je na primer oscilirajoče spreminjanje prostih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v citoplazmi (glej poglavje 2.2).

S tem, ko smo predhodno predpostavili, da je koncentracija kompleksa  $y_i \approx 0$ , velja tudi, da je začetna prosta koncentracija proteinov posamezne stopnje kaskade enaka:  $z_{\text{tot},i} = \tilde{z}_i + z_i$ . Aktivacijo posamezne kaskadne stopnje lahko na podlagi tega zapišemo v obliki diferencialne enačbe kot:

$$\frac{dz_i}{dt} = k_{\text{on},i} z_{i-1} (z_{\text{tot},i} - z_i) - k_{\text{off},i} z_i, \quad i=1,2, \dots, N, \quad (3.5)$$

kjer je  $z_0=x$ .



**Slika 18:** Matematični model linearno povezanih kaskad. **(a)** Prikaz posameznih procesov pri aktivaciji kinaze, ki s svojo aktivnostjo vpliva na aktivacijo naslednjih kinaz vzdolž posameznih kaskad. **(b)** Poenostavljen matematičen model linearno povezanih kaskad.

Zapisan matematičen model za linearno kaskado (enačba 3.5) je bil pri proučevanju fizioloških pomenov proteinskih kaskad do sedaj že večkrat uporabljen. Tako je na primer s tem modelom bila pokazana vloga proteinskih kaskad pri ojačitvi signala, trajanju signala in iskanju optimalne dolžine kaskade pri hitrosti razširjenja signala (Heinrich in sod 2002, Chaves in sod. 2004, Nakabayashi in Sasaki 2005). Omenjen model je bil uporabljen tudi pri dekodiranju časovno omejenih signalov (Marhl in sod. 2005b) in pri obravnavi bioloških sistemov z vidika obravnave tehničnih sistemov (Detwiler in sod. 2000, Sauro in Kholodenko 2004). Ker je model linearne kaskade preprost, hkrati pa zadovoljivo opisuje fiziološke pomen proteinskih kaskad, omogoča boljše razumevanje delovanja osnovnih mehanizmov, ki so odgovorni za omenjene fiziološke pojave. V ta namen bomo tudi mi uporabili ta matematičen model (enačba 3.5) pri proučevanju vloge proteinskih kaskad na glajenje oscilirajočih signalov (poglavje 4) in ohranjanje oblike ojačanega signala (poglavje 5).

## 4 GLAJENJE SIGNALOV S KRATKIM ODZIVNIM ČASOM

Kot prvi izvorni znanstveni prispevek v tem delu, želimo proučiti vlogo proteinskih kaskad pri glajenju signalov s kratkim odzivnim časom. Proučujemo vlogo mitogensko aktiviranih protein kinaznih kaskad (MAPK), katerih aktivacija je lahko pogojena s koncentracijo prostih kalcijevih ionov  $\text{Ca}^{2+}$  v znotrajceličnem prostoru (glej sliko 17). Prenos signala preko MAPK kaskade lahko namreč povzroči tudi povečana koncentracija prostih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov (Kamp in Hell 2000, Walker in sod. 2003, Kupzig in sod 2005), za katere je znano oscilirajoče spreminjanje (glej poglavje 2.2). Pri glajenju teh pulzno oscilirajočih signalov želimo zagotoviti hitre vklopno-izklopne karakteristike proteinske aktivacije glede na časovno omejene  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacije.

Kot smo omenili že v prejšnjem poglavju, je bilo pokazano, da proteinske kaskade delujejo kot nizkoprepustni filtri (Chaim in sod. 2005, Hersen in sod. 2008), ki vplivajo na spremembo oblike signala. Pokazano je tudi bilo, da število kaskad vpliva na trajanje signala in s tem na njegovo obliko (Heinrich in sod. 2002). V smislu pasovno prepustnih filtrov je bilo pokazano, da proteinske kaskade omogočajo selektivno regulacijo celičnih procesov za časovno omejene signale (Marhl in sod. 2005a, Marhl in sod. 2005b). Niso pa še bili prikazani mehanizmi, ki bi pri glajenju pulzno oscilirajočih celičnih signalov omogočali hitre vklopno-izklopne karakteristike proteinske aktivacije glede na časovno omejene oscilirajoče signale, kar želimo podrobneje predstaviti v nadaljevanju.

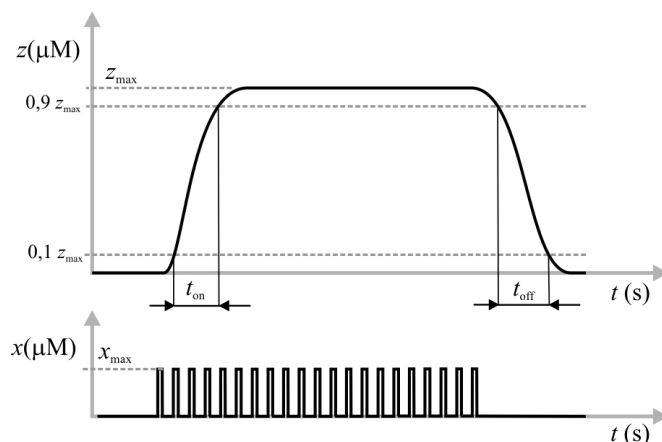
Osredotočili se bomo na pomen kratkih odzivnih časov v procesu glajenja signalov, predstavili matematični model glajenja celičnih signalov, ter na podlagi primerjav med glajenjem oscilirajočih signalov z eno kaskadno stopnjo in z večstopenskimi proteinskimi kaskadami, iskali prednosti kaskadnih mehanizmov proteinske aktivacije. Ker se s kaskadnimi mehanizmi pri glajenju signalov srečujemo tudi v tehničnih sistemih, bomo prikazali tudi analogijo med aktivnimi večstopenskimi nizkoprepustnimi filtri v elektrotehniko in proteinskimi kaskadami v bioloških sistemih. Vloga večstopenskih nizkoprepustnih filtrov je namreč v elektrotehniko dobro znana, saj z njimi lahko gladimo motnje, ki se pojavijo pri detektiranju raznih vrednosti parametrov oziroma generiranju in prenosu signalov. V časovnem prostoru pa jih lahko obravnavamo tudi kot integratorje, ki jih uporabljamo za detekcijo pulznih oziroma frekvenčno kodiranih signalov.

## 4.1 Pomen kratkih odzivnih časov v procesu glajenja signalov

Pri glajenju celičnih signalov gre za doseganje konstantne aktivacije proteinov, katerih aktivacija je pogojena z pulzno oscilirajočimi  $\text{Ca}^{2+}$  signali. Kot smo že omenili, je namreč znano, da lahko aktivacijo posameznih proteinov povzroči tudi povečana koncentracija kalcija (Kamp in Hell 2000, Walker in sod. 2003, Kupzig in sod 2005), za katerega je znano oscilirajoče spreminjanje. Za zagotavljanje konstantne aktivacije proteinov je torej z vidika signalizacije potrebno signal zgladiti, kar v biološkem smislu predstavlja konstantno koncentracijo aktiviranih proteinov, ki so odgovorni za aktivacijo določenih procesov znotraj celice.

Pri procesu glajenja signalov želimo, poleg konstantne aktivacije proteinov, ohraniti tudi hitre vklopno-izklopne karakteristike, ki jih je razvila narava pri posameznih kaskadnih ciklih proteinske aktivacije. To poznamo kot ultrasenzitivnost (glej poglavje 3), kar daje proteinskim kaskadam vlogo učinkovitih kemijskih stikal, občutljivih na spremembe vhodnih signalov (Stadtman in Chock 1977, Goldbeter in Koshland 1981, Goldbeter in Koshland 1984, Koshland in sod. 1982, Huang in Ferrell 1996, Ferrell 1996, Bagowski in Ferrell 2001, Bagovski in sod. 2003). Primer takšne aktivacije je prikazan na sliki 19, kjer v smislu hitre vklopno-izklopne karakteristike strmimo k čim manjšim časovnim odzivom aktivacije ( $t_{\text{on}}$ ) oziroma deaktivacije ( $t_{\text{off}}$ ) proteinov.

Glajenje oscilirajočih pulznih signalov lahko razumemo tudi kot dekodacijo signalov, kjer frekvenčno kodirane kalcijeve oscilacije (glej poglavje 2.2) pretvorimo v amplitudni odziv, ki se odraža v spremembi koncentracije aktiviranih proteinov. V smislu sledenja spremembam frekvence tudi v tem primeru težimo k čim krajšim časovnim odzivom.



**Slika 19:** Prikaz koncentracije aktiviranih proteinov ( $z$ ) pod vplivom oscilirajočega stimula  $x$  (koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  ionov). Aktivacijska časa  $t_{\text{on}}$  in  $t_{\text{off}}$  sta definirana kot časa, ki sta potrebna, da se koncentracija aktiviranih proteinov spreminja med 10% na 90% maksimalne vrednosti.

Z hitrimi vklopno-izklopnimi karakteristikami se običajno srečujemo tudi pri tehničnih sistemih. Tako v elektroniki poznamo tranzistor, katerega karakteristika je presenetljivo podobna ultrasenzitivnemu odzivu kaskadnega cikla proteinske aktivacije (glej sliko 4). Tudi pri tranzistorju težimo k čim manjšim preklopnim časom, kjer v času vzpona  $t_{on}$  (rise time) kolektorski tok naraste iz 10% na 90% končne vrednosti, v času upadanja (fall time) pa nazaj na 10% (Lorencon 1996). Hitre odzive oziroma preklope želimo tudi pri analogno-digitalnih oziroma digitalno-analognih pretvornikih, pri digitalnih logičnih enotah (slika 5 in 6) in seveda pri detekciji vseh hitro spreminjajočih se količin. V smislu glajenja oziroma integracije signalov, se s hitrimi odzivi srečujemo tudi pri merilnikih, ki zaznavajo pulzne signale, kot je na primer merilnik vrtljajev. Enako velja pri prenosu signalov, v smislu pretvorbe frekvenčno kodiranih signalov v amplitudni odziv. Ravno v tem pa velja iskati analogije med električnimi in biološkimi sistemi, saj tudi proteinske kaskade, na osnovi integracije pulzno oscilirajočih signalov, delujejo kot dekodacijski mehanizem frekvenčno kodiranih celičnih signalov (glej poglavje 3). Koko zagotoviti pri tem kratke odzivne čase, si bomo podrobneje pogledali v nadaljevanju.

## **4.2 Matematični model glajenja celičnih signalov**

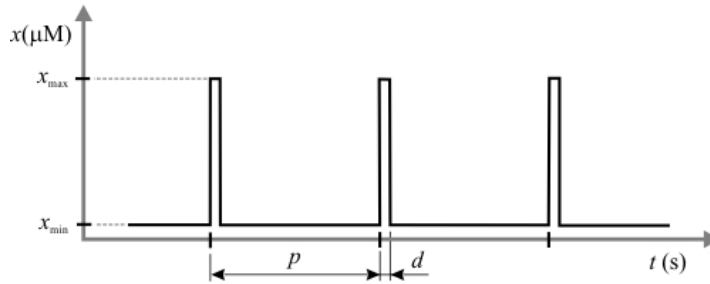
Pri proučevanju vloge proteinskih kaskad na glajenje oscilirajočih signalov, bomo uporabili že omenjeni model linearno povezanih proteinskih kaskad (slika 18b). Kot je bilo omenjeno že v poglavju 3.2, je bil model linearno povezanih proteinskih kaskad (enačba 3.5), pri proučevanju fizioloških pomenov proteinskih kaskad, do sedaj že večkrat uporabljen. Model je namreč preprost, hkrati pa zadovoljivo opisuje fiziološke pomene proteinskih kaskad pri ojačitvi signalov, trajanju in razširjanju signalov (Heinrich in sod 2002, Chaves in sod. 2004, Nakabayashi in Sasaki 2005), selektivni dekodaciji (Marhl in sod. 2005b) in ne nazadnje pri glajenju signalov (Marhl in Grubelnik 2007), kar bomo podrobneje predstavili v nadaljevanju.

Za analizo pretvorbe oscilirajočih kalcijevih oscilacij v stacionarne, stikalu podobne vklopno izklopne aktivacije, bomo simulirali kalcijeve oscilacije (glej poglavje 2) z umetnimi pravokotno oblikovanimi pulzi. Generiranje pravokotnih pulzov za proučevanje oscilatornih sprememb je bilo do danes že večkrat uporabljeno pri raznih eksperimentalnih študijah (De Koninck in Schulman 1998, Hersen 2008) in matematičnih simulacijah (Li in Goldbeter 1992, Dupont in sod. 2003, Salazar in sod 2004, Schuster in sod 2005, Salazar in sod. 2008). Seveda pa so se uporabljali tudi drugi umetno generirani ponavljajoči se vzorci, kot je na primer sinusni signal (Gall in sod 2000, Chiam 2005).

V našem primeru generiramo serijo  $\text{Ca}^{2+}$  pulznih oscilacij (glej sliko 4, 6, 8a) z naslednjimi periodičnimi pravokotnimi signali (slika 20):

$$x(t) = \begin{cases} x_{\max}, & \text{if } ((t \bmod p) \geq (p-d) \wedge (t < Mp)), \\ x_{\min}, & \text{else,} \end{cases} \quad (4.1)$$

kjer je  $x_{\min}$  minimalna in  $x_{\max}$  maksimalna vrednost koncentracije pri oscilatornem spreminjanju koncentracije prostih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov. V vseh nadaljnjih preračunih vzamemo za minimalno vrednost koncentracije  $x_{\min}=0 \mu\text{M}$ , za maksimalno vrednost pa  $x_{\max}=1 \mu\text{M}$ . V zgornji enačbi (4.1) predstavlja še  $p$  periodo oscilacij,  $d$  širino pulznega signala in  $M$  celotno število generiranih pulzov. Pri vseh nadaljnjih preračunih smo uporabili enako razmerje med periodo  $p=100$  s in širino pulza  $d=1$  s, medtem ko se število pulzov  $M$  spreminja in je podano ob slikah, ki prikazujejo rezultate posameznih preračunov.



**Slika 20:** Serija pravokotno generiranih  $\text{Ca}^{2+}$  pulznih oscilacij.  $x_{\max}$  in  $x_{\min}$  predstavljata maksimalno in minimalno vrednost koncentracije prostih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov ( $x$ ). Periodo med pulzi označuje  $p$ , trajanje pulza pa  $d$ .

Oscilatorni kalcijevi signali  $x(t)$  (slika 20) aktivirajo proteine v protein kinazni kaskadi, ki smo jo podrobneje opisali v poglavju 3.2. Pri tem upoštevamo, da se kalcij veže na proteine v prvi stopnji kaskade, aktivirani proteini prve kaskadne stopnje pa nadalje aktivirajo proteine druge kaskadne stopnje in tako naprej se aktivirajo proteini vzdolž celotne kaskade (glej sliko 18b).

Koncentracijo aktiviranih proteinov na  $i$ -ti stopnji kaskade ( $z_i$ ) lahko torej zapišemo z enačbo 3.5, v primeru kooperativne vezave kalcija na proteine prve stopnje in poenotenja konstant med posameznimi stopnjami pa z enačbama:

$$\frac{dz_1}{dt} = k_{\text{on}} x^n (z_{\text{tot}} - z_1) - k_{\text{off}} z_1, \quad (4.2a)$$

$$\frac{dz_i}{dt} = k_{\text{on}} z_{i-1} (z_{\text{tot}} - z_i) - k_{\text{off}} z_i, \quad i=2, \dots, N, \quad (4.2b)$$

kjer enačba 4.2a predstavlja aktivacijo proteinov prve stopnje, pri čemer je  $x$  koncentracija prostih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov in  $n$  število  $\text{Ca}^{2+}$  ionov, ki se kooperativno vežejo na proteine prve stopnje. Aktivacijo nadaljnjih stopenj kaskade opisuje enačba 4.2b, kjer je



$N$  število vseh stopenj vzdolž kaskade. V obeh enačbah  $k_{on}$  in  $k_{off}$  predstavljata vklopno oziroma izklopno konstanto aktivacije posamezne stopnje (glej enačbo 3.4).

Zaradi enostavnosti in iskanja osnovnih mehanizmov, ki zagotavljajo glajenje s kratkim odzivnim časom, uporabimo pri vseh nadaljnjih izračunih  $n=1$  in enake vrednosti konstant  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  in  $z_{tot}$  v vseh stopnjah kaskade, kar smo sicer že upoštevali pri samem zapisu diferencialnih enačb 4.2. Pri vseh izračunih v tem poglavju vzamemo za vrednost  $z_{tot}=10 \mu\text{M}$ , vrednosti konstant  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  pa bodo podane v nadaljevanju ob posameznih preračunih. Uporaba enakih konstant posameznih stopenj je upravičena tudi z vidika fiziološkega pomena. Pokazano je namreč bilo, da kaskada, ki ima enake vklopne konstante  $k_{on}$  na vseh stopnjah, najučinkoviteje generira ostre signale. Kaskada, ki ima enake izklopne konstante  $k_{off}$ , pa dosega največja ojačanja in najkrajše odzive (Chaves in sod. 2004).

### 4.3 Rezultati

Na začetku si pogledimo preprost primer enega fosforilacijsko-defosforilacijskega cikla oziroma ene kaskadne stopnje proteinske aktivacije ( $N=1$ ), kjer se bomo kot prvo osredotočili le na glajenje oscilirajočih signalov, nadalje pa bomo proučili še vplive na odzivni čas aktivacije in deaktivacije ene kaskadne stopnje. Proučiti želimo pogoje, ki bi omogočali glajenje oscilirajočih signalov s kratkimi odzivnimi časi. V ta namen bomo v nadaljevanju proučili tudi vlogo večstopenjskih proteinskih kaskad. V vseh preračunih uporabljamo za oscilirajoče signale periodične pravokotne signale, ki ponazarjajo serijo  $\text{Ca}^{2+}$  pulznih oscilacij (slika 20 in enačba 4.1).

#### Glajenje oscilirajočih signalov z eno kaskadno stopnjo proteinske aktivacije

Oglejmo si, kako se spreminja oblika izhodnega signala prve kaskadne stopnje  $z_1(t)$  (glej enačbo 4.2a), glede na pravokotne pulzne oscilacije  $x(t)$  (enačba 4.1), za različne vrednosti vklopne in izklopne konstante ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ) prve kaskadne stopnje. Kot prvo nas zanimajo le vrednosti vklopne in izklopne konstante, ki omogočajo glajenje pulzno oscilirajočih signalov  $x(t)$ , s čimer bi bila zagotovljena približno konstantna proteinska aktivacija.

Vklopno-izklopna karakteristika prve kaskadne stopnje  $z_1(t)$  je za različne vrednosti vklopne konstante  $k_{on}$  prikazana na sliki 21. Iz slike je razvidno, da pri dani vrednosti  $k_{off}$ , ki je v tem primeru  $k_{off}=0,1 \text{ s}^{-1}$ , z zmanjševanjem vrednosti  $k_{on}$  zmanjšujemo maksimalno koncentracijo aktiviranih proteinov  $z_1$ . Večje vrednosti ( $k_{on}=10 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) sicer omogočajo večje koncentracije aktiviranih proteinov, vendar

konstanta  $k_{\text{on}}$  pri tem ne vpliva na padanje koncentracije aktiviranih proteinov  $z_1$ , ko koncentracija kalcija  $x(t)$  pade na nič. S spreminjanjem vklopne konstante  $k_{\text{on}}$  v eni kaskadni stopnji lahko torej reguliramo maksimalno aktivacijo proteinov, ne moremo pa zagotoviti konstante koncentracije aktiviranih proteinov  $z_1(t)$  pod vplivom periodičnih pulznih oscilacij  $x(t)$ .

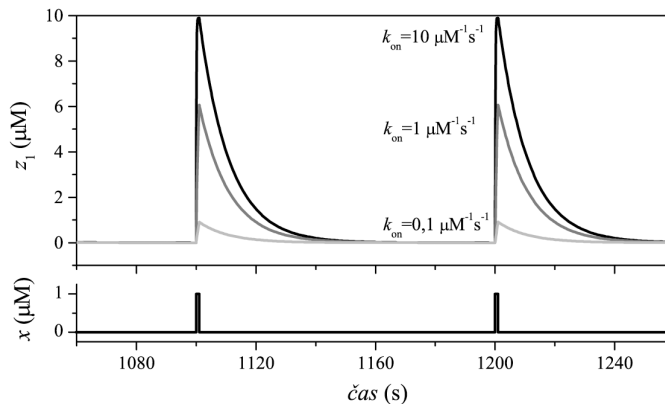
V nadaljevanju si pogledjmo, kako se spreminja koncentracija aktiviranih proteinov prve kaskadne stopnje, če spreminjamo vrednosti izklopne konstante  $k_{\text{off}}$ . Na [sliki 22](#) lahko vidimo, da aktivacija proteinov postane gladkejša za manjše vrednosti  $k_{\text{off}}$ , hkrati pa se poveča povprečna koncentracija aktiviranih proteinov, kar omogoča učinkovito aktivacijo kaskadne stopnje. Majhne vrednosti  $k_{\text{off}}$  torej omogočajo glajenje oscilirajočih signalov, kar nam pokaže tudi analitična rešitev [enačbe \(4.2a\)](#) v časovnem intervalu med pulzi  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacij  $x(t)$ . Ker je v časovnem intervalu med dvema zaporednima pulzoma vrednost  $x(t)=0$ , lahko [enačbo 4.2a](#) poenostavimo in zapišemo:

$$\frac{dz_1}{dt} = -k_{\text{off}} z_1. \quad (4.3)$$

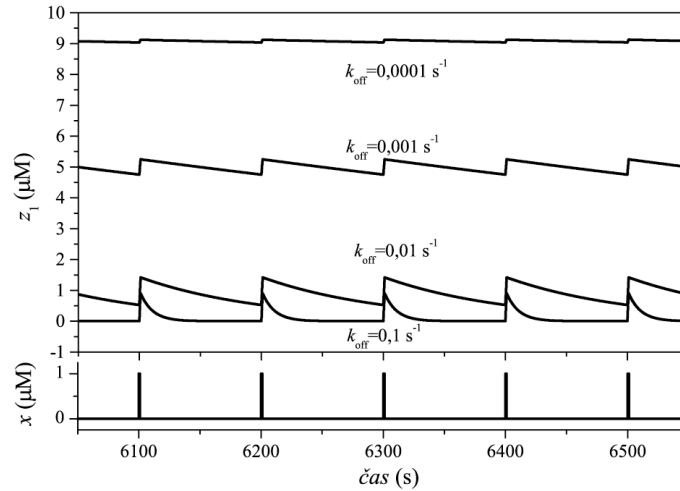
Rešitev zapisane [enačbe \(4.3\)](#) lahko nadalje zapišemo kot:

$$z_1(t) = z_{1,0} e^{-k_{\text{off}} t}, \quad (4.4)$$

kjer je  $z_{1,0}$  vrednost  $z_1(0)$ , torej na začetku med dvema pulzoma, kjer predpostavimo, da je  $t=0$ . Iz [enačbe 4.4](#) lahko vidimo, da je učinek glajenja direktno odvisen od deaktivacijske konstante  $k_{\text{off}}$ , saj ta konstanta vpliva na padanje koncentracije  $z_1(t)$  med dvema pulzoma, medtem ko konstanta  $k_{\text{on}}$  pri tem ne igra nobene vloge, kar je bilo razvidno že s [slike 21](#). S tem, ko konstanta  $k_{\text{off}}$  vpliva na potek padanja koncentracije  $z_1(t)$  med dvema pulzoma, vpliva tudi na velikost povprečne koncentracije aktiviranih proteinov  $\langle z_1 \rangle$  oziroma na ojačitev signala, ki je precej odvisna tudi od aktivacijske konstante  $k_{\text{on}}$  ([glej sliko 21 in 22](#)).



**Slika 21:** Oblika izhodnega signala  $z_1(t)$  ([glej enačbo 4.2a](#)) glede na pravokotne pulzne oscilacije  $x(t)$  za tri različne vrednosti  $k_{\text{on}}$ . Črna črta ponazarja krivuljo  $z_1(t)$  za vrednost  $k_{\text{on}}=10 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , temno siva za vrednost  $k_{\text{on}}=1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  in svetlo siva za vrednost  $k_{\text{on}}=0,1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Ostale vrednosti parametrov so:  $k_{\text{off}}=0,1 \text{ s}^{-1}$ ,  $N=1$ ,  $M \rightarrow \infty$ .



**Slika 22:** Oblika izhodnega signala  $z_1(t)$  glede na pravokotne pulzne oscilacije  $x(t)$  za štiri različne vrednosti  $k_{\text{off}}$ . Manjše vrednosti  $k_{\text{off}}$  omogočajo bolj gladek signal. Ostale vrednosti parametrov so:  $k_{\text{on}}=0,1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $N=1$ ,  $M\rightarrow\infty$ .

Da bi natančneje definirali učinek glajenja oscilirajočih  $\text{Ca}^{2+}$  signalov z aktivacijo proteinov, nadalje definirajmo enačbo, ki bo opisovala »gladkost« proteinske aktivacije. Enačbo zapišemo kot razmerje:

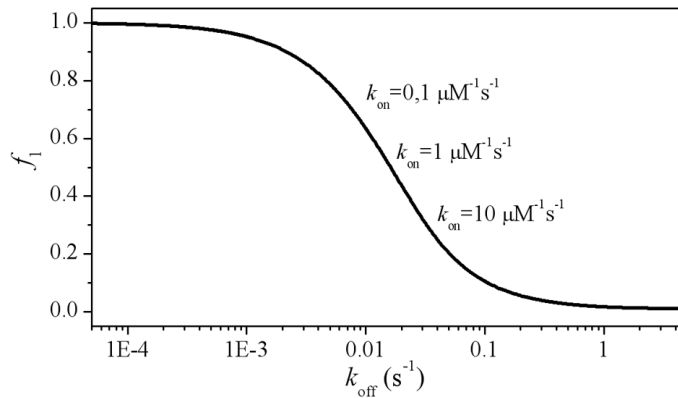
$$f_i = \frac{\langle z_i \rangle}{z_{i,\text{max}}}, \quad (4.5)$$

kjer je  $z_{i,\text{max}}$  maksimalna vrednost koncentracije aktiviranih proteinov  $z_i$  in  $\langle z_i \rangle$  povprečna vrednost koncentracije  $z_i$ , ki jo izračunamo kot:

$$\langle z_i \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T z_i dt, \quad (4.6)$$

kjer je  $T$  dovolj velik večkratnik periode oziroma čas povprečenja. Iz enačbe 4.5 je razvidno, da se vrednost  $f_i$  približuje vrednosti 1 ( $f_i \rightarrow 1$ ), ko se povprečna vrednost  $\langle z_i \rangle$  približuje maksimalni vrednosti  $z_{i,\text{max}}$ .

Poglejmo si v nadaljevanju, kako se spreminja gladkost proteinske aktivacije ene kaskadne stopnje ( $f_1$ ,  $i=1$ ) v odvisnosti od spreminjanja aktivacijske  $k_{\text{on}}$  in deaktivacijske konstante  $k_{\text{off}}$ . Na sliki 23 je prikazana vrednost  $f_1$  (enačba 4.5) v odvisnosti od deaktivacijske konstante  $k_{\text{off}}$  za tri različne vrednosti  $k_{\text{on}}$  ( $k_{\text{on}}=0,1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{\text{on}}=1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  in  $k_{\text{on}}=10 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , glej sliko 21). S slike 23 je razvidno, da se krivulje  $f_1$  za različne vrednosti  $k_{\text{on}}$  popolnoma prilegajo, kar pomeni, da je gladkost signalov prikazanih na sliki 21 enaka. S slike 23 je razvidno tudi, da se vrednost  $f_1$  približuje 1, ko gre  $k_{\text{off}}$  proti nič. To pomeni, da je izhodni signal  $z_1$  gladkejši pri manjših vrednostih  $k_{\text{off}}$ , kar smo lahko razbrali tudi že s slike 22.



**Slika 23:** Gladkost  $f_1$  v odvisnosti od deaktivacijske konstante  $k_{\text{off}}$ , za tri različne vrednosti aktivacijske konstante:  $k_{\text{on}}=0,1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{\text{on}}=1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  in  $k_{\text{on}}=10 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Krivulje se popolnoma prekrivajo. Ostale vrednosti parametrov so:  $N=1$ ,  $M \rightarrow \infty$ .

Zaključimo torej lahko (glej sliko 22 in 23), da že ena kaskadna stopnja proteinske aktivacije omogoča glajenje pulzno oscilirajočih  $\text{Ca}^{2+}$  signalov. To omogočajo majhne vrednosti konstante  $k_{\text{off}}$ , medtem ko aktivacijska konstanta  $k_{\text{on}}$ , pri dani vrednosti  $k_{\text{off}}$ , ne vpliva na gladkost proteinske aktivacije  $f_1$ .

V nadaljevanju si poleg gladkosti izhodnega signala  $z_1$  pogledjmo še, kako konstanti  $k_{\text{off}}$  in  $k_{\text{on}}$  vplivata na odzivni čas proteinske aktivacije in deaktivacije.

## Odzivni čas proteinske aktivacije in deaktivacije ene kaskadne stopnje

Rezultati prikazani na sliki 23 kažejo, da je omogočeno glajenje pulzno oscilirajočih  $\text{Ca}^{2+}$  signalov pri majhnih vrednosti konstante  $k_{\text{off}}$ . Manjše kot so vrednosti konstante  $k_{\text{off}}$ , gladkejši je izhodni signal, kar je direktna posledica počasne proteinske deaktivacije (glej enačbo 4.4) v času med posameznimi pulznimi signali. Počasna proteinska deaktivacija pa povzroča tudi nekaj problemov, kadar želimo hitre vklopno-izklopne odzivne čase proteinske aktivacije, kar bomo podrobneje predstavili v nadaljevanju.

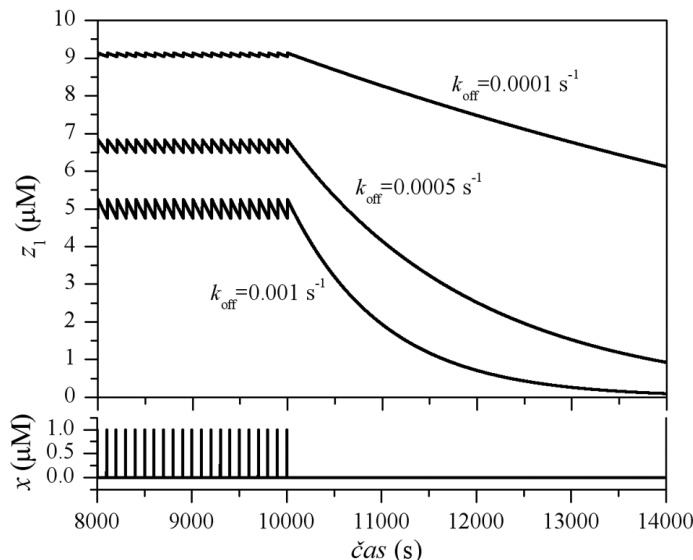
Kot prvo izpostavimo problem hitrega zmanjšanja koncentracije aktiviranih proteinov  $z_1$  pri izklopu pulzno oscilirajočega kalcija  $x(t)$ . Počasna proteinska deaktivacija, ki je posledica majhnih vrednostih  $k_{\text{off}}$ , namreč preprečuje hitro oziroma ostro zmanjšanje koncentracije aktiviranih proteinov, pri izklopu vhodnega signala.

Na sliki 24 je za tri različne vrednosti deaktivacijske konstante  $k_{\text{off}}$  prikazan časovni potek padanja koncentracije aktiviranih proteinov  $z_1$  po izklopu pulzno

oscilirajočega stimula  $x(t)$ . Iz slike je razvidno, da se z zmanjševanjem vrednosti konstante  $k_{\text{off}}$  koncentracija aktiviranih proteinov zmanjšuje precej počasneje. To lahko razložimo z uporabo [enačbe 4.4](#), ki jo v tem primeru zapišemo kot:

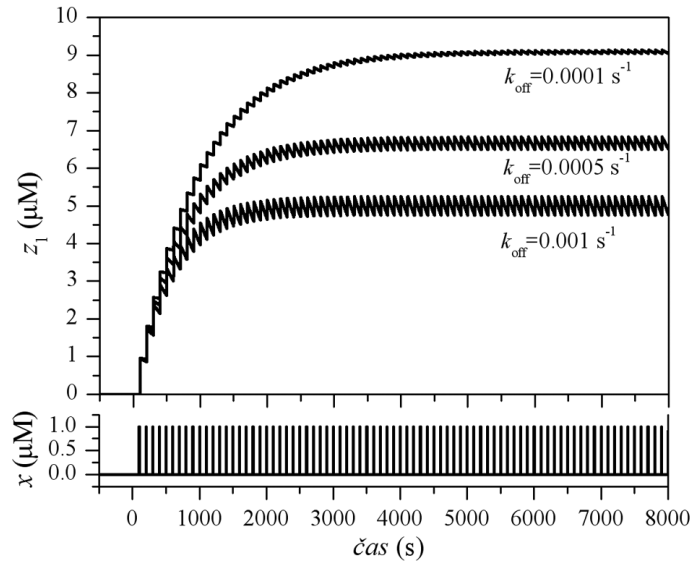
$$z_1(t) = z_{1,\text{max}} e^{-k_{\text{off}} t}, \quad (4.7)$$

kjer je  $z_{1,\text{max}}$  maksimalna koncentracija aktiviranih proteinov. Iz enačbe je razvidno, da pri manjših vrednostih konstante  $k_{\text{off}}$  potrebujemo daljši čas  $t$ , da se koncentracija aktiviranih proteinov zmanjša iz  $z_{1,\text{max}}$  nazaj na začetno osnovno vrednost.



**Slika 24:** Časovni potek padanja koncentracije aktiviranih proteinov  $z_1$  po izklopu pulzno oscilirajočega kalcija  $x(t)$  za tri različne vrednosti konstante  $k_{\text{off}}$ . Ostale vrednosti parametrov so:  $k_{\text{on}}=0,1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $N=1$ ,  $M=100$ .

Kot drug problem, ki se pojavi pri majhnih vrednostih  $k_{\text{off}}$ , pa je čas, ki je potreben, da dosežemo maksimalno proteinsko aktivacijo  $z_{1,\text{max}}$ . S [slike 25](#) je razvidno, da je ta problem povezan z visokimi vrednostmi koncentracije aktiviranih proteinov  $z_{1,\text{max}}$  oziroma visoke povprečne koncentracije  $\langle z_1 \rangle$  ([enačba 4.6](#)), pri majhnih vrednostih konstante  $k_{\text{off}}$ . S slike lahko razberemo, da je pri majhnih vrednostih  $k_{\text{off}}$  potreben daljši odzivni časa, da dosežemo maksimalno koncentracijo aktiviranih proteinov. Zanimivo je, da se ta problem pojavi kljub temu, da je aktivacija proteinov pri majhnih vrednostih  $k_{\text{off}}$  v resnici hitrejša, o čemer priča hitrejša naraščanje koncentracije aktiviranih proteinov  $z_1(t)$  ob vklopu pulzno oscilirajočega vhodnega signala  $x(t)$  ([glej sliko 25](#)).



**Slika 25:** Časovni potek naraščanja koncentracije aktiviranih proteinov ob vklopu pulzno oscilirajočega kalcija  $x(t)$  za tri različne vrednosti konstante  $k_{\text{off}}$ .  $k_{\text{on}}=0,1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $N=1$ ,  $M \rightarrow \infty$ .

Rezultate prikazane na [sliki 24 in 25](#) lahko prikažemo tudi bolj sistematično oziroma kvantitativno. Kot mero za vklopno-izklopno karakteristiko aktivacije proteinov  $z_i$  definirajmo časa  $t_{\text{on},i}$  in  $t_{\text{off},i}$ , kjer je  $t_{\text{on},i}$  čas v katerem koncentracija aktiviranih proteinov  $z_i$  naraste iz 10% na 90% maksimalne koncentracije  $z_{i,\text{max}}$ , medtem ko je  $t_{\text{off},i}$  čas v katerem koncentracija  $z_i$  pade iz 90% nazaj na 10% maksimalne koncentracije. S prikazom časov  $t_{\text{on},1}$  in  $t_{\text{off},1}$  v odvisnosti od konstante  $k_{\text{off}}$  ([glej sliko 5, dodatek A](#)), lahko vidimo kako z zmanjševanjem konstante  $k_{\text{off}}$  naraščata oba časa. Pri tem velja poudariti, da krivulja na [sliki 5a](#) ([glej dodatek A](#)) ni zvezna, ker je naraščanje koncentracije aktiviranih proteinov  $z_1$  pod vplivom pulzno oscilirajočega signala  $x$  stopničasto ([glej sliko 25](#)). S [slike 5](#) ([dodatek A](#)) lahko torej razberemo, da potrebujemo za ostro stopničasto aktivacijo in deaktivacijo proteinov, ob vklopu oziroma izklopu pulzno oscilirajočega kalcija  $x(t)$ , velike vrednosti konstante  $k_{\text{off}}$ , kar je pogojeno z malim časom  $t_{\text{on},1}$  in  $t_{\text{off},1}$ .

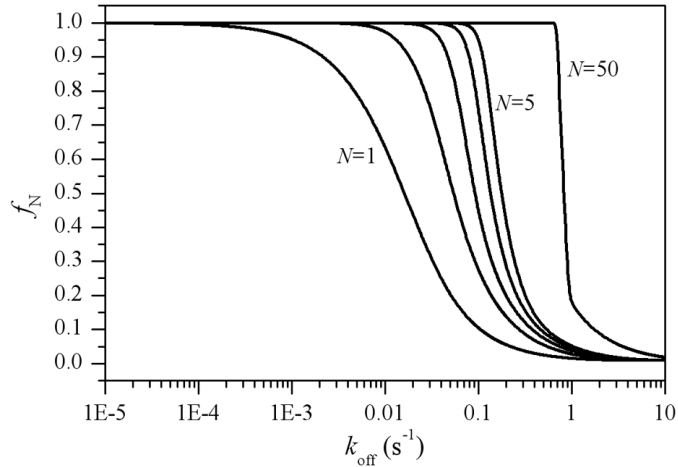
S primerjavo rezultatov na [sliki 23](#), ki prikazuje gladkost proteinske aktivacije, z rezultati na [slikah 24 in 25](#), ki prikazujeta časovni potek aktivacije oziroma deaktivacije proteinov ([glej tudi  \$t\_{\text{on},1}\$  in  \$t\_{\text{off},1}\$ , \[slika 5; dodatek A\]\(#\)\), lahko vidimo, da je nemogoče doseči gladko stopničasto proteinsko aktivacijo, kot odziv na pulzno oscilirajoče kalcijeve oscilacije  \$x\(t\)\$ . Da dosežemo gladko proteinsko aktivacijo namreč potrebujemo majhne vrednosti konstante  \$k\_{\text{off}}\$  \(\[slika 23\]\(#\)\), za doseganje hitre vklopno-izklopne karakteristike proteinske aktivacije \(\[slika 24 in 25\]\(#\)\) pa potrebujemo visoke vrednosti konstante  \$k\_{\text{off}}\$ . Ta problem je v resnici nerešljiv, če upoštevamo le en fosforilacijsko-defosforilacijski cikel oziroma eno kaskadno stopnjo \( \$N=1\$ \). Zato si v nadaljevanju](#)

poglejmo, kako je ta problem mogoče rešiti z večstopenjsko linearno povezano proteinsko kaskado ( $N > 1$ ; glej sliko 18).

## Vloga večstopenjskih proteinskih kaskad pri glajenju signalov s kratkim odzivnim časom

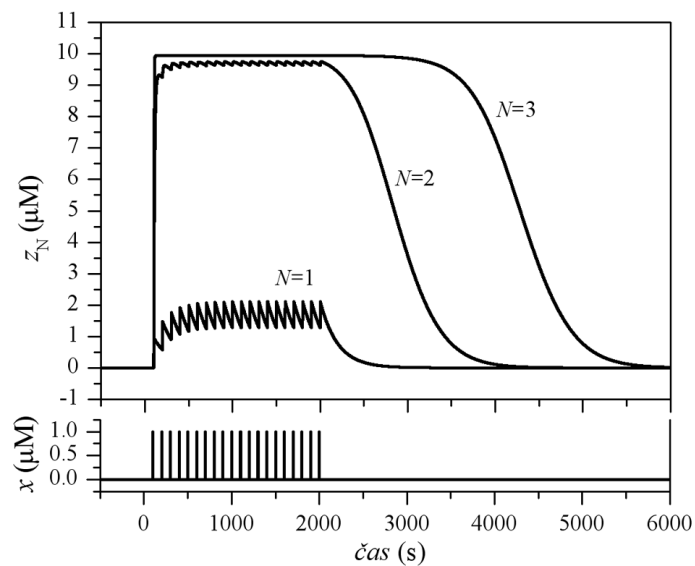
Proučiti želimo pogoje, ki bi omogočali konstantno aktivacijo proteinov pod vplivom oscilirajočih signalov, hkrati pa bi zagotavljali hitre vklopno-izklopne karakteristike proteinske aktivacije. Predhodno smo pokazali, da pri enem fosforilacijsko-defosforilacijskem ciklu to ni mogoče, zato si v nadaljevanju pogledimo vlogo večstopenjskih proteinskih kaskad (slika 18) pri glajenju signalov s kratkim odzivnim časom.

Podobno kot pri eni kaskadni stopnji, kjer smo ugotovili, da na gladkost proteinske aktivacije (enačba 3.9) vpliva deaktivacijska konstanta  $k_{\text{off}}$ , tudi sedaj analizirajmo gladkost proteinske aktivacije za posamezno kaskadno stopnjo  $N$  v odvisnosti od  $k_{\text{off}}$  (slika 26). Krivulja, ki prikazuje gladkost prve kaskadne stopnje ( $f_1$ ) na sliki 26, ustreza krivulji gladkosti na sliki 23. S slike 26 lahko razberemo tudi, da z večanjem števila kaskadnih stopenj  $N$ , postaja proteinska aktivacija gladkejša v večjem območju  $k_{\text{off}}$ , torej v primerjavi z eno kaskadno stopnjo tudi pri višjih vrednostih  $k_{\text{off}}$ . S primerjanjem vrednosti funkcij  $f_N$  ( $N=1,2,3, \dots$ ) pri fiksni vrednosti  $k_{\text{off}}$  (glej sliko 26), lahko na enostaven način pokažemo tudi, da gladkost proteinske aktivacije posamezne kaskadne stopnje ( $f_N$ ) narašča z večanjem števila kaskadnih stopenj. To je pogojeno z vse bolj počasnim padanjem koncentracije aktiviranih proteinov  $N$ -te kaskadne stopnje v času med posameznimi pulzi oscilirajočega signala  $x(t)$ . Pri kaskadnih stopnjah  $N > 1$  je namreč omogočena aktivacija proteinov, tudi ko je  $x(t)=0$ , saj na aktivacijo proteinov  $N$ -te kaskadne stopnje vpliva koncentracija proteinov predhodne kaskadne stopnje (enačba 4.2b), ki v času med posameznimi pulzi ni enaka nič. To povzroča počasnejšo padanje koncentracije aktiviranih proteinov  $N$ -te kaskadne stopnje in s tem gladkejšo proteinsko aktivacijo. Rezultati na sliki 26 torej kažejo, da večstopenjske proteinske kaskade, v primerjavi z eno kaskadno stopnjo, omogočajo glajenje oscilirajočih signalov, ki vplivajo na aktivacijo proteinov prve kaskadne stopnje, pri precej širšem razponu vrednosti konstante  $k_{\text{off}}$ .



**Slika 26:** Gladkost  $f_N$  posamezne kaskadne stopnje  $N$  v odvisnosti od deaktivacijske konstante  $k_{\text{off}}$ . Ostale vrednosti parametrov so:  $k_{\text{on}}=0,1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $M \rightarrow \infty$ .

V smislu konstruiranja učinkovite gladke in stopničaste aktivacije proteinov, si v nadaljevanju pogledjmo še, kako število kaskadnih stopenj  $N$  vpliva na časovni potek aktivacije oziroma deaktivacije posamezne kaskadne stopnje. Na [sliki 27](#) lahko za konkreten primer vidimo časovni potek aktivacije proteinov za tri kaskadne stopnje. S slike je razvidno, da se z večanjem števila kaskad povečuje maksimalna koncentracija aktiviranih proteinov, pri čemer se čas aktivacije posamezne kaskadne stopnje ( $t_{\text{on},N}$ ) z večanjem števila kaskad zmanjšuje, deaktivacijski čas ( $t_{\text{off},N}$ ) pa povečuje.

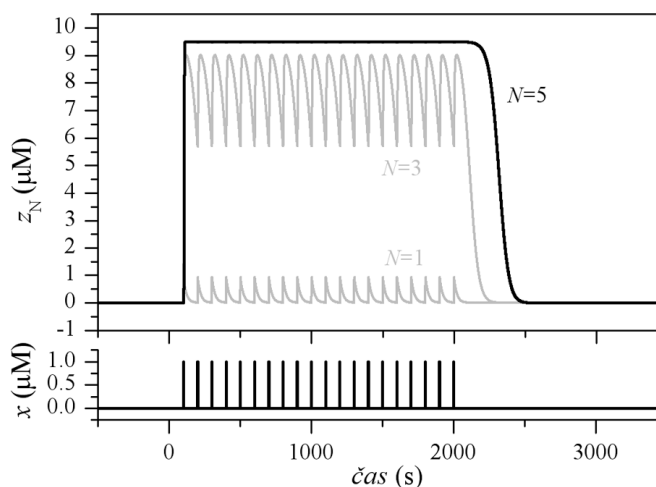


**Slika 27:** Časovni potek koncentracije aktiviranih proteinov posamezne kaskadne stopnje  $z_N$  v odvisnosti od pulzno oscilirajočega signala  $x$ , ki vpliva na aktivacijo proteinov prve kaskadne stopnje.  $k_{\text{on}}=0,1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{\text{off}}=0,005 \text{s}^{-1}$ ,  $M=20$ .



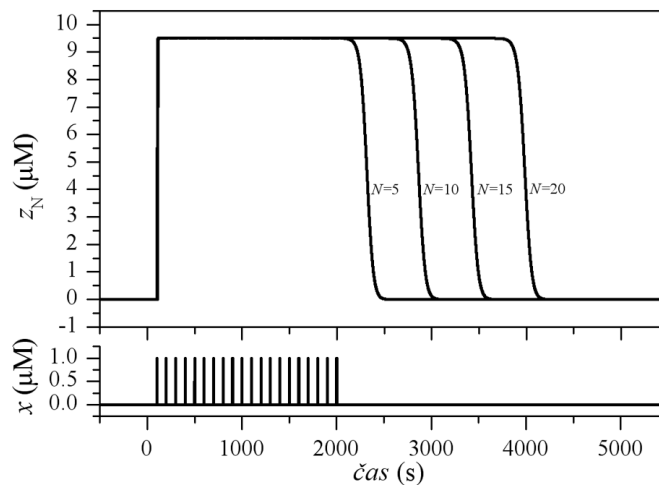
Podobno kot pri eni kaskadni stopnji, lahko tudi v tem primeru podrobneje analiziramo spreminjanje vklopno-izklopnih časov proteinske aktivacije posamezne kaskadne stopnje. Za  $N=1$ , smo na [sliki 5 \(dodatek A\)](#) pokazali, da se tako vklopni kot izklopni čas ( $t_{on,1}, t_{off,1}$ ) zmanjšata z naraščanjem vrednosti  $k_{off}$ . Pri proučevanju vpliva večjega števila kaskadnih stopenj ( $N>1$ ) pa smo na [sliki 7 \(dodatek A\)](#) pokazali, kako sta vklopni in izklopni čas proteinske aktivacije ( $t_{on,N}, t_{off,N}$ ) odvisna od  $k_{off}$  pri različnem številu kaskadnih stopenj  $N$ . Iz rezultatov na [sliki 7 \(glej dodatek A\)](#) lahko razberemo, da so potrebne velike vrednosti  $k_{off}$  za ostro stopničasto aktivacijo oziroma deaktivacijo proteinov. Pri določeni vrednosti  $k_{off}$  lahko razberemo tudi, da se z naraščanjem števila kaskad čas  $t_{on,N}$  zmanjšuje, čas  $t_{off,N}$  pa povečuje k določeni limitni vrednosti, kar sovпада z rezultati na [sliki 27](#), ki kažejo hitrejšo aktivacijo in počasnejšo deaktivacijo z naraščanjem števila kaskad.

Rezultati torej kažejo, da proteinske kaskade omogočajo gladko konstantno aktivacijo proteinov pod vplivom oscilirajočih signalov, pri čemer so omogočene hitre vklopno-izklopne karakteristike oziroma kratki odzivni časi. Hitre odzive zagotavljajo večje vrednosti konstante  $k_{off}$  ([glej sliko 7, dodatek A](#)), ki so v zgornjem območju, kjer še lahko zagotovimo gladkost proteinske aktivacije z dovolj velikim številom kaskadnih stopenj  $N$  ([glej sliko 26](#)). Pri tem velja poudariti, da se z večanjem števila kaskadnih stopenj, območje vrednosti  $k_{off}$ , pri katerem dobimo gladko proteinsko aktivacijo, hitro razširi že pri malem številu kaskadnih stopenj ([slika 26](#)). Da dosežemo sprejemljivo gladko stopničasto proteinsko aktivacijo, torej ne potrebujemo velikega števila kaskadnih stopenj. Na [sliki 28](#) lahko vidimo, da je za vrednost  $k_{off}=0,05 \text{ s}^{-1}$  že pri  $N=5$  odziv proteinske aktivacije zares stopničasta funkcija z dobro izraženim gladkim platojem proteinske aktivacije.



**Slika 28:** Časovni potek koncentracije aktiviranih proteinov posamezne kaskadne stopnje  $z_N$  v odvisnosti od pulzno oscilirajočega signala  $x$ , ki vpliva na aktivacijo proteinov prve kaskadne stopnje.  $k_{on}=0,1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{off}=0,05 \text{ s}^{-1}$ ,  $M=20$ .

Iz stopničaste funkcije proteinske aktivacije (sliki 28) pa je mogoče razbrati tudi zanimiv pojav, kjer vidimo, da se strmina proteinske deaktivacije ne prične takoj po izklopu pulzno oscilirajočega kalcija  $x$ , ki vpliva na aktivacijo prve kaskade. Opazimo lahko tako imenovan **spominski efekt**, zaradi katerega se protein deaktivira s časovno zakasnitvijo glede na izklop vhodnega signala  $x$ . Izkaže se, da spominski efekt narašča s številom kaskadnih stopenj (glej sliko 29). Za spominski čas  $t_m$ , ki smo ga definirali kot čas med zadnjim kalcijevim pulzom in zmanjšanjem koncentracije aktiviranih proteinov  $Z_N$  na 90% maksimalne vrednosti (glej dodatek A), smo pokazali, da spominski čas skoraj linearno narašča v odvisnosti od števila kaskadnih stopenj  $N$ , pri čemer je porast spominskega časa  $t_m$  v posamezni kaskadni stopnji odvisen od konstante  $k_{\text{off}}$  (glej sliko 10, dodatek A). Pri manjših vrednostih konstante  $k_{\text{off}}$ , se naraščanje spominskega časa v odvisnosti od števila kaskadnih stopenj bolj povečuje, kar je posledica počasnejše deaktivacije posamezne kaskadne stopnje.



**Slika 29:** Časovni potek koncentracije aktiviranih proteinov pri različnem številu kaskadnih stopenj  $N$ , v odvisnosti od pulzno oscilirajočega signala  $x$ , ki vpliva na aktivacijo proteinov prve kaskadne stopnje.  $k_{\text{on}}=0,1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{\text{off}}=0,05 \text{s}^{-1}$ ,  $M=20$ .

Pokazali smo, da igrajo proteinske kaskade odločilno vlogo pri glajenju oscilirajočih celičnih signalov s hitrimi vklopno-izklopnimi karakteristikami, kjer hitro oziroma stopničasto vklopno-izklopno karakteristiko zagotavlja dovolj velika vrednost konstante  $k_{\text{off}}$ , ki je še v območju, da z dovolj velikim številom kaskadnih stopenj  $N$  zagotovimo gladkost proteinske aktivacije.

Izkazalo se je, da ne potrebujemo velikega števila kaskadnih stopenj, da dosežemo sprejemljivo gladko stopničasto proteinsko aktivacijo, kar je tudi pogojeno s številom kaskadnih stopenj pri proteinskih kaskadah v celici. Kot smo že omenili (glej poglavje 3), so na primer pri mitogensko aktivirani protein kinazni kaskadi MAPK med seboj

povezane tri (glej sliko 16), lahko pa tudi štiri kaskadne stopnje (Nakabayashi in Sasaki, 2005). Glede na rezultate predstavljene v tem poglavju in dejstva, da lahko prenos signala preko MAPK kaskade povzroči tudi povečana koncentracija kalcija (Kamp in Hell 2000, Walker in sod. 2003, Kupzig in sod. 2005), za katerega je znano oscilirajoče spreminjanje (glej poglavje 2.2), lahko torej trdimo, da mitogensko aktivirana protein kinazna kaskada MAPK omogoča, pod vplivom oscilirajočega spreminjanja kalcija, gladko stopničasto proteinsko aktivacijo.

Pri iskanju pogojev, ki zagotavljajo gladko stopničasto proteinsko aktivacijo, pa je bilo moč opaziti tudi spreminjanje amplitude proteinske aktivacije, kar lahko razumemo kot ojačanje signala. S slike 21 in 22 lahko razberemo vpliv konstant  $k_{\text{on}}$  in  $k_{\text{off}}$  na maksimalno koncentracijo aktiviranih proteinov, kjer z naraščanjem konstante  $k_{\text{on}}$  narašča maksimalna koncentracija aktiviranih proteinov (slika 21), z naraščanjem konstante  $k_{\text{off}}$  pa ta koncentracija pada (slika 22). Prav tako lahko s slike 29 razberemo, da se z naraščanjem števila kaskadnih stopenj  $N$  amplituda proteinske aktivacije približuje limitni vrednosti. To lahko določimo z opazovanjem rešitve enačbe 3.6 v stacionarnem stanju ( $dz_N/dt = 0$ ), kar je upravičeno z vidika zelo gladkega izhodnega signala. V kolikor upoštevamo še, da je  $z_N = z_{N-1}$ , ko gre  $N \rightarrow \infty$ , dobimo limitno vrednost maksimalne koncentracije:

$$z_N = z_{\text{tot}} - k_{\text{off}} / k_{\text{on}}, \quad N \rightarrow \infty. \quad (4.8)$$

Sicer pa v tem poglavju ni bil namen proučevati ojačitev signalov, zato na tem mestu nismo posebej prikazali rezultatov, ki bi natančno prikazovali ojačitve signalov v odvisnosti od števila kaskadnih stopenj. Temu se bomo podrobneje posvetili v nadaljevanju (glej poglavje 5), ko bomo posebej proučevali možnosti ojačitve signalov z ohranitvijo pulzne oblike.

Za detajlnejše razumevanje rezultatov, predstavljenih v tem poglavju, pa velja v nadaljevanju predstaviti rezultate še z vidika primerjave glajenja električnih signalov, kjer prav tako srečujemo kaskadne mehanizme v smislu večstopenjskih nizkoprepustnih sit. Ta primerjava je še toliko bolj upravičena, če predstavimo tako imenovano frekvenčno karakteristiko kaskadnega cikla proteinske aktivacije, ki kaže frekvenčno odvisnost nizkoprepustnega sita (Chaim in sod. 2005, Hersen in sod. 2008). Nizkoprepustno sito, sestavljeno iz RC člena, je namreč osnovni element pri glajenju električnih signalov, poznana pa je tudi kaskadna vezava teh členov v večstopenjsko nizkoprepustno sito. Obravnavo glajenja električnih signalov si bomo podrobneje ogledali v nadaljevanju, kjer se bomo osredotočili predvsem na vlogo kaskadnih mehanizmov v smislu delovanja večstopenjskega nizkoprepustnega sita.

## 4.4 Glajenja električnih signalov

Z glajenjem signalov se srečujemo na različnih področjih signalizacije. Velikokrat se namreč pri detektiranju raznih parametrov oziroma pri generiranju in prenosu signalov pojavijo motnje v časovnem poteku opazovane količine, ki jih z glajenjem poskušamo odpraviti. To velja še posebej pri električnih sistemih, kjer so mehanizmi za glajenje signalov pri generiranju, prenosu in detektiranju signalov skoraj nepogrešljivi.

Kot smo omenili že v uvodu tega poglavja, v elektrotehniki poznamo tako imenovana nizkoprepustna sita, ki omogočajo učinkovito glajenje signalov. Srečujemo jih pri generiranju, prenosu in detekciji signalov. Nahajajo se na primer v usmernikih, pri pretvorbi izmeničnih signalov v enosmerne (Lorencon 1992), uporabljamo jih pri prenosu signalov, kjer prihaja do motenj oziroma neželenega šuma ter pri detekciji pulznih oziroma frekvenčno kodiranih signalov (Babič 2003). Tako jih danes uporabljamo povsod tam, kjer je potrebno ločiti analogne signale glede na njihovo frekvenčno vsebino, v smislu izločanja signalov z visokimi frekvencami.

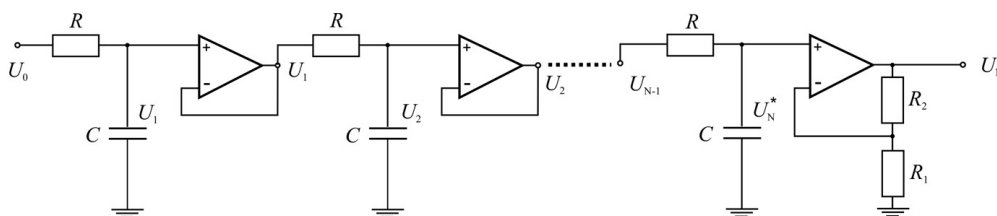
Kljub svoji analogni naravi jih srečujemo tudi pri digitalni obdelavi signalov. Kot primer omenimo glajenje napetostnih pulzov, ki se pojavijo ob kontaktnem vklopu stikala, s katerim posredujemo informacijo logičnim vezjem. Zaradi občutljivega delovanja logičnih vezij na spremembe vhodnih signalov, se ob kontaktnem vklopu pojavijo napetostni pulzi, ki jih lahko zgladimo z zaporedno vezavo  $RC$  člena, za katerega je značilna nizkopasovna frekvenčna prepustnost (Babič 2003).

Zaradi omenjenih specifičnih uporab električnih sit, jih obravnavamo ter podajamo njihove lastnosti običajno v frekvenčnem prostoru. Njihov splošen opis je matematično podan s prenosno funkcijo, ki določa odziv sita za poljuben vhodni signal. Običajno se podaja absolutna vrednost prenosne funkcije, kot amplitudna frekvenčna odvisnost, ki predstavlja vpliv sita na spremembo amplitudnih vrednosti vhodnega sinusnega signala. Tako lahko iz amplitudne frekvenčne karakteristike nizkoprepustnega sita razberemo širino frekvenčnega območja oziroma tako imenovano mejno frekvenco, pri kateri začne amplituda v odvisnosti od frekvence strmo padati. Podrobneje bomo to spoznali v nadaljevanju ob obravnavi konkretnih primerov, v smislu primerjave delovanja bioloških in tehničnih sistemov (poglavje 4.5).

Omenimo še, da za učinkovitejšo glajenje električnih signalov običajno uporabljamo nizkopasovna sita višjih stopenj, katerih lastnost je hitrejše upadanje amplitudne frekvenčne karakteristike in s tem večje slabljenje v zapornem frekvenčnem območju. Kot primer takšnega sita je kaskadna vezava  $RC$  členov, ki predstavljajo najpreprostejšo nizkoprepustno pasivno sito prve stopnje. Da se pri tem izognemo težavam zaradi neželenih obremenitev med posameznimi stopnjami kaskade, vključimo v vezje še sledilnike napetosti v smislu ločilnih elementov (glej sliko 30). S tem smo dobili tako imenovano aktivno nizkoprepustno sito, ki poleg  $RC$  členov vsebuje še

ojačevalna vezja, v katerih se uporabljajo predvsem operacijski ojačevalniki. Ker so danes postali integrirani operacijski ojačevalniki majhni, ceneni in splošno uporabni ojačevalni gradniki, so po njihovi zaslugi tudi aktivna sita doživela velik razmah. Prednost aktivnih sit se kaže predvsem na področju ojačanja nizkih frekvenc, pri impedančni prilagoditvi posamezne stopnje sita na signalni vir na vходу in breme na izhodu, ter v možnostih potrebnega ojačanja koristnih signalov (Babič 2003).

Slika 30 prikazuje primer kaskadne vezave nizkoprepustnega aktivnega sita z ojačanjem, ki ga bomo podrobneje obravnavali v nadaljevanju v okviru primerjave glajenja bioloških in električnih signalov (poglavje 4.5). Posamezna kaskada je sestavljena iz  $RC$  člena, kateremu kot ločilni element med posameznimi kaskadnimi stopnjami sledi sledilnik napetosti. Zaradi primerjave s proteinskimi kaskadami, kot mehanizmom glajenja bioloških signalov (glej poglavje 4.2), je na koncu kaskade nizkoprepustnega sita dodana ojačevalna stopnja, saj smo v okviru proteinskih kaskad spoznali, da te delujejo tudi kot ojačevalci signalov. Sicer pa v tem poglavju ne dajemo posebnega poudarka na ojačitvi signalov, saj bomo to podrobneje predstavili v nadaljevanju pri ojačitvi signalov z ohranitvijo pulzne oblike (glej poglavje 5).



**Slika 30:** Kaskadna vezava  $N$  nizkoprepustnih aktivnih sit z ojačanjem signala. Frekvenčna prepustnost ojačevalnika je določena s konstanto  $RC$  in število kaskadnih stopenj, ojačanje prepuščenih signalov pa je določeno z razmerjem upornosti  $R_2/R_1$ . Sledilniki napetosti delujejo kot ločilni elementi med posameznimi kaskadnimi stopnjami.

Predstavljen model nizkoprepustnega sita, ki je prikazan na sliki 30, lahko opišemo z naslednjim matematičnim modelom:

$$\frac{dU_i}{dt} = \frac{1}{RC}(U_{i-1} - U_i), \quad i=1, \dots, N-1, \quad (4.9a)$$

$$\frac{dU_N}{dt} = \frac{1}{RC}(A_{U,SS}U_{N-1} - U_N), \quad i=N, \quad (4.9b)$$

kjer je časovni potek spreminjanja napetosti na kondenzatorju  $U_i(t)$  ( $i=1,2,\dots,N$ ) odvisen od velikosti konstante  $RC$ . Ojačanje zadnje kaskade stopnje je v stacionarnem stanju določeno kot:

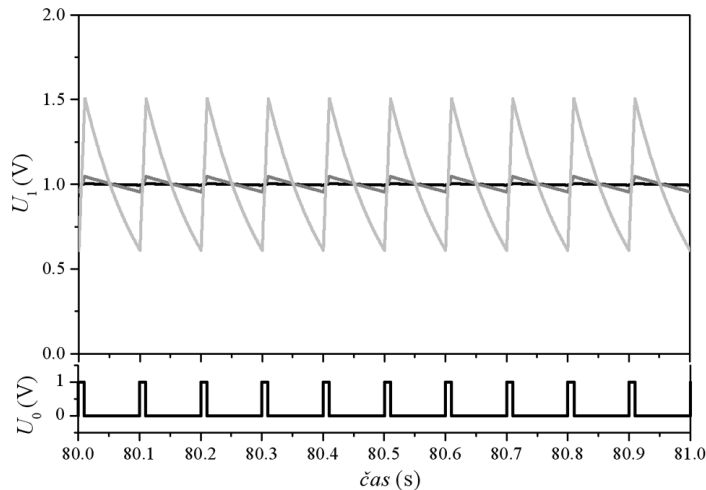
$$A_{U,ss} = 1 + \frac{R_2}{R_1}. \quad (4.10)$$

Rezultate, ki jih podaja opisan matematični model nizkoprepustnega aktivnega večstopenjskega sita (enačba 4.9), bomo prikazali v nadaljevanju, kjer bomo naredili primerjavo med glajenjem bioloških znotrajceličnih signalov s proteinskimi kaskadami in glajenjem električnih signalov s kaskadnim nizkoprepustnim sitom. Pri tem iščemo splošen pomen kaskad pri procesu glajenja signalov s kratkimi odzivnimi časi.

## 4.5 Rezultati s primerjavo bioloških in tehniških sistemov

V smislu razumevanja vloge kaskadnih mehanizmov, ki omogočajo glajenje signalov s kratkimi odzivnimi časi, kar smo spoznali že na primeru proteinskih kaskad (slika 28), si v nadaljevanju pogledimo primerjavo med glajenjem signalov v bioloških in tehničnih sistemih.

Podobno kot pri glajenju celičnih signalov (slika 22), si tudi v tem primeru kot prvo oglejmo glajenje signalov z eno kaskadno stopnjo nizkoprepustnega sita, prikazanega na sliki 30. Kot vhodni signal  $U_0$ , ki ga želimo zgladiti, ponovno vzemimo pulzno oscilirajoči signal (slika 20), katerega perioda je  $p=0,1$  s in dolžina pulza  $d=0,01$  s. Slika 31 prikazuje zglajen signal za tri različne vrednosti konstante  $RC$ . S slike lahko razberemo, da z večanjem konstante  $RC$  postaja signal vse bolj gladek. V kolikor primerjamo zglajenost signala z rezultati na sliki 22, lahko vidimo, da naraščanje konstante  $RC$  sovпада s padanjem konstante  $k_{off}$ .



**Slika 31:** Glajenje pulznih signalov z  $RC$  členom.  $p=0,1$  s,  $d=0,01$  s,  $U_{0,max}=1$  V,  $RC=10$  s (črna črta),  $RC=1$  s (temno siva črta),  $RC=0,1$  s (svetlo siva črta).  $A_{U,ss}=10$ .

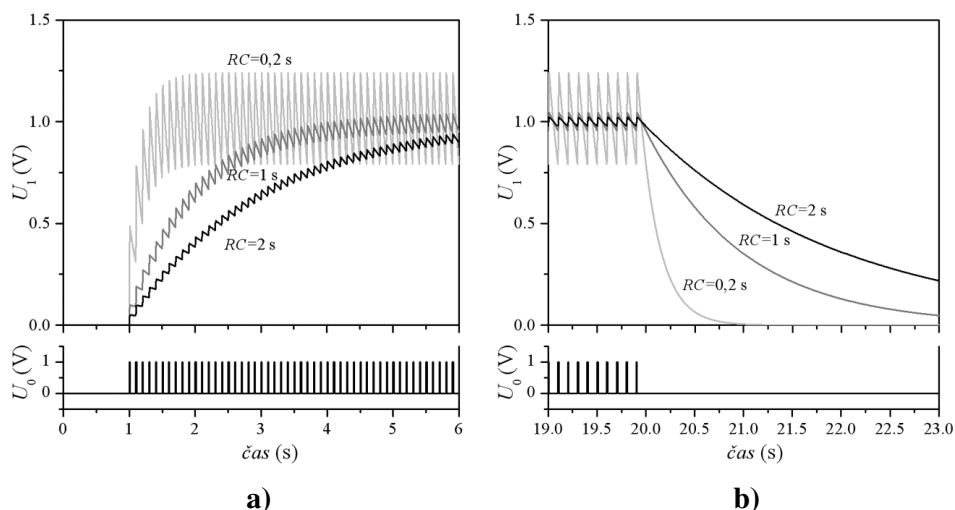
S primerjavo rezultatov glajenja celičnih in električnih signalov opazimo tudi (glej sliko 31 in 22), da z manjšanjem konstante  $k_{\text{off}}$ , pri konstantni vrednosti  $k_{\text{on}}$ , narašča povprečna vrednost koncentracije aktiviranih proteinov (enačba 4.6), medtem ko pri glajenju električnih signalov s spreminjanjem konstante  $RC$ , ostaja povprečna vrednost zglajene napetosti konstantna. Ker nas na tem mestu zanima zgolj glajenje signalov in ker lahko ojačitev zglajenih električnih signalov poljubno spreminjamo z razmerjem upornosti  $R_2/R_1$  (glej enačbo 4.10), temu sedaj ne bomo posvečali posebne pozornosti. Bomo pa ojačitve signalov podrobneje obravnavali posebej v naslednjem poglavju (glej poglavje 5).

Analogijo med obema konstantama lahko pokažemo tudi z analitično rešitvijo enačb 4.2a in 4.9a v časovnem intervalu med posameznimi pulzi. Ker je vrednost vhodnega signala  $U_0$  med pulzi enaka nič, lahko enačbo 4.9a poenostavimo in zapišemo časovni potek padanja napetosti med posameznima pulzoma kot:

$$U_1(t) = U_{1,\text{max}} e^{-\frac{1}{RC}t}. \quad (4.11)$$

Iz dobljene enačbe vidimo, da je padanje napetosti med pulzoma identično padanju koncentracije aktiviranih proteinov (enačba 4.4). Hitrost padanja koncentracije aktiviranih proteinov pri celičnih signalih je določena s konstanto  $k_{\text{off}}$ , padanje napetosti pri električnih signalih pa s konstanto  $1/RC$ . Konstanto  $k_{\text{off}}$ , ki vpliva na glajenje celičnih signalov, lahko torej primerjamo z obratno vrednostjo konstante  $RC$  pri glajenju električnih signalov.

Majhna vrednost konstante  $1/RC$ , ki omogoča učinkovito glajenje, pa podobno kot pri celičnih signalih majhna vrednost konstante  $k_{\text{off}}$ , privede do splošnega problema počasnega časovnega odziva zglajenega signala ob vklopu ter izklopu pulzno oscilirajočega vhodnega signala. Na slik 32 lahko vidimo časovni potek naraščanja in padanja zglajene napetosti za tri različne vrednosti konstante  $RC$ . Podobno kot lahko na sliki 24 in 25 vidimo, da se z zmanjševanjem konstante  $k_{\text{off}}$  odzivna časa povečujeta, lahko tudi na sliki 32 opazimo povečevanje odzivnih časov z zmanjševanjem konstante  $1/RC$ .

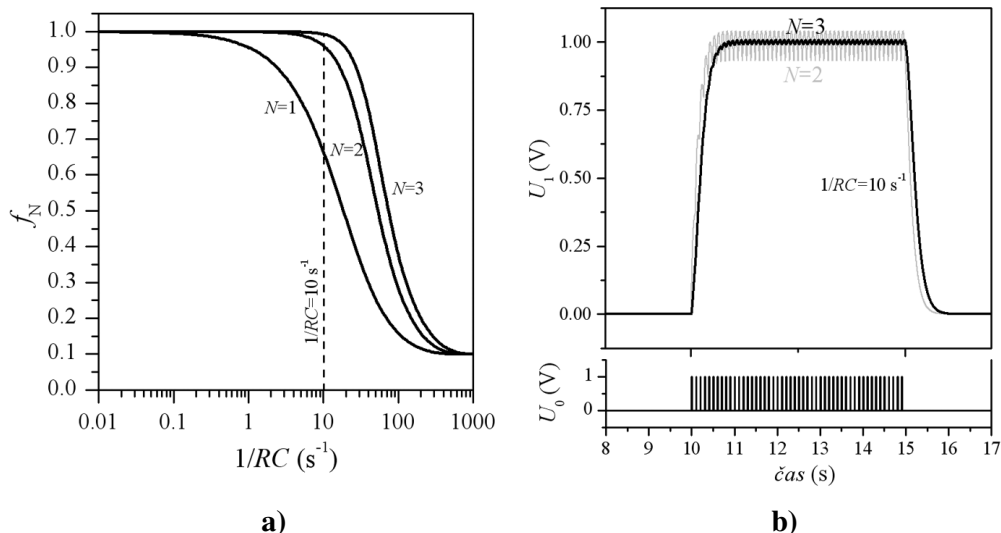


**Slika 32:** a) Časovni potek naraščanja napetosti  $U_1$  ob pojavu pulzno oscilirajočega vhodnega signala  $U_0$  pri različnih vrednostih konstante  $RC$ . b) Padanje napetosti  $U_1$  ob izklopu vhodnega signala za različne vrednosti konstante  $RC$ .

V splošnem lahko torej zaključimo, da učinkovito glajenje električnih signalov, pri čemer bi bili zagotovljeni kratki odzivni časi, z eno kaskadno stopnjo nizkoprepustnega sita, predstavljenega na [sliki 30](#), ni mogoče. Do enake ugotovitve smo prišli tudi v primeru glajenja celičnih signalov z enim kaskadnim ciklom proteinske aktivacije, kjer smo rešitev tega problema poiskali v kaskadni vezavi. Zato na podoben način proučimo vlogo kaskad tudi v primeru glajenja električnih signalov.

Izkaže se, da je z uporabo kaskadne vezave nizkoprepustnih aktivnih sit omogočena večja gladkost signala tudi pri večjih vrednostih konstante  $1/RC$  ([glej sliko 33a](#)), kar omogoča hitrejše odzive tudi pri gladkih signalih. Gladkost  $f_N$  smo v tem primeru definirali na enak način kot pri celični signalizaciji ([enačba 4.5](#)). Kvalitativno enaki rezultati ([glej sliko 26 in 33a](#)) pričajo o splošni vlogi kaskadnega mehanizma pri glajenju celičnih in električnih signalov s kratkim odzivnim časom. Da kaskadna vezava nizkoprepustnih aktivnih sit omogoča glajenje neharmoničnih pulznih signalov, pri čemer so zagotovljeni kratki odzivni časi, priča tudi časovni potek zglajene napetosti na [sliki 33b](#), ki smo ga dobili z 2-stopenjskim in 3-stopenjskim nizkoprepustnim sitom za vrednost konstante  $1/RC=10$  s<sup>-1</sup>. Kako se pri tem spreminja gladkost v odvisnosti od števila kaskadnih stopenj  $N$ , prikazuje črtkana črta na [sliki 33a](#), kjer lahko vidimo, da že 2-stopenjsko nizkoprepustno sito, v primerjavi z 1-stopenjskim, omogoča precej boljše gladkost zglajenega signala. Dobljen gladek stopničast odziv na pulzno oscilirajoč signal pri  $N=3$  ([slika 33b](#)), lahko primerjamo tudi s stopničastim odzivom proteinske aktivacije na [sliki 28](#).





**Slika 33:** **a)** Gladkost  $f_N$  zglajenega signala za tri različne stopnje nizkoprepustnega sita ( $N=1,2,3$ ) v odvisnosti od konstante  $RC$ . **b)** Časovni potek zglajenega signala za 2-stopenjsko (siva črta) in 3-stopenjsko (črna črta) nizkoprepustno sito s konstanto  $1/RC=10 \text{ s}^{-1}$ .

### Amplitudno frekvenčna odvisnost

Spoznali smo, da kaskadni mehanizmi omogočajo glajenje pulzno oscilirajočih neharmoničnih signalov, pri čemer so zagotovljeni hitri časovni odzivi. Ker to velja za glajenje celičnih kot tudi električnih signalov, si v nadaljevanju podrobneje pogledimo vlogo kaskadnih mehanizmov še z vidika obravnave glajenja električnih signalov. Ker obravnavamo glajenju električnih signalov običajno s pomočjo amplitudno frekvenčne odvisnosti nizkoprepustnih sit ([Theodore in sod. 2004](#)), kar smo omenili že v [poglavju 4.4](#), si podrobneje pogledimo glajenje električnih in celičnih signalov še s tega vidika.

[Slika 34](#) prikazuje primer frekvenčne karakteristike za aktivno nizkoprepustno sito predstavljeno na [sliki 30](#). Amplitudno frekvenčno karakteristiko dobimo tako, da za vhodni signal ([enačba 4.9a](#)) uporabimo harmonični sinusni signal različnih frekvenc:

$$U_0(t) = U_{0,\max} \sin(\omega t), \quad (4.12)$$

pri čemer je  $\omega = 2\pi f$ . Prikažemo jo z izrisom ojačanja signala:

$$A_{U,N} = U_{N,\max} / U_{0,\max} \quad (4.13)$$

v odvisnosti od frekvence  $f$  vhodnega signala.

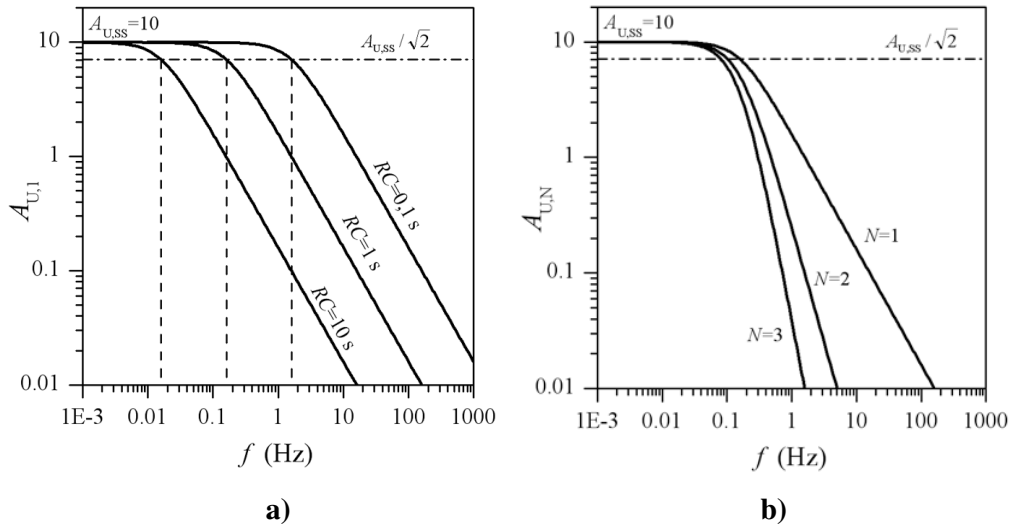
Na podoben način lahko predstavimo tudi amplitudno frekvenčno odvisnost proteinskih kaskad ([glej sliko 35](#)), ki jo dobimo z izrisom ojačanja:

$$A_N = z_{N,\max} / x_{\max} \quad (4.14)$$

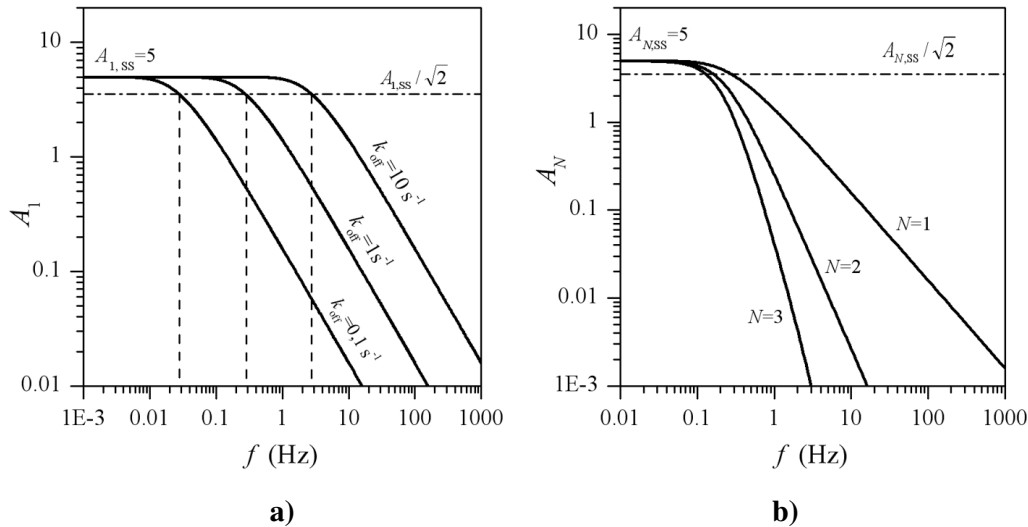
v odvisnosti od frekvence vhodnega signala:

$$x(t) = x_{\max} \sin(\omega t), \quad (4.15)$$

ki ga vstavimo v [enačbo 4.2a](#).



**Slika 34:** Amplitudno frekvenčna karakteristika nizkoprepustnega sita z ojačanjem (glej [sliko 30](#)). **a)** Frekvenčna karakteristika 1-stopenjskega sita za tri različne vrednosti konstante  $RC$ . Črtkane črte predstavljajo mejno frekvenco prepustnega pasu. **b)** Frekvenčna karakteristika večstopenjskega sita ( $N=1,2,3$ ),  $RC=1$  s.



**Slika 35:** **a)** Frekvenčna karakteristika ene kaskadne stopnje proteinske aktivacije za tri različne vrednosti  $k_{\text{off}}$  ( $k_{\text{on}}=k_{\text{off}}$ ). Črtkane črte predstavljajo mejno frekvenco prepustnega pasu. **b)** Frekvenčna karakteristika večstopenjske proteinske kaskade.  $N=1$ ,  $k_{\text{on}}=1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ;  $N=2$ ,  $k_{\text{on}}=0,1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ;  $N=3$ ,  $k_{\text{on}}=0,05 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ;  $k_{\text{off}}=1 \text{s}^{-1}$ .

Iz amplitudno frekvenčnih karakteristik ([slika 34 in 35](#)) lahko na enostaven način razberemo širino frekvenčnega območja oziroma tako imenovano mejno frekvenco, pri

kateri začne amplituda v odvisnosti od frekvence strmo padati. Za določitev mejne frekvence je sprejet dogovor, da je to tista frekvenca, pri kateri sito prepušča še polovico moči harmoničnega vala s to frekvenco. Ker je moč signala sorazmerna s kvadratom amplitude, pade pri tej frekvenci ojačanje signala na vrednost  $A_{SS} / \sqrt{2}$ , kjer je  $A_{SS}$  največje ojačanje v prepustnem pasu sita.

Iz primerjave amplitudno frekvenčnih karakteristik na slikah 34a in 35a lahko opazimo, da se v primeru enostopenjskega kaskadnega cikla, z zmanjševanjem konstante  $1/RC$  pri glajenju električnih signalov in konstante  $k_{off}$  pri glajenju celičnih signalov, zmanjšuje tudi mejna frekvenca nizkoprepustnega sita (glej črtkane črte na sliki 34a in 35a). Z zmanjšanjem mejne frekvence, se je zmanjšala tudi prepustnost višjih frekvenc, kar sicer omogoča boljše glajenje, vendar se je zaradi zmanjšanja mejne frekvence povečal odzivni čas, kar smo spoznali že pri časovnem poteku glajenja signalov (slika 24, 25 in 32).

Popolno analogijo pri glajenju električnih in bioloških signalov, kaže tudi glajenje s kaskadnimi mehanizmi (slika 34b in 35b). Iz frekvenčnih karakteristik lahko razberemo, da se v obeh primerih z večanjem kaskadnih stopenj zmanjšuje prepustnost frekvenc večjih od mejne frekvence, kar omogoča učinkovitejše glajenje. O tem priča vedno večja strmina padanja amplitudno frekvenčne karakteristike. Pri tem je zanimivo to, da se mejna frekvenca z večanjem števila kaskadnih stopenj bistveno ne zmanjšuje (glej sliko 34b in 35b), kar posledično ne privede do neželenega povečanja odzivnega časa. Da mejna frekvenca ostaja približno enaka, je posledica konstantnih vrednosti konstante  $k_{off}$  in  $RC$ , pri spreminjanju števila kaskadnih stopenj.

Iz primerjav frekvenčnih karakteristik na slikah 34 in 35 lahko torej zaključimo, da obstaja popolna analogija med glajenjem celičnih signalov s proteinskimi kaskadami in glajenjem električnih signalov z večstopenjskim nizkoprepustnim sitom. V obeh primerih je kaskadna vezava tista, ki omogoča učinkovitejšo glajenje in hkrati zagotavlja kratke odzivne čase. Popolno analogijo je mogoče vzpostaviti tudi med konstantama  $k_{off}$  in  $1/RC$ , kjer konstanta  $k_{off}$  določa mejno frekvenco amplitudne frekvenčne karakteristike proteinskih kaskad, konstanta  $1/RC$  pa mejno frekvenco nizkoprepustnih sit v električnih vezjih. S tem sta ravno ti dve konstanti odgovorni za časovne odzive pri glajenju bioloških oziroma električnih signalov.

Iz frekvenčne karakteristike lahko razberemo tudi, da se z zmanjševanjem frekvence ( $f \rightarrow 0$ ) približujemo maksimalnemu ojačanju, ki je enako ojačanju v stacionarnem stanju ( $A_N \rightarrow A_{N,SS}$ ). Temu ojačanju v tem poglavju nismo dajali posebnega poudarka, ker ga lahko poljubno spreminjamo in za razumevanje glajenja signalov nima bistvenega pomena. Bomo pa ojačanje signalov podrobneje obravnavali v naslednjem poglavju, kjer bomo proučevali ojačitve signalov z ohranitvijo pulzne oblike.



## 5 OJAČITEV SIGNALOV Z OHRANITVIJO PULZNE OBLIKE

Kot drug prispevek želimo v tem delu poudariti vlogo kaskad pri ojačitvi signalov z ohranitvijo pulzne oblike. Poudarek je na vlogi proteinskih kaskad pri ojačitvi signalov v okviru znotrajcelične signalizacije. Za splošno razumevanje mehanizmov, ki omogočajo ojačitve signalov z ohranitvijo pulzne oblike, želimo predstaviti vlogo kaskad tudi v tehničnih sistemih in sicer na področju elektrotehnike. Izpostaviti želimo primerjavo med proteinskimi kaskadami in večstopenjskimi ojačevalniki pri ojačitvi električnih signalov.

Da proteinske kaskade delujejo kot ojačevalci signalov, je bilo že večkrat pokazano (Stadtman in Chock 1977, Koshland in sod. 1982, Chock 1980, Goldbeter in Koshland 1981, Goldbeter in Koshland 1982, Goldbeter in Koshland 1984, Heinrich in sod. 2002, Mayawala 2004, Nakabayashi in Sasaki 2005). Malo pa je bilo narejenega na proučevanju spremembe oblike signala pri ojačitvi signalov pod vplivom kaskad. Kot smo omenili že v [prejšnjem poglavju](#), je bilo pokazano, da proteinska kaskada deluje kot nizko pasoven filter (Chaim in sod. 2005, Hersen in sod. 2008), ki vpliva na spremembo oblike signala. Pokazano je tudi bilo, da število kaskad vpliva na trajanje signala in s tem na njegovo obliko (Heinrich in sod. 2002). Pokazali so, da z večanjem števila stopenj znotraj kaskade postaja signal ostrejši, če uporabimo enako ojačitev signala. Ni pa bil predstavljen osnovni mehanizem, ki zagotavlja ohranjanje oblike pri ojačitvi vhodnega signala, kar želimo podrobneje predstaviti v nadaljevanju.

Predstavili bomo pomen ohranjanja pulzne oblike vhodnih signalov, zapisali matematični model v smislu ojačitve celičnih signalov in pokazali ključne mehanizme, ki so odgovorni za ohranitev oblike pulzov v procesu ojačanja signalov. Zaradi prisotnosti kaskadnih mehanizmov v bioloških in tehničnih sistemih, bomo naredili tudi primerjavo med pomenom kaskad pri ojačitvi signalov v bioloških in tehničnih sistemih. Analogijo obeh sistemov bom prikazali v smislu primerjave proteinske kaskade z večstopenjskim operacijskim ojačevalnikom, katerega vloga je v elektrotehniki že dalj časa dobro znana.

### 5.1 Pomen ohranitve oblike pulzov v procesu ojačitve signalov

Kot vemo, se srečujemo z ojačitvami signalov na vseh področjih signalizacije oziroma prenosa informacije. Tako danes poznamo najrazličnejše ojačevalnike, ki omogočajo ojačitev mehanskih prenosov, električnih ali bioloških signalov. Pri tem je pomembno, da se ojačan signal čim manj popači, kar zahteva od ojačevalnikov hitre in zanesljive odzive. Popačenost ojačanega signala lahko obravnavamo tudi z vidika

količine informacij o signalu, ki jih je uspel ojačevalnik prenesti. To velja še posebej za signale, ki zahtevajo prenos velike količine informacij. Tipični primer so neharmonični pulzni signali, katerih oblika je povezana s širokim frekvenčnim spektrom Fourierjeve transformacije.

Kot primer neharmoničnih pulznih signalov so znotrajcelične kalcijeve oscilacije. Znano je, da je veliko celičnih procesov reguliranih tako, da se v odvisnosti od tipa dražljaja, kot tudi njegove koncentracije pojavijo različni vzorci in frekvence  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacij. Pri tem prosti  $\text{Ca}^{2+}$  ioni delujejo kot sekundarni prenašalci informacij. Ko njihova koncentracija dovolj naraste, lahko nadalje aktivirajo proteine in s tem omogočijo prenos informacije. Pri tem so se pulzno oblikovani signali izkazali kot uspešen mehanizem pri prenosu signalov. Matematično je bilo pokazano (Salazar in sod. 2008), da pri nizkih povprečnih koncentracijah  $\text{Ca}^{2+}$  ionov, pulzno oscilirajoče spreminjanje  $\text{Ca}^{2+}$  ionov omogoča veliko bolj učinkovito aktivacijo proteinov kot ista konstantna povprečna koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  ionov. Pri nizkih povprečnih koncentracijah pulzno oscilirajoči signali preskočijo mejno koncentracijo proteinske aktivacije, medtem ko se povprečna vrednost koncentracije nahaja pod to mejo. Predhodno je bilo to tudi eksperimentalno potrjeno pri aktivaciji RAS proteinov (Kupzig in sod 2005) in nekaterih prepisovalnih faktorjih kot je NAFT (Lewis 2003).

Kot smo že omenili, lahko ohranjanje pulzne oblike ojačanega signala razumemo tudi kot zmožnost širokega frekvenčnega prepuščanja ojačevalnikov. Kot primer takšnih bioloških ojačevalnikov omenimo prenos signala preko MAPK signalne poti. Široka frekvenčna prepustnost je pomembna predvsem z vidika frekvenčne kodiranosti signalov. Tako je na primer za kalcijeve signale znano, da omogočajo frekvenčno kodacijo informacije. O tem pričajo tudi eksperimenti, ki kažejo, da spreminjanje frekvence  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacij resnično vpliva na nekatere celične procese, kot je na primer ekspresija genov (Dolmetsch in sod. 1998, Li in sod. 1998). Ker povečana koncentracija prostih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov lahko aktivira tudi MAPK signalno pot, je pomembno, da je ta zmožna prepuščanja informacije v čim širšem frekvenčnem spektru.

Z ohranitvijo pulzne oblike ojačanih signalov se srečujemo tudi v tehničnih sistemih, kjer želimo na primer ojačiti razne svetlobne, zvočne ali električne signale. Kot primer omenimo ojačanje električnih signalov, za katere uporabljamo razne ojačevalnike, ki delujejo kot učinkovito preklopno stikalo, pri katerem težimo k čim hitrejšim časovnim odzivom. Sicer pa dudi tukaj lahko obravnavamo ojačevalnike z vidika zmožnosti široke frekvenčnega prepuščanja, saj imamo tudi pri prenosu električnih signalov običajno opravka s frekvenčnim kodiranjem informacije.

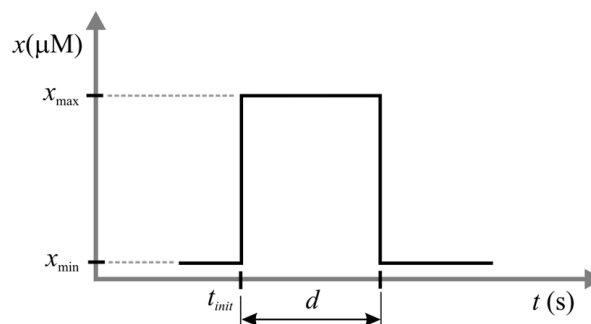
## 5.2 Matematični model ojačitve celičnih signalov

Za proučevanje vloge proteinskih kaskad pri ojačitvi signalov z ohranitvijo pulzne oblike, bomo prav tako uporabili že omenjen model linearno povezanih proteinskih kaskad (slika 18b), ki ga matematično opisuje enačba 3.5. Omenjen model smo že uporabili za proučevanju vloge proteinskih kaskad pri glajenju celičnih signalov s kratkimi odzivnimi časi (glej poglavje 4.2, enačba 4.2), medtem ko je bil v preteklosti tudi že večkrat uporabljen (Heinrich 2002, Chaves 2004, Nakabayashi in Sasaki 2005, Detwiler 2000), saj v okviru določenih predpostavk oziroma poenostavitvev (glej poglavje 3.2) dovolj dobro opisuje fiziološki pomen proteinskih kaskad in s tem prenos signala od stimula preko posameznih kinaz do končnega odziva celice.

Pri analizi ojačitve celičnih signalov z ohranitvijo pulzne oblike, bomo simulirali pulzni porast koncentracije kalcija v citosolu, za katerega je značilno pulzno oscilirajoče spreminjanje (glej poglavje 2). Podobno kot smo pri glajenju oscilirajočih signalov simulirali njihovo pulzno spreminjanje z umetnimi pravokotno oblikovanimi pulzi (glej sliko 20, poglavje 4.2), tudi v tem primeru simulirajmo pulzni signal z umetno pravokotno oblikovanim pulzom. Spremembo koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  v obliki pulza torej zapišemo z naslednjim pravokotnim pulzom:

$$x(t) = \begin{cases} x_{\max}, & \text{if } t_{\text{init}} < t < d, \\ x_{\min}, & \text{else,} \end{cases} \quad (5.1)$$

kjer je  $x_{\min}$  minimalna in  $x_{\max}$  maksimalna vrednost koncentracije prostih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov. V vseh nadaljnjih preračunih vzamemo za minimalno vrednost koncentracije  $x_{\min}=0 \mu\text{M}$ , za maksimalno vrednost pa  $x_{\max}=1 \mu\text{M}$ . V zgornji enačbi (5.1) predstavlja še  $t_{\text{init}}$  čas pričetka pojava pulza in  $d$  širino pulznega signala (glej sliko 36).



**Slika 36:** Serija pravokotno generiranih  $\text{Ca}^{2+}$  pulznih oscilacij.  $x_{\max}$  in  $x_{\min}$  predstavljata maksimalno in minimalno vrednost koncentracije prostih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov ( $x$ ). Periodo med pulzi označuje  $p$ , trajanje pulza pa  $d$ .

Pulzni kalcijev signal  $x(t)$  (slika 36) aktivira proteine v prvi stopnji kaskade, ti nadalje aktivirajo proteine druge kaskadne stopnje in tako naprej se aktivirajo proteini vzdolž celotne kaskade (glej sliko 18b). Koncentracijo aktiviranih proteinov na  $i$ -ti

stopnji kaskade ( $z_i$ ) lahko torej zapišemo na enak način kot pri glajenju celičnih signalov (glej enačbo 4.2, poglavje 4.2):

$$\frac{dz_1}{dt} = k_{\text{on}} x^n (z_{\text{tot}} - z_1) - k_{\text{off}} z_1, \quad (5.2a)$$

$$\frac{dz_i}{dt} = k_{\text{on}} z_{i-1} (z_{\text{tot}} - z_i) - k_{\text{off}} z_i, \quad i=2, \dots, N. \quad (5.2b)$$

Zaradi enostavnosti in iskanja osnovnih mehanizmov, ki zagotavljajo ojačanje signalov z ohranitvijo pulzne oblike, tudi v tem primeru uporabimo pri vseh nadaljnjih izračunih  $n=1$  in enake vrednosti konstant  $k_{\text{on}}$ ,  $k_{\text{off}}$  in  $z_{\text{tot}}$  v vseh stopnjah kaskade. Uporaba enakih konstant posameznih stopenj je tudi v tem primeru upravičena, saj kaskada, ki ima na vseh stopnjah enake vklopne konstante  $k_{\text{on}}$ , najučinkoviteje generira ostre signale, enake konstante  $k_{\text{off}}$  pa omogočajo doseganje največjih ojačanj (Chaves in sod. 2004). Pri vseh izračunih vzamemo za vrednost  $z_{\text{tot}}=100 \mu\text{M}$ , kar je za 10-krat več, kot pri glajenju signalov. Uporabo večje vrednosti  $z_{\text{tot}}$  upravičujemo s precej različno izmerjenimi vrednostmi koncentracije posameznih proteinov v celicah (Huang in Ferrell, 1996). Vrednosti konstant  $k_{\text{on}}$  in  $k_{\text{off}}$  bodo podane v nadaljevanju ob posameznih preračunih.

### 5.3 Rezultati

Na začetku si pogledjmo preprost primer enega fosforilacijsko-defosforilacijskega cikla oziroma ene kaskadne stopnje proteinske aktivacije ( $N=1$ ). Nadalje pa primerjajmo rezultate z večstopenjsko proteinsko kaskado. Da bi pojasnili mero, ki določa ohranjanje pulzne oblike ojačanega signala, si v nadaljevanju pogledjmo še amplitudno frekvenčno karakteristiko kaskadnega proteinskega ojačevalnika.

#### Odziv celičnega ojačevalnika z eno kaskadno stopnjo

Kot prvo analizirajmo odziv celičnega ojačevalnika z eno kaskadno stopnjo (enačba 5.2a) na stopničast vhodni signal, pri čemer v enačbi 5.1 vzamemo čas  $d$  dovolj velik (slika 36), da koncentracija aktiviranih proteinov  $z_1(t)$  doseže maksimalno vrednost oziroma stacionarno stanje:

$$z_{1,ss} \Big|_{x=x_{\text{max}}} = \frac{x_{\text{max}}}{K + x_{\text{max}}} z_{\text{tot}}. \quad (5.3)$$

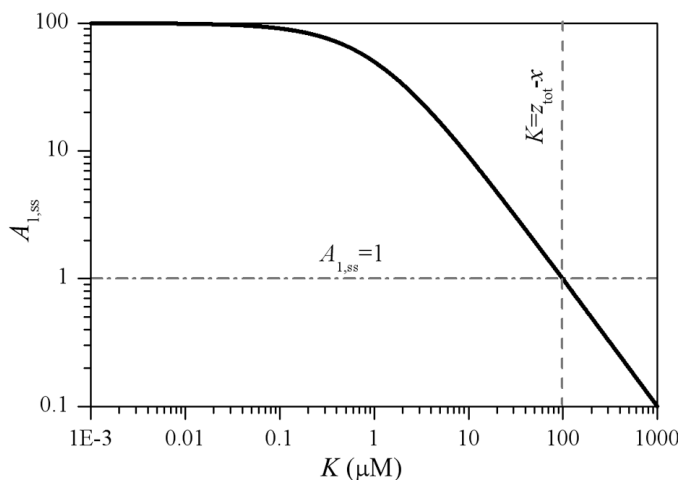
V enačbi 5.3 predstavlja  $K$  disociacijsko konstanto, ki je definirana kot  $K = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ . V tem primeru lahko zapišemo ojačanje v stacionarnem stanju  $A_{1,ss}$  kot maksimalno



ojačanje, ki je definirano z razmerjem med maksimalno vrednostjo ojačanega signala  $z_{1,ss}|_{x=x_{\max}}$  in konstantno vrednostjo vhodnega signala  $x_{\max}$ :

$$A_{1,ss} = \frac{z_{1,ss}|_{x=x_{\max}}}{x_{\max}} = \frac{1}{K + x_{\max}} z_{\text{tot}}. \quad (5.4)$$

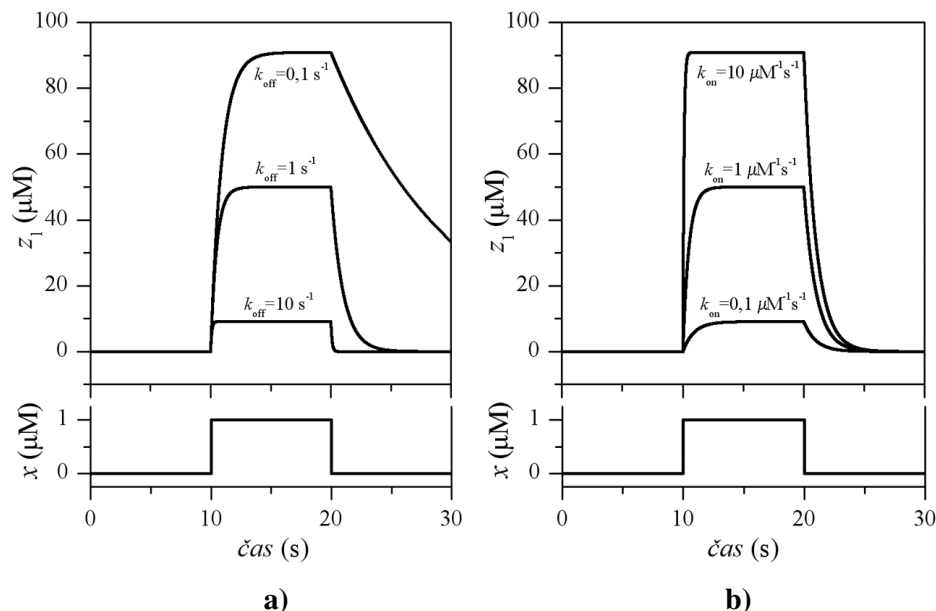
Iz [enačbe 5.4](#) lahko razberemo, da je ojačanje  $A_{1,ss}$ , pri dani vrednosti  $x_{\max}$  in  $z_{\text{tot}}$ , odvisno od konstante  $K$ . Za primer, ko je  $x_{\max} = 1 \mu\text{M}$  in  $z_{\text{tot}} = 100 \mu\text{M}$ , lahko odvisnost ojačanja  $A_{1,ss}$  od konstante  $K$  vidimo na [sliki 37](#). Iz [enačbe 5.4](#) lahko razberemo, da mora biti v primeru ojačanja ( $A_{1,ss} > 1$ ) konstanta  $K < z_{\text{tot}} - x_{\max}$ , medtem ko pri večjih vrednostih  $K$  pride do oslabitve vhodnega signala  $x$  ( $A_{1,ss} < 1$ , [glej sliko 37](#)).



**Slika 37:** Ojačanje signala  $A_{1,ss}$  v odvisnosti od disociacijske konstante  $K$ . Vrednosti parametrov so:  $x_{\max} = 1 \mu\text{M}$ ,  $z_{\text{tot}} = 100 \mu\text{M}$ . Črtkana črta predstavlja mejo ( $K$ ) med ojačitvijo in oslabitvijo vhodnega signala.

Čeprav je ojačanje signala odvisno le od disociacijske konstante  $K$  ([enačba 5.4](#)), je oblika ojačanega signala dejansko odvisna od aktivacijsko-deaktivacijskih konstant  $k_{\text{on}}$  in  $k_{\text{off}}$  ( $K = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ ). Na [sliki 38](#) lahko vidimo obliko ojačanega signala pri različnih vrednostih konstant  $k_{\text{on}}$  in  $k_{\text{off}}$ . [Slika 38a](#) prikazuje spreminjanje velikosti ojačanja in oblike ojačanega signala, s spreminjanjem deaktivacijske konstante  $k_{\text{off}}$ , pri konstantni vrednosti konstante  $k_{\text{on}}$ . S slike lahko razberemo, da se z zmanjševanjem konstante  $k_{\text{off}}$  in s tem konstante  $K$ , ojačanje povečuje, medtem ko postaja oblika ojačanega signala vse manj podobna pulzni obliki vhodnega signala  $x$ . Povečano ojačanje signal lahko opazimo tudi na [sliki 38b](#), kjer zmanjšanje konstante  $K$  dosežemo na račun povečanja aktivacijske konstante  $k_{\text{on}}$ . V tem primeru ostaja popačenje pulzne oblike vhodnega

signala približno konstantno, kar je povezano s konstantno vrednostjo deaktivacijske konstante  $k_{\text{off}}=1 \text{ s}^{-1}$ , katere vlogo pri obliki ojačanega signal bomo podrobneje proučili v nadaljevanju.



**Slika 38:** Časovni odziv ojačanega pravokotno pulznega signala  $x$ . **a)** Ojačan signal za tri različne vrednosti  $k_{\text{off}}$ , pri konstantni vrednosti  $k_{\text{on}}=1 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . **b)** Ojačan signal za tri različne vrednosti  $k_{\text{on}}$  pri konstantni vrednosti  $k_{\text{off}}=1 \text{ s}^{-1}$ .

Vpliv konstant  $k_{\text{on}}$  in  $k_{\text{off}}$  na potek oblike ojačanega signala, kot je to razvidno iz slike 38, lahko pokažemo tudi z enostavno matematično analizo (glej dodatek B, enačba 5 in 6), na podlagi katere definiramo tako imenovana vklopno-izklopna časa  $t_{\text{on}}$  in  $t_{\text{off}}$ . Vklopni čas  $t_{\text{on}}$  je čas, ki je potreben, da ob vklopu signala  $x(t)$  ojačan signal naraste iz 10 % na 90 % maksimalne vrednosti  $z_{1,\text{ss}}$ :

$$t_{\text{on}} = \ln\left(\frac{1-\gamma_1}{1-\gamma_2}\right) \frac{1}{k_{\text{off}} + k_{\text{on}} x_{\text{max}}}, \quad (5.5)$$

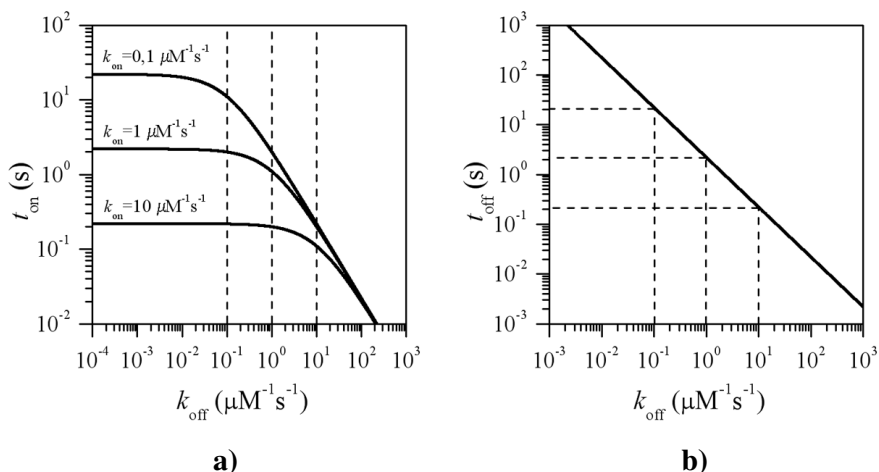
kjer je  $\gamma_1 = 0,1$  in  $\gamma_2 = 0,9$ . Izklopni čas  $t_{\text{off}}$  pa je definiran kot čas, ki je potreben, da ob izklopu signala  $x(t)$  ojačan signal pade iz 90% na 10% maksimalne vrednosti  $z_{1,\text{ss}}$ :

$$t_{\text{off}} = \ln\left(\frac{\gamma_2}{\gamma_1}\right) \frac{1}{k_{\text{off}}}. \quad (5.6)$$

Spreminjanje vklopnega časa  $t_{\text{on}}$  (enačba 5.5) in izklopnega časa  $t_{\text{off}}$  (enačba 5.6) v odvisnosti od konstante  $k_{\text{off}}$ , lahko spremljamo tudi iz slike 39. Na sliki 39a vidimo, da z zmanjševanjem konstante  $k_{\text{off}}$ , časa  $t_{\text{on}}$  narašča proti limitni vrednosti (glej enačbo 5.5):

$$\lim_{k_{\text{off}} \rightarrow 0} (t_{\text{on}}) = \ln\left(\frac{1-\gamma_1}{1-\gamma_2}\right) \frac{1}{k_{\text{on}} x_{\text{max}}}, \quad (5.7)$$

medtem ko izklopni čas  $t_{\text{off}}$  narašča proti neskončnosti (sliki 39b, glej enačbo 5.6).



**Slika 39:** Časovni odziv aktivacije in deaktivacije proteinov. **a)** Spreminjanje aktivacijskega časa  $t_{\text{on}}$  v odvisnosti od konstante  $k_{\text{off}}$ , za tri različne vrednosti  $k_{\text{on}}$  (vrednosti  $k_{\text{on}}$  so enake kot na sliki 38b) Črtkane črte predstavljajo tri različne vrednosti  $k_{\text{off}}$  (enako kot na sliki 38a). **b)** Odvisnost izklopnega časa  $t_{\text{off}}$  od konstante  $k_{\text{off}}$ . Črtkane črte predstavljajo čase  $t_{\text{off}}$  pri treh različne vrednosti  $k_{\text{off}}$  (Vrednosti  $k_{\text{off}}$  so enake kot na sliki 38a).

Iz enačbe 5.5 in 5.6 ter slike 39 lahko vidimo, da dobimo ostre stopničaste odzive pri velikih vrednostih konstant  $k_{\text{on}}$  in  $k_{\text{off}}$ . Za tri različne vrednosti konstante  $k_{\text{off}}$  (črtkane črte, slika 39) lahko opazimo, da se z povečevanjem konstante  $k_{\text{off}}$ , zmanjšujeta časa  $t_{\text{on}}$  in  $t_{\text{off}}$ , kar je za tri enake vrednosti  $k_{\text{off}}$  mogoče opaziti na sliki 38a, v obliki hitrejše aktivacije proteinov. Iz slike 39a lahko razberemo tudi, da se z povečevanjem konstante  $k_{\text{on}}$ , pri konstantni vrednosti  $k_{\text{off}}$ , zmanjšuje vklopni čas  $t_{\text{on}}$ , medtem ko izklopni čas  $t_{\text{off}}$  ostaja enak, kar se odraža tudi na časovnem poteku proteinske aktivacije na sliki 38b.

Zaključimo lahko, da so za hitre odzive odgovorne velike vrednosti  $k_{\text{off}}$  in  $k_{\text{on}}$ , medtem ko mora biti za zagotavljanje dovolj velikega ojačanja (glej enačbo 5.4) izpolnjen še pogoj, da je aktivacijska konstanta  $k_{\text{on}}$  precej večja od deaktivacijske konstante  $k_{\text{off}}$  ( $k_{\text{on}} \gg k_{\text{off}}$ ). Ta pogoj izpostavlja problem zelo velikih vrednosti aktivacijskih konstant  $k_{\text{on}}$ , ki običajno presegajo fiziološke vrednosti (Falcke, 2004). V primeru manjših fizioloških vrednosti konstante  $k_{\text{on}}$  imamo torej slabo ojačanje, če želimo, da se pri ojačitvi signala ohranja pulzna oblika. V primeru velikega ojačanja pa dobimo precej popačeno obliko signala (glej sliko 38a). Ker je ta problem v primeru 1-stopenjske proteinske kaskade nerešljiv, si v nadaljevanju pogledjmo, kako bi ta problem rešili z  $N$ -stopenjsko proteinsko kaskado.

## Odziv večstopenjskega ojačevalnika

Podobno kot pri 1-stopenjskem ojačevalniku (glej enačbo 3) in ob upoštevanju enačbe 5.2b, tudi v primeru večstopenjskega ojačevalnika kot prvo zapišimo maksimalno stacionarno koncentracijo aktiviranih proteinov posamezne kaskadne stopnje:

$$z_{i,ss} \Big|_{x=x_{\max}} = \frac{z_{i-1,ss} \Big|_{x=x_{\max}}}{K + z_{i-1,ss} \Big|_{x=x_{\max}}} z_{\text{tot}}, \quad i = 1, 2, 3, \dots, N, \quad (5.8)$$

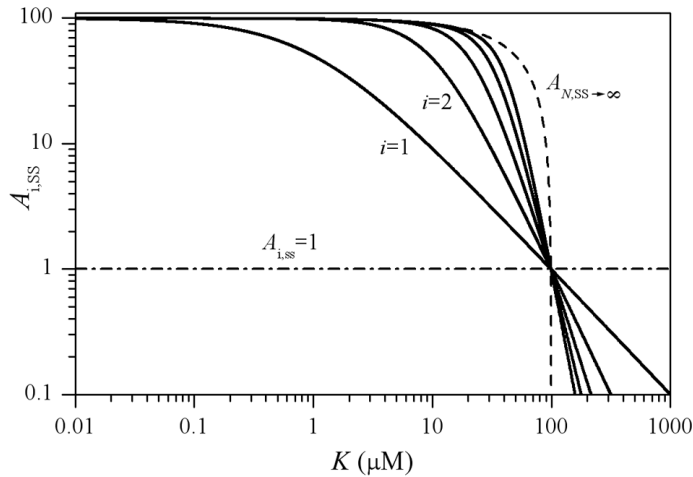
pri čemer je  $z_{0,ss} \Big|_{x=x_{\max}} = x_{\max}$ . Nadalje zapišimo maksimalno ojačanje signala  $x$ , pri  $i$ -ti kaskadni stopnji, kot (za izpeljavo glej dodatek B):

$$A_{i,ss} = \frac{A_{i-1,ss}}{K + A_{i-1,ss} x_{\max}} z_{\text{tot}}, \quad i = 1, 2, 3, \dots, N, \quad (5.9)$$

kjer je  $A_{0,ss} = 1$ . Podobno kot na sliki 37, si tudi v tem primeru pogledjmo, kako na ojačanje  $A_{i,ss}$  (enačba 5.9) vpliva disociacijska konstanta  $K$ . Na sliki 40 lahko vidimo potek ojačanja za prvih pet kaskadnih stopenj in maksimalno ojačanje ( $A_{N,ss \rightarrow \infty}$ , glej dodatek B):

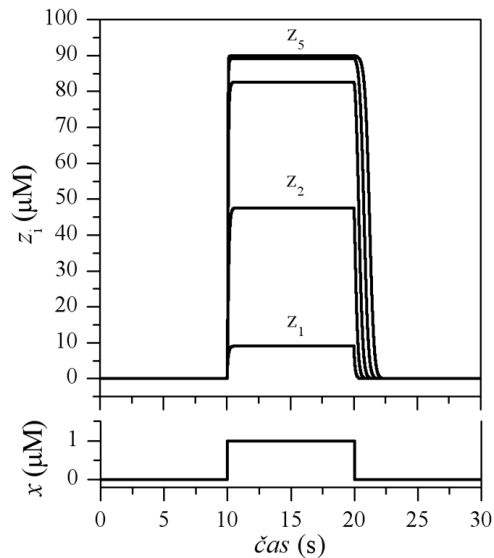
$$A_{N,ss \rightarrow \infty} = \frac{z_{\text{tot}} - K}{x_{\max}}, \quad (5.10)$$

ki ga lahko dosežemo, ko gre  $N \rightarrow \infty$ .



**Slika 40:** Ojačanje signala pri posamezni stopnji ( $A_{i,ss}$ ,  $i=1,2,\dots,N$ ) v odvisnosti od disociacijske konstante  $K$ . Vrednosti parametrov so:  $x_{\max} = 1 \mu\text{M}$ ,  $z_{\text{tot}} = 100 \mu\text{M}$ . Črtkana črta predstavlja maksimalno ojačanje  $A_{N,ss}$  ko gre  $N \rightarrow \infty$ .

S [slike 40](#) je razvidno, da je krivulja ojačanja pri  $i=1$  ( $A_{1,ss}$ ) identična krivulji ojačanja na [sliki 37](#). Z naraščanjem števila kaskad  $i$  pa dosežemo višja ojačanja pri dani vrednosti disociacijske konstante  $K$ , vse do maksimalnega ojačanja ( $A_{N,ss \rightarrow \infty}$ , [glej enačbo 5.10](#)). Z večanjem števila kaskad je torej mogoče doseči želeno ojačanje tudi pri višjih vrednostih konstante  $K$ , kar rešuje problem ojačevalnika z eno kaskadno stopnjo, ko je za doseganju želenega ojačanja moral biti izponjen pogoj  $k_{on} \gg k_{off}$ , da se je ohranjala pulzna oblika ojačanega signala. To potrjuje tudi [slika 41](#), kjer za doseganje dovolj velikih ojačanj s hitrimi odzivi, za razliko od rezultatov na [sliki 38b](#), ni potrebno zviševati aktivacijske konstante  $k_{on}$ , ampak to dosežemo z ustreznim številom kaskad  $N$ . V kolikor dobljene rezultate ([slika 41](#)) primerjamo še z rezultati na [sliki 38a](#), lahko vidimo, da s pomočjo kaskadne vezave dosegamo precej hitrejše odzive pri aktivaciji proteinov, kjer hitre odzive zagotavlja dovolj velika konstanta  $k_{off}$ , želeno ojačanje pa ustrezno število kaskad. S [slike 41](#) je z povečevanjem kaskadnih stopenj mogoče zaznati, pri deaktivaciji proteinov, tudi tako imenovan spominski efekt, ki smo ga podrobneje opisali v predhodnem poglavju ([glej sliko 29](#)). Kljub temu efektu pa ostaja deaktivacijski čas  $t_{off}$  mali ([enačba 5.6](#)), kar zagotavlja ohranjanje pulzne oblike ojačanega signala.



**Slika 41:** Časovni odziv ojačanega pulznega signala  $x$  za prvih pet kaskadnih stopenj ( $z_i$ ,  $i=1,2,\dots,5$ ).  $k_{on}=1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{off}=10 \text{s}^{-1}$ .

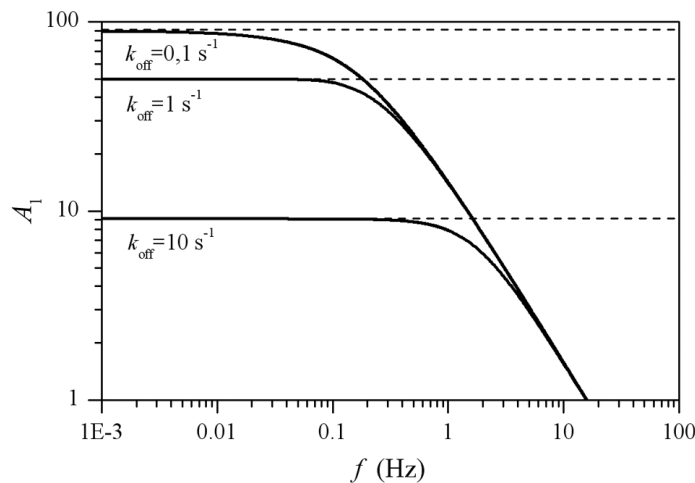
Do sedaj smo ohranjanje pulzne oblike ojačanega signala matematično ovrednotili z vklopno-izklopnima časoma  $t_{on}$  in  $t_{off}$ , ki določata hitrost aktivacije oziroma deaktivacije proteinov. Za natančnejšo analizo, s katero bi pojasnili mero, ki določa

ohranjanje pulzne oblike ojačanega signala, pa v nadaljevanju analizirajmo obravnavan proteinsko kaskadni ojačevalnik še z vidika frekvenčne karakteristike ojačevalnika.

## Amplitudno frekvenčna karakteristika celičnega ojačevalnika

Spoznali smo lahko, da je ojačanje celičnih signalov mogoče tako z 1-stopenjskimi kot z večstopenjskimi kaskadnimi ojačevalniki. S primerjavo rezultatov na [sliki 38a](#) in [sliki 41](#) lahko vidimo, da večstopenjski kaskadni ojačevalniki omogočajo hitrejši odzive in s tem ohranjanje oblike ojačanega pulznega signala. Da bi pojasnili mero, ki določa ohranjanje pulzne oblike ojačanega signala, si pogledjmo frekvenčno karakteristiko kaskadnega ojačevalnika. V splošnem je namreč znano, da lahko na podlagi prepuščenih frekvenc signalov, ki jih določa frekvenčna karakteristika ojačevalnika, določimo popačenost ojačanih signalov ([Theodore in sod. 2004](#)). To smo spoznali že v [poglavju 4.4](#) pri glajenju električnih signalov.

Kot prvo si pogledjmo amplitudno frekvenčno karakteristiko 1-stopenjskega proteinskega ojačevalnika, pri enakih vrednostih parametrov kot na [sliki 38a](#). Amplitudno frekvenčno karakteristiko, dobimo na enak način kot pri glajenju signalov, tako da za vhodni signal, ki ga vstavimo v [enačbo 5.2a](#), uporabimo sinusni signal različnih frekvenc ([glej enačbo 4.15](#)). Frekvenčno karakteristiko, prikazano na [sliki 42](#), dobimo z izrisom ojačanja signala  $A_1 = z_{1,\max}/x_{\max}$  v odvisnosti od frekvence.



**Slika 42:** Frekvenčna karakteristika 1-stopenjskega proteinskega ojačevalnika za tri različne vrednosti konstante  $k_{\text{off}}$ . Črtkane črte predstavljajo maksimalno ojačanje v stacionarnem stanju ( $A_{1,ss}$ , [enačba 5.4](#)), ko gre  $f \rightarrow 0$ . Vrednosti parametrov so enake kot na [sliki 38a](#).

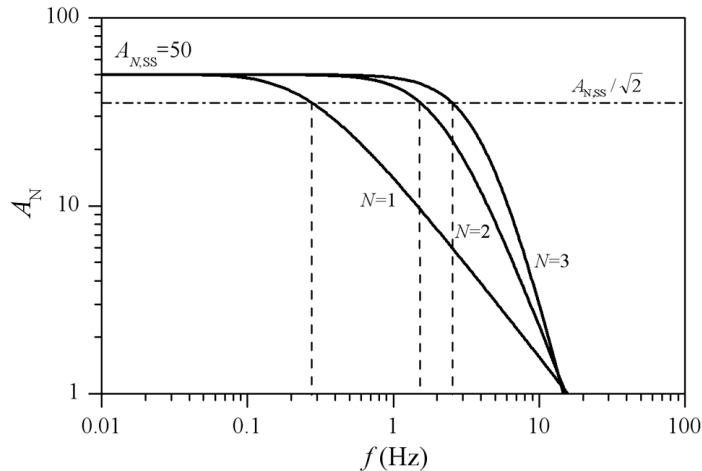
Kot smo lahko razbrali že s [slike 35](#), tudi rezultati na [sliki 42](#) kažejo, da ojačevalnik deluje kot nizko frekvenčni filter, kar pomeni, da ne prepušča signalov z

visokimi frekvencami. Posledica tega je, da je izhodni signal deformiran, kar pride še posebej do izraza pri neharmoničnih pulzih signalih, katerih oblika je pogojena s širokim frekvenčnim spektrom. Vidimo lahko, da se z manjšanjem konstante  $k_{\text{off}}$ , zmanjšuje tudi mejna frekvenca, pri kateri začne ojačanje signala  $A_1$  padati. Podobno smo lahko videli že na [sliki 35](#), pri konstantnem maksimalnem ojačanju  $A_{1,ss}$ . Za razliko od rezultatov na [sliki 35](#), se v tem primeru maksimalno ojačanje v stacionarnem stanju spreminja (glej črtkane črte na [sliki 42](#),  $f \rightarrow 0$ ), kar je pogojeno s konstantno vrednostjo  $k_{\text{on}}$ . To priča o tem, da je spreminjanje mejne frekvence amplitudno frekvenčne karakteristike odvisno predvsem od konstante  $k_{\text{off}}$ . Manjša je vrednost konstante  $k_{\text{off}}$ , manjša je mejna frekvenca in bolj je signal deformiran. To je tudi v skladu z deformirano obliko ojačanih signalov na [sliki 38a](#), kjer vidimo, da je signal z najmanjšo vrednostjo  $k_{\text{off}}=0,1 \text{ s}^{-1}$  najbolj deformiran.

Poglejmo si v nadaljevanju, kako se spremeni frekvenčna karakteristika večstopenjskega ojačevalnika v primerjavi z 1-stopenjskim ojačevalnikom z enakim ojačanjem. Kot primer izberimo 1-stopenjski ojačevalnik, prikazan na [sliki 42](#), katerega ojačanje  $A_{1,ss}=50$  ( $k_{\text{off}}=1 \text{ s}^{-1}$ ) in ga primerjamo z večstopenjskim ojačevalnikom, ki ima enako ojačanje. Frekvenčne karakteristike, prikazane na [sliki 43](#), prikazujejo ojačanja  $A_N = z_{N,\text{max}}/x_{\text{max}}$  ( $N=1,2,3$ ) v odvisnosti od frekvence  $f$ . Dobimo jih na enak način kot pri 1-stopenjskem ojačevalniku ([slika 42](#)). Pri tem velja poudariti, da moramo pri konstantni vrednosti  $k_{\text{on}}=1 \text{ } \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ustrezno modificirati vrednost konstante  $k_{\text{off}}$  (glej [enačbo 5.9](#)), če želimo pri ojačevalnikih z različnim številom kaskadnih stopenj  $N$  doseči enaka ojačanja ( $A_{1,ss}=50$ ). V našem primeru je  $k_{\text{off}} = 1 \text{ s}^{-1}$  za 1-stopenjski ojačevalnik,  $k_{\text{off}} = 9,51 \text{ s}^{-1}$  za 2-stopenjski ojačevalnik in  $k_{\text{off}} = 19,7 \text{ s}^{-1}$  za 3-stopenjski ojačevalnik.

S [slike 43](#) lahko razberemo, da z naraščanjem števila kaskadnih stopenj  $N$ , narašča mejna frekvenca, pri kateri začne amplituda ojačanja strmo padati. To pomeni, da ojačevalnik z večjim številom kaskadnih stopenj  $N$  in enakim ojačanjem  $A_{N,ss}$ , prepušča širši frekvenčni spekter, kar pripomore k manjši deformiranosti ojačanih pulzih signalov. Frekvenčna karakteristika, prikazana na [sliki 43](#), torej kaže, da imajo proteinske kaskade pomembno vlogo pri ojačitvi neharmoničnih pulzih signalov, katerih oblika je pogojena s širokim frekvenčnim spektrom.

Takšna vloga kaskad pa je v smislu večstopenjskih ojačevalnikov dobro znana v električnih sistemih. Zato si bomo v nadaljevanju nekoliko podrobneje pogledali primerjavo med ojačitvijo celičnih signalov s proteinskimi kaskadami in ojačitvijo električnih signalov z večstopenjskimi ojačevalniki.



**Slika 43:** Frekvenčna karakteristika  $N$ -stopenjskega ojačevalnika ( $N=1,2,3$ ). Konstanta  $k_{\text{off}} = 1\text{s}^{-1}$  za  $N=1$ ,  $k_{\text{off}} = 9,51\text{s}^{-1}$  za  $N=2$  in  $k_{\text{off}} = 19,7\text{s}^{-1}$  za  $N=3$ .  $k_{\text{on}} = 1\ \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Črtkane črte predstavljajo mejno frekvenco prepustnega pasu ojačevalnika.

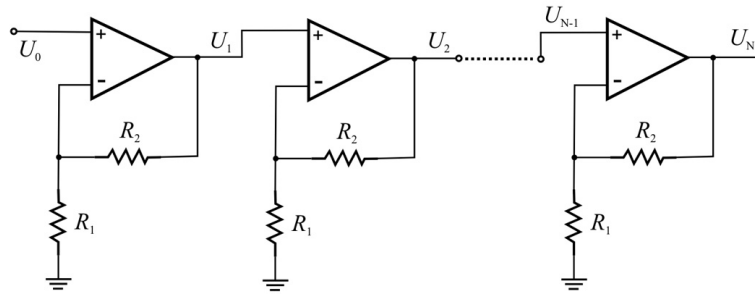
## 5.4 Ojačitve električnih signalov

Z ojačitvijo neharmoničnih signalov se srečujemo tudi na področju elektronike, kjer prav tako uporabljamo ojačevalnike povezane v kaskade. Zato si v nadaljevanju pogledimo ojačitve električnih signalov z večstopenjskimi operacijskimi ojačevalniki, katerih delovanje bomo primerjali s proteinskimi kaskadami. Namen primerjave med biološkimi in električnimi ojačevalniki je v iskanju splošne vloge kaskadnih mehanizmov pri ojačitvi signalov.

V elektrotehniki uporabljamo za ojačitve signalov razne aktivne elektronske elemente kot je na primer bipolarni tranzistor prikazan na [sliki 4b](#). Danes te aktivne elemente običajno povezujemo med seboj v razne ojačevalnike, s katerimi lahko dosegamo večja in kvalitetnejša ojačanja. Zelo uporabna medsebojna povezava aktivnih elementov je poznana pod imenom diferenčni ojačevalnik. Ta je poleg ostalih ojačevalnih stopenj za prilagoditev napetostnih nivojev in vhodno-izhodnih impedanc sestavni del vsakega operacijskega ojačevalnika, ki je danes skoraj nepogrešljiv element analognih elektronskih vezij. Zato bomo tudi mi, pri proučevanju vloge kaskadnih mehanizmov, uporabili operacijske ojačevalnike, ki jih bomo povezali v kaskade.

[Slika 44](#) prikazuje primer neinvertirajočih operacijskih ojačevalnikov povezanih v kaskado. Pri tem je  $U_0$  vhodna napetost,  $U_1, U_2, \dots, U_N$  pa napetosti ojačanega izhodnega signala posamezne kaskadne stopnje. Upora  $R_1$  in  $R_2$  določata ojačanje posamezne stopnje, kar bomo podrobneje spoznali v nadaljevanju.



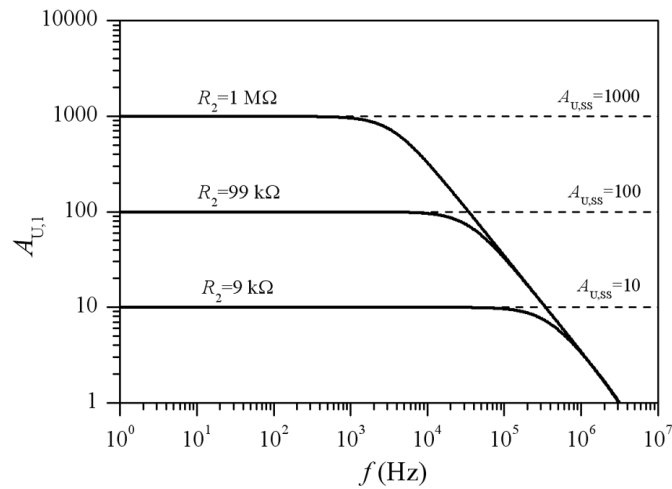


**Slika 44:** Neinvertirajoči operacijski ojačevalniki povezani v kaskado. Ojačanje posamezne stopnje je določeno z uporoma  $R_1$  in  $R_2$ .

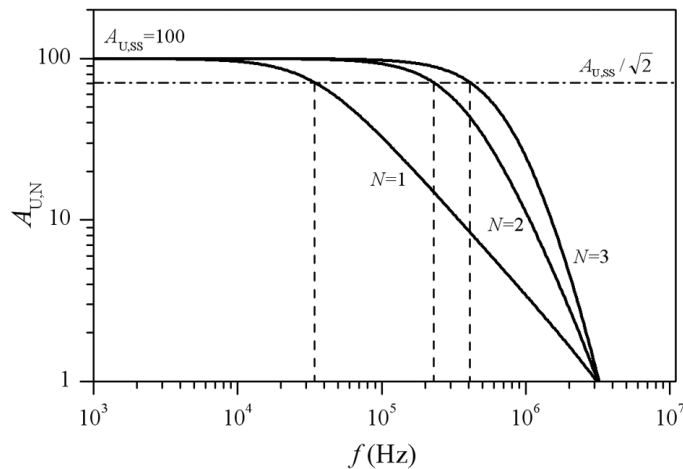
Podobno kot pri ojačanju bioloških signalov, tudi sedaj kot prvo proučimo ojačanje električnih signalov z eno kaskadno stopnjo. Kot primer vzemimo operacijski ojačevalnik TL082 in proučimo njegovo frekvenčno karakteristiko za različne stopnje ojačanja. Frekvenčno karakteristiko dobimo s pomočjo eksperimenta, ki ga izvedemo z računalniškim programom »Electronics Workbench – Multisim 9« (Adams 2001). Rezultati so prikazani na [sliki 45](#), kjer prikazujemo ojačanje 1-stopenjskega ojačevalnika ( $A_{U,1}=U_1/U_0$ ) v odvisnosti od frekvence vhodnega signala (glej [enačbo 4.12](#)). Simulacija je narejena za tri različne upornosti upora  $R_2$ , pri konstantni upornosti upora  $R_1=1\text{ k}\Omega$ . Iz rezultatov lahko vidimo, da s povečevanjem upornosti  $R_2$ , povečujemo tudi maksimalno ojačanje v stacionarnem stanju (glej [črtkane črte na sliki 45](#)). Vendar se s tem zmanjšuje mejna frekvenca ojačevalnika, ki jo je ojačevalnik še sposoben prepuščati. Popolnoma enake rezultate smo dobili v primeru biološkega ojačevalnika na [sliki 42](#), kjer je zmanjšanje deaktivacijske konstante  $k_{\text{off}}$ , privedlo do večjega ojačanja in hkrati do manjše frekvenčne propustnosti ojačevalnika.

Nadalje simulirajmo ojačanje električnih signalov še z večstopenjskim ojačevalnikom. Kot primer ponovno uporabimo operacijske ojačevalnike TL082, ki jih vežemo v kaskado ([slika 44](#)), pri čemer želimo, da je skupno ojačanje v stacionarnem stanju konstantno ( $A_{U,ss}=100$ ) ne glede na število kaskadnih stopenj  $N$ . To zahteva, da se s spreminjanjem kaskadnih stopenj, spreminja ojačanje posamezne stopnje in s tem upornost upora  $R_2$ , pri konstantni upornosti upora  $R_1=1\text{ k}\Omega$ . V našem primeru je  $R_2=99\text{ k}\Omega$  za 1-stopenjski ojačevalnik,  $R_2=9\text{ k}\Omega$  za 2-stopenjski ojačevalnik in  $R_2=3,36\text{ k}\Omega$  za 3-stopenjski ojačevalnik. Rezultati prikazani na [sliki 46](#) kažejo, da lahko frekvenčno karakteristiko 1-stopenjskega ojačevalnika znatno izboljšamo s povezavo večjega števila ojačevalnikov v kaskado. O tem priča mejna frekvenca ojačevalnika, ki se povečuje s številom kaskadnih stopenj. Zelo podobne rezultate smo dobili tudi pri

biološkem ojačevalniku (slika 43), kjer se je z večanjem kaskadnih stopenj mejna frekvenca ojačevalnika prav tako povečevala.



**Slika 45:** Amplitudno frekvenčna karakteristika 1-stopenjskega operacijskega ojačevalnika TL082 s povratno vezavo za tri različne upornosti upora  $R_2$ , pri konstantni upornosti upora  $R_1 = 1 \text{ k}\Omega$ . Črtkane črte predstavljajo maksimalno ojačanje v stacionarnem stanju  $A_{U,ss}$ .



**Slika 46:** Amplitudno frekvenčna karakteristika večstopenjskega ojačevalnika z različnim številom kaskadnih stopenj ( $N=1,2,3$ ). Črtkane črte predstavljajo mejno frekvenco prepustnega pasu.  $R_1 = 1 \text{ k}\Omega$ ,  $R_2 = 99 \text{ k}\Omega$  za 1-stopenjski ojačevalnik,  $R_2 = 9 \text{ k}\Omega$  za 2-stopenjski ojačevalnik in  $R_2 = 3,36 \text{ k}\Omega$  za 3-stopenjski ojačevalnik.

S primerjavo rezultatov na sliki 46 in 43 lahko torej zaključimo, da imajo tudi biološki večstopenjski ojačevalniki, enako kot električni, v primerjavi z 1-stopenjskimi določene prednosti. Pri enaki končni ojačitvi namreč omogočajo večjo frekvenčno

prepustnost. To pomeni, da pri dani stopnji ojačanja, večstopenjski ojačevalniki v veliko boljši meri ohranjajo obliko ojačanih signalov, kar velja še posebej za neharmonične pulzne signale, katerih oblika je pogojena s širokim frekvenčnim območjem.

Da bi bolje razumeli primerjavo med biološkimi in električnimi ojačevalniki, pa si v nadaljevanju pogledjmo njihovo primerjavo še z opisom matematičnega modela.

## 5.5 Rezultati s primerjavo bioloških in tehniških sistemov

Ojačitev bioloških in električnih signalov z večstopenjskimi kaskadnimi ojačevalniki smo med seboj primerjali že z rezultati amplitudno frekvenčne karakteristike prikazane na sliki 43 in 46. Rezultati so pokazali, da imajo tudi v bioloških sistemih, podobno kot v električnih, kaskade pomembno vlogo pri zagotavljanju učinkovitih ojačanj signalov, pri čemer so zagotovljeni hitri in zanesljivi odzivi sistema.

Za podrobnejšo analizo kaskadnih mehanizmov ojačanja v bioloških sistemih, si v nadaljevanju podrobneje pogledjmo skupne karakteristike bioloških in električnih kaskadnih ojačevalnikov še s pomočjo enačb. S tega vidika moramo zgraditi ustrezen matematičen model, ki bo opisoval rezultate prikazane na sliki 45 in 46. Izhajamo iz 1-stopenjskega operacijskega ojačevalnika s povratno vezavo, katerega frekvenčna karakteristika, prikazana na sliki 45, je v elektrotehniški dobro poznana (Theodore in sod. 2004) in jo lahko zapišemo v kompleksni obliki kot:

$$A_{U,1}(\omega) = \frac{A_{U,SS}}{1 + \frac{j\omega}{\omega_c}}, \quad (5.11)$$

pri čemer je  $\omega_c$  mejna frekvenca ojačevalnika, pri kateri začne amplituda  $A_{u,1}(\omega)$  strmo padati, oziroma doseže vrednost  $A_{U,SS}/\sqrt{2}$ .  $A_{U,SS}$  je maksimalno ojačanje v stacionarnem stanju ( $\omega \rightarrow 0$ ), ki je določeno z uporoma  $R_1$  in  $R_2$  v povratni vezavi (glej sliko 44) in znaša:

$$A_{U,SS} = 1 + \frac{R_2}{R_1}. \quad (5.12)$$

Maksimalno ojačanje  $A_{U,SS}$  vpliva tudi na velikost mejne frekvence (glej enačbo 15, dodatek B), kar je razvidno tudi iz slike 45, kjer lahko vidimo, da se z zmanjševanjem ojačanja  $A_{U,SS}$  mejna frekvenca povečuje. V kolikor nadalje v enačbi (5.11) izvedemo Laplaceovo transformacijo (glej dodatek B) in upoštevamo, da je  $A_{U,1} = U_1/U_0$ , dobimo zapis v časovnem prostoru v obliki diferencialne enačbe (5.13a), ki opisuje časovno spreminjanje izhodne napetosti  $U_1(t)$  v odvisnosti od časovnega poteka vhodnega

signala  $U_0(t)$ . V primeru kaskadne vezave operacijskih ojačevalnikov (slika 44), lahko nadalje zapišemo tudi sistem diferencialnih enačb:

$$\frac{dU_1}{dt} = \omega_c A_{U,SS} U_0 - \omega_c U_1, \quad (5.13a)$$

$$\frac{dU_i}{dt} = \omega_c A_{U,SS} U_{i-1} - \omega_c U_i, \quad i = 1, 2, 3, \dots, N. \quad (5.13b)$$

S tem smo dobili matematični model, ki opisuje časovni potek ojačanega signala  $U_i(t)$  v posamezni kaskadni stopnji ( $i = 1, 2, 3, \dots, N$ ).

Nadalje primerjajmo dobljen matematični model kaskadne vezave operacijskih ojačevalnikov z matematičnim modelom proteinske kaskade (enačba 5.2). Ker želimo primerjati linearen model električnega ojačevalnika in nelinearen model biološkega ojačevalnika, kot prvo linearizirajmo model proteinskih kaskad. Linearizacija je upravičena pri nizkih koncentracijah aktiviranih proteinov v primerjavi z njihovimi totalnimi koncentracijami  $z_i \ll z_{tot}$ . Takšen model je bil pri proučevanju kaskadnih mehanizmov v preteklosti tudi že večkrat uporabljen (Heinrich in sod. 2002, Chaves in sod. 2004, Nakabayashi in Sasaki 2005, Detwiler in sod. 2000). Z linearizacijo matematičnega modela, opisanega z enačbo 5.2, dobimo:

$$\frac{dz_1}{dt} = k_{off} \frac{z_{tot}}{K} x - k_{off} z_1, \quad (5.14a)$$

$$\frac{dz_i}{dt} = k_{off} \frac{z_{tot}}{K} z_{i-1} - k_{off} z_i. \quad i = 1, 2, 3, \dots, N. \quad (5.14b)$$

S primerjavo dobljenih diferencialnih enačb (enačbe 5.13 in 5.14), lahko vidimo popolno analogijo med električnim in biološkim ojačevalnikom. Maksimalno stacionarno ojačanje  $z_{tot}/K$  pri kaskadnem ciklu proteinske aktivacije lahko direktno primerjamo z maksimalnim stacionarnim ojačanjem operacijskega ojačevalnika  $A_{U,SS}$  (enačba 5.12). Med seboj lahko primerjamo tudi deaktivacijsko konstanto  $k_{off}$  in mejno frekvenco  $\omega_c$ . Enako kot mejna frekvenca  $\omega_c$  določa širino frekvenčne prepustnosti pri električnem ojačevalniku, konstanta  $k_{off}$  določa širino frekvenčne prepustnosti biološkega ojačevalnika, kar smo lahko razbrali tudi iz rezultatov prikazanih na slikah 42 in 43.

Zaključimo torej lahko, da za ojačanje neharmoničnih pulzних  $Ca^{2+}$  signalov (glej poglavje 2.2), ki so pogojeni s široko frekvenčno prepustnostjo, dejansko potrebujemo čim večje vrednosti deaktivacijske konstante  $k_{off}$ , če želimo, da se pri ojačanju ohranja pulzna oblika. Ohranjanje pulzne oblike ojačanega signala lahko razumemo tudi kot prenos večje kapacitete informacij v enoti časa. Torej lahko konstanto  $k_{off}$  razumemo tudi kot mero, ki določa, koliko informacij se pri aktivaciji proteinov lahko prenese oziroma ohrani na enoto časa. Po drugi strani pa velike vrednosti deaktivacijske konstante  $k_{off}$  onemogočajo velika ojačanja. V našem primeru to uspešno rešujemo z

večstopenjsko proteinsko kaskado (MAPK), ki zagotavlja zadostno skupno ojačanje, ki je enako produktu ojačanj posameznih kaskadnih stopenj.

## **6 ZAKLJUČEK**

V doktorskem delu smo se ukvarjali s teoretično obravnavo znotrajcelične signalizacije, pri čemer smo proučevali vlogo proteinskih kaskad pri prenosu pulzno oscilirajočih signalov, katerih primer so znotrajcelične  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacije, ki igrajo ključno vlogo pri prenosu signalov. Glede na specifično funkcijo različnih celic se prisotnost  $\text{Ca}^{2+}$  ionov namreč odraža v regulaciji številnih pomembnih celičnih funkcij. Sodeluje na primer pri celični oploditvi, regulaciji metabolizma, kontrakciji mišičnih celic, sekreciji, eksocitozi, kemotaksi, staranju in apoptozi. Naš namen ni bil podrobneje proučevati dinamiko kalcijevih oscilacij, za katere je znano, da omogočajo kodacijo informacije v frekvenci in obliki  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacij, ampak smo proučevali prenos teh signalov preko kaskadnih ciklov proteinske aktivacije. Znano je namreč, da povečana koncentracija prostih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov lahko povzroči aktivacijo proteinskih kaskad, kot je mitogeno aktivirana protein kinazna kaskada (MAPK). Prenos signala preko MAPK kaskade pa lahko nadalje na primer povzroči ustrezen odziv celice v smislu regulacije ustreznih prepisovalnih faktorjev, ki vplivajo na ekspresijo genov.

Pri prenosu signala preko MAPK kaskadne poti smo se omejili na matematični model, ki obravnava linearno povezovanje posameznih ciklov proteinske aktivacije v kaskade. Naš namen namreč ni bil proučevati kompleksen in celovit matematični model MAPK signalne poti, ampak je bila naša težnja iskanje minimalnega modela, ki še zadovoljivo opisuje pomen kaskadnih ciklov pri prenosu signalov. Linearno povezovanje kaskadnih ciklov proteinske aktivacije je bilo pri proučevanju fizioloških pomenov proteinskih kaskad do sedaj že večkrat uporabljeno in dovolj dobro opisuje prenos signala od stimula preko posameznih kaskadnih ciklov do končnega odziva celice.

V osrednjem delu doktorske disertacije smo kot izviren prispevek prikazali vlogo proteinskih kaskad pri glajenju pulzno oscilirajočih  $\text{Ca}^{2+}$  signalov. Iskali smo mehanizem, ki omogoča glajenje signalov v smislu konstantne aktivacije proteinov, hkrati pa zagotavlja hitre vklopno-izklopne karakteristike glede na časovno omejeno delovanje pulzno oscilirajočih  $\text{Ca}^{2+}$  signalov. Hitra vklopno-izklopna karakteristika je namreč glavna značilnost posameznega kaskadnega cikla proteinske aktivacije, ki deluje kot občutljivo (ultrasenzitivno) biološko stikalo. Rezultati raziskav na tem področju so potrdili uvodoma zastavljene teze in privedli do naslednjih ugotovitev:

- Počasna deaktivacija aktiviranih proteinov enega kaskadnega cikla proteinske aktivacije omogoča konstantno aktivacijo proteinov tudi pri pulzno oscilirajočem

delovanju stimula. Pri tem so onemogočeni kratki odzivni časi aktivacije in deaktivacije proteinov glede na časovno omejeno delovanje stimula. Izkaže se, da je problem predvsem v dolgem deaktivacijskem času  $t_{\text{off}}$ . To je pogojeno s počasno deaktivacijo proteinov oziroma nizko vrednostjo deaktivacijske konstante  $k_{\text{off}}$ , ki je potrebna za doseganje zadovoljive gladkosti signala.

- Z vezavo proteinov v kaskade je omogočena konstantna aktivacija proteinov tudi pri hitrejši deaktivaciji posameznega kaskadnega cikla proteinske aktivacije. Izkaže se, da v primeru proteinskih kaskad lahko dosežemo enako gladkost signala tudi pri višjih vrednostih deaktivacijske konstante  $k_{\text{off}}$  kot pri enem kaskadnem ciklu proteinske aktivacije. To ima za posledico, da že malo število proteinskih kaskad omogoča konstantno aktivacijo proteinov s kratkim odzivnim časom glede na časovno omejeno oscilirajoče delovanje stimula. Kratke odzivne čase zagotavljajo dovolj velike vrednosti konstant  $k_{\text{on}}$  in  $k_{\text{off}}$ , vrednosti katerih so obratno sorazmerne odzivnim časom.
- Pri vezavi večjega števila proteinov v kaskade se pojavi časovna zakasnitev deaktivacije proteinov glede na prenehanje delovanja stimula. Izkaže se, da spominski efekt narašča s številom kaskadnih stopenj. Za spominski čas  $t_m$ , ki smo ga definirali kot čas med zadnjim kalcijevim pulzom in zmanjšanjem koncentracije aktiviranih proteinov na 90 % maksimalne vrednosti, smo pokazali, da skoraj linearno narašča v odvisnosti od števila kaskadnih stopenj  $N$ , pri čemer je porast v posamezni kaskadni stopnji odvisna od deaktivacijske konstante  $k_{\text{off}}$ . Prednost spominskega efekta bi lahko bila, da relativno kratko delovanje časovno omejenih  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacij omogoča dolgotrajne aktivacije proteinov in s tem dolgotrajno delovanje celičnih procesov. S tem je zahtevana le majhna količina prenesenega kalcija znotraj celice, kar bi lahko imelo pomembno fiziološko prednost v smislu zmanjševanja energijske porabe pri učinkovitem prenosu signala.

Kot drug izviren prispevek, ki smo ga predstavili v doktorskem delu, je vloga proteinskih kaskad pri ojačitvi pulzno oscilirajočih signalov. Pri tem želimo, da se čim bolj ohranja pulzna oblika ojačanega signala, kar omogoča takojšnjo aktivacijo in deaktivacijo proteinov v smislu sledenja porasta in padanja koncentracije kalcija v znotrajceličnem prostoru. Ohranjanje pulzne oblike ojačanega signala lahko razumemo tudi kot zmožnost širokega frekvenčnega prepuščanja ojačevalnikov. Široka frekvenčna prepustnost je pomembna predvsem z vidika frekvenčne kodiranosti signalov, ki je na primer poznana pri  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacijah. Rezultati na tem področju so privedli do naslednjih ugotovitev:

- Kaskadni cikel proteinske aktivacije lahko deluje kot ojačevalec signalov, pri čemer je ojačanje signala v stacionarnem stanju odvisno od totalne koncentracije

aktiviranih proteinov  $z_{\text{tot}}$  in disociacijske konstante  $K=k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ . Rezultati kažejo, da mora biti za zagotavljanje dovolj velikega ojačanja konstanta  $k_{\text{on}}$  precej večja od deaktivacijske konstante  $k_{\text{off}}$  ( $k_{\text{on}} \gg k_{\text{off}}$ ). Za doseganje hitrih odzivov pa mora biti tudi vrednost deaktivacijske konstante  $k_{\text{off}}$  dovolj velika. Ta dva pogoja izpostavljata problem zelo velikih vrednosti aktivacijskih konstant  $k_{\text{on}}$ , ki običajno presegajo fiziološke vrednosti. Za en kaskadni cikel proteinske aktivacije je torej značilno, da imamo v primeru velikih ojačanj popačeno pulzno obliko ojačanega signala, v primeru zagotavljanja pulzne oblike ojačanega signala, pa ne moremo zagotoviti velikih ojačanj.

- Z večanjem števila kaskad je mogoče doseči želeno ojačanje tudi pri višjih vrednostih konstante  $K=k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  v primerjavi z enim kaskadnim ciklom. To priča o tem, da lahko s pomočjo kaskadne vezave proteinov dosegamo precej hitrejše odzive pri aktivaciji proteinov tudi pri višjih ojačitvah signalov. Hitre odzive zagotavlja dovolj velika konstanta  $k_{\text{off}}$ , želeno ojačanje pa ustrezno število kaskadnih ciklov  $N$ .

V okviru rezultatov velja še omeniti, da zaradi enostavnosti in iskanja osnovnih mehanizmov, ki zagotavljajo glajenje in ojačitev signalov s kratkimi odzivnimi časi, pri izračunih nismo upoštevali kooperativne vezave  $\text{Ca}^{2+}$  ionov pri aktivaciji proteinskih kinaz. Kooperativna vezava je v nekaterih primerih proteinske aktivacije sicer prisotna, vendar bi izračuni v tem primeru le še dodatno izboljšali naše rezultate v smislu še hitrejših odzivov. Kot primer takšne kooperativne vezave omenimo od  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  odvisno kalmodulin kinazo II (CaMKII), ki lahko nadalje vpliva na kontrakcijo gladkih mišičnih celic (De Koninck and Schulman 1998, Dupont in sod. 2003, Somlyo 2003).

V doktorskem delu smo poleg rezultatov, ki prikazujejo glajenje in ojačitev signalov pri znotrajcelični signalizaciji, predstavili tudi analogije s tehničnimi sistemi, kjer ne iščemo novih sistemov, temveč želimo poiskati skupno vlogo kaskadnih mehanizmov v bioloških sistemih in električnih vezjih. Cilj te analogije je boljše razumevanje bioloških sistemov oziroma proteinskih kaskad, saj so nam mehanizmi glajenja in ojačanja signalov v elektrotehniko danes že dobro znani. Rezultati na tem področju so podani s pomočjo amplitudno frekvenčne karakteristike, ki za razliko od časovnih potekov omogoča nov vpogled v lastnosti proteinskih kaskad in se na področju prenosa električnih signalov pogosto uporablja. Pri glajenju signalov smo na podlagi amplitudno frekvenčne karakteristike prišli do naslednjih ugotovitev:

- Amplitudno frekvenčna karakteristika kaskadnega cikla proteinske aktivacije kaže odvisnost nizkoprepustnega sira, ki ga lahko primerjamo z RC-členom v električnih vezjih. Rezultati kažejo, da obstaja analogija med glajenjem celičnih

signalov s kaskadnim ciklom proteinske aktivacije in aktivnim 1-stopenjskim nizkoprepustnim sitom z RC-členom.

- V primeru kaskadne vezave se pokaže analogija pri glajenju celičnih signalov s proteinskimi kaskadami in glajenju električnih signalov z večstopenjskim nizkoprepustnim sitom. V obeh primerih je kaskadna vezava tista, ki omogoča, da lahko imamo pri isti stopnji ojačanja strmejšo padanje amplitudno frekvenčne karakteristike v zapornem območju, pri čemer se mejna frekvenca bistveno ne spremeni. To omogoča učinkovitejšo glajenje in ne povzroča povečanja odzivnih časov.
- Med konstantama  $k_{\text{off}}$  in  $1/RC$  je mogoče vzpostaviti popolno analogijo glede njihnih vlog pri glajenju signalov. Konstanta  $k_{\text{off}}$  določa mejno frekvenco amplitudne frekvenčne karakteristike proteinskih kaskad, konstanta  $1/RC$  pa mejno frekvenco nizkoprepustnih sit v električnih vezjih. S tem sta ravno ti dve konstanti odgovorni za časovne odzive pri glajenju bioloških oziroma električnih signalov.

Rezultati amplitudno frekvenčne karakteristike so pokazali analogije tudi na področju ojačitve signalov. V težnji po ohranitvi pulzne oblike ojačanega signala smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- Povečanje ojačanja v kaskadni stopnji proteinske aktivacije na račun zmanjšanja konstante  $k_{\text{off}}$  privede do manjše frekvenčne prepustnosti ojačevalnika in s tem do večje popačenosti neharmoničnih pulznih signalov, katerih oblika je pogojena s širokim frekvenčnim spektrom. Frekvenčna karakteristika kaskadnega cikla proteinske aktivacije kaže popolno analogijo s frekvenčno karakteristiko operacijskega ojačevalnika. Analogija se kaže z zmanjševanjem upornosti upora  $R_2$  v povratni vezavi operacijskega ojačevalnika, ki privede do večjega ojačanja in hkrati do manjše mejne frekvence, ki določa prepustnost ojačevalnika v frekvenčnem območju.
- Kaskadna vezava proteinov, kot je MAPK, omogoča ojačitev signala v širšem frekvenčnem območju kot ojačitev signala z eno kaskadno stopnjo pri enaki ojačitvi. S tem je omogočeno boljše ohranjanje oblike signala pri ojačitvi pulznih neharmoničnih signalov. Frekvenčna karakteristika kaže popolno analogijo z večstopenjskim operacijskim ojačevalnikom, pri katerem imajo kaskade pri ojačitvi signala enako vlogo.
- Matematičen model večstopenjskega operacijskega ojačevalnika kaže popolno analogijo z lineariziranim modelom proteinskih kaskad, katerega uporaba je opravičena pri nizki koncentraciji aktiviranih proteinov v primerjavi z njihovo totalno aktivacijo. Takšen model je bil pri proučevanju fiziološkega pomena kaskadnih mehanizmov v preteklosti že večkrat uporabljen. Model kaže popolno analogijo med maksimalnim stacionarnim ojačanjem kaskadnega cikla proteinske



aktivacije  $z_{tot}/K$  in maksimalnim stacionarnim ojačanjem operacijskega ojačevalnika  $A_{U,SS}$ . Med seboj lahko direktno primerjamo tudi deaktivacijsko konstanto  $k_{off}$  in mejno frekvenco operacijskega ojačevalnika, saj konstanta  $k_{off}$  določa širino frekvenčne prepustnosti biološkega ojačevalnika.

Prikazane analogije med biološkimi in električnimi sistemi so bile narejene v smislu razumevanja kaskadnih mehanizmov bioloških sistemov, saj so nam kaskadni mehanizmi pri glajenju in ojačitvi signalov v elektrotehniko dobro poznani. Poleg omenjenih kaskadnih mehanizmov, ojačevalnikov, nizkoprepustnih sit, so nam v elektrotehniko dobro poznani tudi razni oscilatorji, selektivno prepustna sita, pozitivne in negativne povratne vezave, razni pretvorniki, usmerniki, stikala, zakasnitveni členi in drugo. Te osnovne mehanizme signalizacije je mogoče zaslediti tudi v bioloških sistemih, bodisi da gre za znotrajcelično signalizacijo ali signalizacijo med posameznimi deli organizma. S tem se nam odpirajo nove možnosti proučevanja primerjav med prenosom signalov v električnih vezjih in bioloških sistemih, ki bi pripomogle k boljšemu razumevanju regulacijskih mehanizmov pri prenosu signalov. Tako je mogoče tudi pri proučevanju bioloških sistemov s pridom uporabiti številna spoznanja s področja teorije regulacij, na kateri temelji obravnava tehničnih sistemov. Čeprav so biološki sistemi običajno veliko bolj kompleksni in vsebujejo precej več komponent, medsebojnih povezav ter načinov regulacije, so osnovni regulacijski mehanizmi enaki in jih lahko med seboj primerjamo. S tem se nam ne odpirajo samo možnosti primerjav že obstoječih mehanizmov, ampak je tudi težnja po prenašanju uspešnih bioloških mehanizmov, ki so se razvili z evolucijo, v tehnične sisteme.

Razvoj v tej smeri narekuje tudi potreba po modifikaciji bioloških regulacij s tehničnimi sistemi. V primeru nepravilnega delovanja je namreč večkrat potrebno na naravne regulacije vplivati tudi s tehničnimi metodami. Napake v bioloških regulacijah običajno popravljamo biokemično z uporabo različnih zdravil, v nekaterih primerih, kjer uporaba zdravil ne zadošča za usposobitev in pravilno delovanje, pa je potrebna tudi modifikacija s tehničnimi sistemi. Kot primer omenimo srčni spodbujevalnik, katerega uporaba je precej razširjena.

Vsi naštetih primeri kažejo na precejšnjo aktualnost področja in dajejo širok spekter možnosti nadaljnjih raziskav. Tako se na primer nadalje kažejo možnosti primerjave delovanja bioloških ojačevalnikov z logaritemskimi ojačevalniki električnih signalov pri proučevanju pomena nelinearnosti, primerjava frekvenčne kodacije in dekodacije pri prenosu signalov v bioloških in tehničnih sistemih ter številne aplikacije osnovnih elementov digitalne tehnike na mehanizme delovanja celične signalizacije. Proučevanje teh primerov je tudi glavna vizija našega nadaljnjega dela.



---

## LITERATURA

- Adams J. (2001) *Mastering Electronics Workbench* (McGraw-Hill, 1st edn. 2001).
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. in Watson J.D. (1994) *Molecular biology of the cell*, 3<sup>rd</sup> Ed., Garland Publishing, Inc., New York & London.
- Alves R. in Savageau M.A. (2003) Comparative analysis of prototype two-component systems with either bifunctional or monofunctional sensors: differences in molecular structure and physiological function, *Mol. Microbiol.*, 48: 25-51.
- Arkin A.P. (2000) *Signal processing by biochemical reaction networks*. In: Walleczek, J., (Eds.), *Self-Organized Biodynamics and Nonlinear Control*. Cambridge University Press: 112-144.
- Babič R. (2003) Aktivna električna sira (Fakulteta za elektrotehniko, računalništvo in informatiko, Maribor 2003).
- Balaji S. in Lakshminarayanan S. (2004) Conceptual comparison of metabolic pathways with electronic circuits, *Journal of Bionics Engineering*, 1, pp. 175-182
- Bagowski C.P., Besser J., Frey C.R., Ferrell Jr. J.E. (2003) The JNK cascade as a biochemical switch in mammalian cells: ultrasensitive and all-or-none responses. *Curr. Biol.* 13: 315–320.
- Bagowski C.P., Ferrell Jr. J.E. (2001) Bistability in the JNK cascade. *Curr. Biol.* 11: 1176–1182.
- Berridge M.J. (1997) Annual review prize lecture: Elementary and global aspects of calcium signalling. *J. Physiol.* 499: 291-306.
- Berridge M.J. (1989) Cell signalling through cytoplasmic calcium oscillations. In: Goldbeter A (Ed.) *Cell to Cell Signalling: From Experiments to Theoretical Models*. Academic Press, London: 449-459.
- Bezprozvanny I., Watras J. in Ehrlich, B.E. (1991) Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum, *Nature* 351: 751-754.
- Brightman F.A. in Fell D.A. (2000) Differential feedback regulation of the mapk cascade underlies the quantitative differences in egf and ngf signaling in pc12 cells. *FEBS Lett.* 482: 169–174.
- Campbell A.K. (1983) *Intracellular calcium; its universal role as regulator*. John Willey & Sons Ltd., New York.
- Chaves M., Sontag E.D. in Dinerstein R.J. (2004) Optimal length an signal amplification in weakly activated signal transduction cascades, *J. Phys. Chem. B*, 108: 15311-15320.
- Chiam K.H., Bhargava V. in Rajagopal G. (2005) Oscillatory dynamics in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Computational Systems Bioinformatics Conference, Stanford, California, Aug. 2005*: 164-165.

- Chock P.B., Rhee S.G. in Stadtman E.R. (1980) Interconvertible enzyme cascades in cellular regulation, *Annu. Rev. Biochem.*, 49: 813-843.
- Cuthbertson K.S.R. in Cobbold P.H. (1985) Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in cell. *Nature* 316: 541-542.
- Cuthbertson K.S.R. (1989) Intracellular calcium oscillations. In: Goldbeter A (Ed.) Cell to cell signalling: From experiments to theoretical models. Academic Press, London: 435-447.
- De Koninck P., Schulman H. (1998) Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. *Science* 279: 227-230.
- Detwiler P.B., Ramanathan S., Sengupta A. in Shraiman B.I. (2000) Engineering aspects of enzymatic signal transduction: photoreceptors in the retina, *Biophys J.*, 79, (6): 2801-2817.
- Dolmetsch R.E., Xu K. in Lewis R.S. (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression, *Nature* 392: 933-936.
- Dumaurier M.-J., Pelassy C., Marhaba R., Breittmayer J.P. in Aussel C. (1997) Regulation of phospholipid biosynthesis by  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinase inhibitors. *J. Lipid Mediat. Cell* 16: 39-52.
- Dupont G., Houart G. in De Koninck P. (2003) Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations: a simple model. *Cell Calcium* 34, 485-497.
- Dupont G. in Goldbeter A. (1998) CaM kinase II as frequency decoder of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations, *BioEssays* 20: 607-610.
- Dupont G. in Goldbeter A. (1993) One-pool model for  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations involving  $\text{Ca}^{2+}$  and inositol 1,4,5-trisphosphate as co-agonists for  $\text{Ca}^{2+}$  release, *Cell Calcium* 14: 311-322.
- Duchen M.R. (2000) Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death, *J. Physiol.* 529.1: 57-68.
- Elowitz M.B., Leibler S. (2000) A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* 403: 335-338.
- Falcke M. (2004) Reading the patterns in living cells—the physics of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *Adv. Phys.* 53: 255-440.
- Fell D. (1997) Understanding the Control of Metabolism, Portland Press.
- Ferrell J.E. Jr. (1998) How regulated protein translocation can produce switch-like responses. *Trends Biochem. Sci.* 23: 461-465.
- Ferrell J.E. Jr. (1996) Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs, *Trends Biochem. Sci.*, 21: 460-466.
- Gall D., Baus E. in Dupont G. (2000) Activation of the liver glycogen phosphorylase by  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations: a theoretical study, *J. theor. Biol.* 207: 445-454.

- Goldbeter A. (1996) *Biochemical Oscillations and Cellular Rhythms*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Goldbeter A. in Koshland D.E. Jr. (1981) An Amplified Sensitivity Arising from Covalent Modification in Biological Systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 6840-6844.
- Goldbeter A. in Koshland D.E. Jr. (1982) Sensitivity amplification in biochemical systems, *Q. Rev. Biophys.*, 15: 555-591.
- Goldbeter A. in Koshland D.E. Jr. (1984) Ultrasensitivity in biochemical systems controlled by covalent modification. Interplay between zero-order and multisteps effects, *J. Biol. Chem.*, 259: 14441-14447.
- Gomez U.C., Verghese C.G. in Mirny A.L. (2007) Operating Regimes of Signaling Cycles: Statics, Dynamics, and Noise Filtering, *PLOS Computational Biology*, 3: 2487-2497.
- Gonze D., Goldbeter A. (2001) A model for a network of phosphorylation-dephosphorylation cycles displaying the dynamics of dominoes and clocks. *J. Theor. Biol.* 210: 167-186.
- Grubelnik V., Larsen A.Z., Kummer U., Olsen L.F. in Marhl M. (2001) Mitochondria regulate the amplitude of simple and complex calcium oscillations, *Biophys. Chem.* 94: 59-74.
- Gunter T.E., Buntinans L., Sparagna G., Eliseev R. in Gunter K. (2000) Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions, *Cell Calcium* 28, pp. 285-296.
- Hatakeyama M., Kimura S., Yumoto N., Ichikawa M., Kawasaki T., Naka T. in Konagaya A. (2002) A Mathematical Modeling of Signal Transduction Cascade on Raf-Akt Cross-Talk. *Genome Informatics* 13: 359-360.
- Heinrich R. in Schuster S. (1996) *The regulation of cellular systems*, Chapman & Hall, New York.
- Heinrich R., Neel B.G. in Rapoport T.A. (2002) Mathematical models of protein kinase signal transduction, *Mol. Cell.*, 9: 957-970.
- Hersen P., Mclean M.N., Mahadevan L. in Ramanathan S. (2008) Signal processing by HOG MAP kinase pathway, *PNAS* 105: 7165-7170.
- Huang C.-Y.F., Ferrell Jr. J.E. (1996) Ultrasensitivity in the mitogenactivated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 10078-10083.
- Ichas F., Jouaville L.S., Sidash S.S., Mazat J.-P. in Holmuhamedov E.L. (1994) Mitochondrial calcium spiking - a transduction mechanism-based on calcium-induced permeability transition involved in cell calcium signaling, *FEBS Letters* 348: 211-215.
- Ichas F., Jouaville L.S. in Mazat J.-P. (1997) Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals, *Cell* 89: 1145.

- Jaconi M., Bony C., Richards S.M., Terzic A., Arnaudeau S., Vassort G. in Pucéat M. (2000) Inositol 1,4,5-trisphosphate directs  $\text{Ca}^{2+}$  flow between mitochondria and the endoplasmic/sarcoplasmic reticulum: A role in regulating cardiac autonomic  $\text{Ca}^{2+}$  spiking, *Mol. Biol. Cell* 11: 1845-1858.
- Jouaville L.S., Ichas F. in Mazat J.-P. (1998) Modulation of cell calcium signals by mitochondria, *Mol. Cell. Biochem.* 184: 371-376.
- Kamp J.T. in Hell W.J. (2000) Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C. *Circ Rec.* 87: 1095-1102.
- Kauffman S. (1993) The Origins of Order: Self-Organization and Selection in Evolution, Oxford University Press.
- Kegg (2007) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, GenomeNet, spletna stran: <http://www.genome.jp/>, povzeto: 5. 10. 2008.
- Kholodenko B.N. (2000) Negative feedback and ultrasensitivity can bring about oscillations in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Eur. J. Biochem.* 267: 1583–1588.
- Kholodenko B.N., Demin O.V., Moehren G. in Hoek J.B. (1999) Quantification of short term signaling by the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 274: 30169–30181.
- Koninck P. in Schulman H. (1998) Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations, *Science* 279: 227-230.
- Koshland D.E. Jr., Goldbeter A. in Stock J.B. (1982) Amplification and adaptation in regulatory and sensory systems, *Science*, 217: 220-225.
- Kummer U., Olsen L.F., Dixon C.J., Green A.K., Bornberg-Bauer E. in Baier G. (2000) Switching from simple to complex oscillations in calcium signalling, *Biophys. J.* 79: 1188-1195.
- Kupzig S., Walker A.S. in Cullen J.P. (2005) The frequencies of calcium oscillations are optimized for efficient calcium-mediated activation of Ras and the ERK/MAPK cascade. *PNAS* 102: 7577-7582.
- Lewis R.S. (2003) Calcium oscillation in T-cells: mechanism and consequences for gene expression. *Biochemical Society Transactions* 31: 925-929.
- Li G. in Qian H. (2003) Sensitivity and Specificity Amplification in Signal Transduction.
- Li Y.-X., Goldbeter A. (1992) Pulsatile signaling in intercellular communication. *Biophys. J.* 61: 161–171.
- Li W.-h., Llopis J., Whitney M., Zlokarnik G. in Tsien R.Y. (1998) Cell-permeant caged  $\text{InsP}(3)$  ester shows that  $\text{Ca}^{2+}$  spike frequency can optimize gene expression, *Nature* 392: 936-1941.
- Lorencon R. (1996) Elektronski elementi in vezja. Maya Studio, Ljubljana.

- Mayawala K., Gelmi, C.A. in Edwards J.S. (2004) MAPK cascade possesses decoupled controllability of signal amplification and duration, *Biophys J.*, 87: L01-L03.
- Marhl M., Schuster S. in Brumen M. (1998) Mitochondria as an important factor in the maintenance of constant amplitudes of cytosolic calcium oscillations, *Biophys. Chem.* 71: 125-132.
- Marhl M., Haberichter T., Brumen M. in Heinrich R. (2000) Complex calcium oscillations and the role of mitochondria and cytosolic proteins, *BioSystems* 57: 75-86.
- Marhl M., Perc M. in Schuster S. (2005a) Selective regulation of cellular processes via protein cascades acting as band-pass filters for time-limited oscillations, *FEBS Lett.*, 579: 5461-5465.
- Marhl M., Perc M., Schuster S. (2005b) A minimal model for decoding of time-limited  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. *Biophysical Chemistry* 120: 161-167.
- Marhl M. in Grubelnik V. (2007) Role of cascades in converting oscillatory signals into stationary step-like responses' *Biosystems*, 87: 58-67.
- Maurer, P., Hohenester, E. in Engel, J. (1996) Extracellular calcium-binding proteins, *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 609-616.
- Moelling K., Schad K., Bosse M., Zimmermann S. in Schweneker M. (2002) Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *J. Biol. Chem.* 277: 31099-31106.
- Mutalik V.K., Singh A.P., Edwards J.S. in Venkatesh. K.V. (2004) Robust global sensitivity in multiple enzyme cascade system explains how the downstream cascade structure may remain unaffected by cross-talk, *FEBS Letters*, 558: 79-84.
- Nakabayashi J. in Sasaki A. (2005) Optimal phosphorylation step number of intracellular signal-transduction pathway, *J. theor. Biol.*, 233: 413-421.
- Neves R.S. in Iyengar R. (2002) Modeling of signaling networks, *BioEssays*, 24: 1110-1117.
- Oancea, E. in Meyer, T. (1998) Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals, *Cell* 95: 307-318.
- Pearson G., Robinson F., Gibson T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. in Cobb, M. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions, *Endocr Rev.*, 22: 153-183.
- Petersen O.H., Petersen C.C.H. in Kasai H. (1994) Calcium and hormone action, *Annu. Rev. Physiol.* 56: 297-319.
- Putney Jr., J.W. (1998) Calcium signaling: Up, down, up, down ... What's the point?, *Science* 279: 191-192.
- Ragazzini J.R., Randall R.H., Russell F.A. (1947) Alysis of Problems in Dynamics by Electronic Circuits, *IRE* 35: 444-452.
- Rizzuto R., Pinton P., Brini M., Chiesa A., Filippin L. in Pozzan T. (1999) Mitochondria as biosensors of calcium microdomains, *Cell Calcium* 26: 193-199.

- Rizzuto R., Bernardi P. in Pozzan T. (2000) Mitochondria as all-round players of the calcium game, *J. Physiol.* 529.1: 37-47.
- Rooney T.A., Sass E.J. in Thomas A.P. (1989) Characterization of cytosolic calcium oscillations induced by phenylephrine and vasopressin in single fura-2-loaded hepatocytes. *J. biol. Chem.* 264: 17131-17141.
- Rutter G.A. in Rizzuto R. (2000) Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca<sup>2+</sup> release: an intimate connection Trends, *Biochem. Sci.* 25: 215-221.
- Salazar C., Politi Z.A. in Hofer T. (2008) Decoding of Calcium Oscillations by Phosphorylation Cycles: Analytic Results. *Biophysical Journal* 94: 1203-1215.
- Salazar C., Politi A., Hofer T. (2004) Decoding of calcium oscillations by phosphorylation cycles. In: Mamitsuka, H., Smith, T., Holzhutter, H.G., Kanehisa, M., DeLisi, C., Heinrich, R., Miyano, S. (Eds.), Proceedings of the Fourth International Workshop on *Bioinformatics and Systems Biology*. Kyoto: 50–51.
- Sauro H.M. in Kholodenko B.N. (2004) Quantitative analysis of signaling networks, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 86: 5-43.
- Schoeberl B., Eichler-Jonsson C., Gilles E.D., Muller G. (2002) Computational modeling of the dynamics of the map kinase cascade activated by surface and internalized egf receptors. *Nat. Biotechnol.* 20: 370–375.
- Schuster S., Knoke B. in Marhl M. (2005) Differential regulation of proteins by bursting calcium oscillations—a theoretical study. *BioSystems* 81: 49–63.
- Schuster S., Marhl M. in Höfer T. (2002) Modelling of simple and complex calcium oscillations : from single-cell responses to intercellular signalling. *Eur. j. biochem.*, 269: 1333-1355.
- Somogyi R. in Stucki J.W. (1991) Hormone-induced calcium oscillations in liver-cells can be explained by a simple one pool model, *J. Biol. Chem.* 266: 11068-11077.
- Stadtman E.R. in Chock P.B. (1977) Superiority of Interconvertible Enzyme Cascades in Metabolic Regulation: Analysis of Multicyclic Systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74 (7): 2766-2770.
- Theodore F.B. Jr., Jeffrey S.B. in Guillermo R. (2004) *Electronic Devices and Circuits*, Prentice Hall, 6th edn.
- Tyson, J.J., Chen, K.C., Novak, B., 2003. Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 221–231.
- Ulrich L.E., Koonin E.V. in Zhulin I.B. (2005) One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes, *Trends Microbiol.*, 13: 52-56.
- Walker S.A., Lockyer P.J. in Cullen P.J. (2003) The Ras binary switch: an ideal processor for decoding complex Ca<sup>2+</sup> signals? *Biochemical Society Transaction* 31: 966-969.



- Widmann C., Gibson S., Jarpe M.B. in Johnson G.L. (1999) Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human, *Physiol. Rev.*, 79: 143-180.
- Wilson R. (2006) Spletna stran: [http://www.musicfromouterspace.com/analogsynth/AAA\\_OscillatorIndex.html](http://www.musicfromouterspace.com/analogsynth/AAA_OscillatorIndex.html), povzeto: 5.10.2008.
- Wolf D.M. in Arkin, A.P. (2003) Motifs, modules and games in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 125–134.
- Wolkenhauer O., Sreenath S.N., Wellstead P., Ullah M. in Cho K.H. (2005) A systems- and signal-oriented approach to intracellular dynamics. *Biochemical Society Transactions* 33: 507-515.
- Woods N.M., Cuthbertson K.S.R. in Cobbold P.H. (1986) Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature* 319: 600-602.



## **DODATEK**

**A Role of cascades in converting oscillatory signals into stationary step-like responses**

**B Signal Amplification in Biological and Electrical Engineering Systems. Universal Role of Cascades**

**Kratek življenjepis s prikazom znanstveno-raziskovalnega in strokovnega dela**



## **A Vloga kaskad pri pretvorbi oscilirajočih signalov v stacionarne stopničaste odzive**

V prilogi je izvorni znanstveni članek z naslovom »Role of cascades in converting oscillatory signals into stationary step-like responses«, ki je nastal v okviru podiplomskega izobraževanja in je objavljen v reviji **BioSystems** 87 (2007) 58-67.

# **VLOGA KASKAD PRI PRETVORBI OSCILIRAJOČIH SIGNALOV V STACIONARNE STOPNIČASTE ODZIVE**

*Marko Marhl in Vladimir Grubelnik*

<sup>1</sup>Oddelek za fiziko, Pedagoška fakulteta, Univerza v Mariboru,  
Koroška cesta 160, SI-2000 Maribor, Slovenija





Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



BioSystems 87 (2007) 58–67



[www.elsevier.com/locate/biosystems](http://www.elsevier.com/locate/biosystems)

## Role of cascades in converting oscillatory signals into stationary step-like responses

Marko Marhl\*, Vladimir Grubelnik

*Department of Physics, Faculty of Education, University of Maribor, Koroška Cesta 160, SI-2000 Maribor, Slovenia*

Received 12 October 2005; received in revised form 13 March 2006; accepted 17 March 2006

### Abstract

In biological signal transduction pathways intermediates are often oscillatory and need to be converted into smooth output signals at the end. We show by mathematical modelling that protein kinase cascades enable converting oscillatory signals into sharp stationary step-like outputs. The importance of this result is demonstrated for the switch-like protein activation by calcium oscillations, which is of biological importance for regulating different cellular processes. In addition, we found that protein kinase cascades cause memory effects in the protein activation, which might be of a physiological advantage since a smaller amount of calcium transported in the cell is required for an effective activation of cellular processes.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Protein kinase cascade; Calcium oscillations; Signal transduction; Ultrasensitivity; Biochemical switch

### 1. Introduction

Functioning of biological systems is highly complex and requires analysing evolutionary, topological and dynamical aspects. At the cellular level, the regulation of processes is achieved through a complex network of interactions among biochemical and cellular structures, which consist of hundreds to thousands of chemical species and reactions among hundreds of distinct chemical species. To understand the dynamics of such complex networks, it is important to find ways of their decomposing into smaller, functional reasonable parts that enables effective structural and dynamical analysis (Ma et al., 2004; Yeger-Lotem et al., 2004; Itzkovitz et al., 2005). This is a universal approach, applicable to biological, technological, and sociological networks (Milo et al., 2002, 2003). In complex biological networks,

including signalling, metabolic and gene regulatory networks, larger functional parts are usually called modules; smaller, repeated, perhaps evolutionary conserved networks, are known as motifs (Hartwell et al., 1999; Arkin, 2000; Rao and Arkin, 2001; Milo et al., 2002; Wolf and Arkin, 2003).

In biological systems, several motifs were recognised, acting as oscillators, switches, amplifiers, filters, etc. (for review see Wolf and Arkin, 2003). In prokaryotes, for example, simple one- and two-component systems link external signals with cellular responses (Alves and Savageau, 2003; Ulrich et al., 2005). In plant and animal cells, signalling networks can be highly complex, some networks comprising of 60 or more proteins (Sauro and Kholodenko, 2004). The fundamental motif that has been found in all protein-based signalling networks is the protein phosphorylation–dephosphorylation cycle, also called “futile cycle” (Arkin, 2000).

The futile cycle, in which a protein is phosphorylated by a kinase and then subsequently dephosphorylated by a phosphatase, can act as a chemical switch (Goldbeter

\* Corresponding author. Tel.: +386 2 2293643; fax: +386 2 2518180.  
E-mail address: [marko.marhl@uni-mb.si](mailto:marko.marhl@uni-mb.si) (M. Marhl).

and Koshland, 1981, 1984; Ferrell, 1998; Arkin, 2000). For special conditions under which the kinase and phosphatase reactions are both saturated, the system enters a state called “zero-order ultrasensitivity” (Goldbeter and Koshland, 1981, 1984; Koshland et al., 1982). The smaller the dissociation constants in the kinase and phosphatase reactions, the more the sigmoidal dependency resembles a Boolean step function, and the motif enables effective switching between two steady-states. Although it is not a true bistable state, and the switch is called a “soft-switch”, it can be easily converted (by adding a positive feedback) to a “hard-switch”, a truly bistable system (Arkin, 2000).

The protein phosphorylation–dephosphorylation cycle is also known as a “cascade cycle” (Sauro and Kholodenko, 2004) because it is the basic unit of many regulatory and signal transduction cascades, which are then further combined by cross-talk mechanisms into complex networks (Dumont et al., 2002; Sauro and Kholodenko, 2004). The importance of protein kinase cascades has been established in the control of many cellular processes including cell cycle regulation, gene expression, cellular metabolism, stress responses, and T cell activation (e.g. Cantrell, 1996; Dalton et al., 1999; Pearce and Humphrey, 2001). A common view is that the protein kinase cascades allow a large signal amplification, in the same way that a photo-multiplier tube converts a small pulse of photons into a large photocurrent, for example (cf. Ferrell, 1996). The cascades play an important role in filtering out noise (Ferrell, 1996). Moreover, a counter-intuitive result that longer cascades (up to an optimal length) enable a faster propagation of signals was derived (Heinrich et al., 2002; Nakabayashi and Sasaki, 2005). Very recently we show by mathematical modelling that protein-kinase cascades can act as band-pass filters for time-limited oscillatory signals, which in case of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations might have important consequences for a selective regulation of cellular processes (Marhl et al., 2005, 2006).

The protein-kinase cascades can also generate ultrasensitive responses and act as very effective chemical switches, converting graded input signals into switch-like outputs (Goldbeter and Koshland, 1984; Huang and Ferrell, 1996; Ferrell, 1996; Bagowski and Ferrell, 2001; Bagowski et al., 2003). The ultrasensitive cascades behave like a highly cooperative enzyme, even though it is not necessary that any of the enzymes in the cascade are regulated cooperatively. A well-known example of an ultrasensitive cascade is the mitogen-activated protein-kinase (MAPK) cascade (Huang and Ferrell, 1996; Ferrell, 1996). It has been shown experimen-

tally, for example, that in *Xenopus* oocytes the MAPK cascade enables converting a continuously variable stimulus, the concentration of the maturation-inducing hormone progesterone, into an all-or-none biological response—oocyte maturation (Ferrell and Machleder, 1998). Recently, it has also been found that the JNK protein cascade in *Xenopus* oocytes and mammalian cells exhibits sustained, ultrasensitive all-or-none responses to graded, transient stimuli (Bagowski and Ferrell, 2001; Bagowski et al., 2003).

It should be noted that the studies on protein-kinase cascades that act as biochemical switches were mainly focused on converting graded input signals into switch-like outputs. However, it is well-known that many cellular processes are regulated by fluctuating stimuli like fluctuating hormonal signals, neuronal oscillations, glycolytic oscillations, etc. (Goldbeter, 2002; Buzsáki and Draguhn, 2004; Wolf et al., 2000; Prank et al., 2000, 2005). One of the most prominent example of oscillatory signals involved in the regulation of cellular processes are  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations (for review see Schuster et al., 2002; Falcke, 2004). Therefore, in this paper we analyse the conversion of oscillatory input signals into switch-like outputs. We show by mathematical modelling that protein-kinase cascades could play important role in converting  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations into stationary step-like protein activations, which might have important consequences in regulating several cellular processes.

The paper is organised as follows. First, in Section 2 the mathematical model is presented. The  $\text{Ca}^{2+}$  spike trains are modelled by square-shaped pulses and the protein activation relies on a protein-kinase cascade with a linear kinetics. Results are presented in Section 3. To point out the importance of protein-kinase cascades comparing with only one phosphorylation–dephosphorylation cycle, Section 3 is divided into three subsections. At the end, in the last section, the biological importance of the results and the relation to other studies is discussed.

## 2. Mathematical model

For analysing the conversion of oscillatory  $\text{Ca}^{2+}$  signals into a stationary switch-like protein activation, we simulate  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations by artificial square-shaped pulses. This approach has also been used in some experiments (De Koninck and Schulman, 1998) and mathematical simulations (Li and Goldbeter, 1992; Dupont et al., 2003; Salazar et al., 2004; Schuster et al., 2005a). Other artificially generated signals, like sinusoidal patterns, have also been used (Gall et al., 2000).



A series of  $\text{Ca}^{2+}$  spike trains is simulated by the following periodic square-shaped signal:

$$x(t) = \begin{cases} x_{\max} & \text{if } ((t \bmod p) \geq (p-d) \wedge (t < Mp)), \\ x_{\min} & \text{else,} \end{cases} \quad (1)$$

where  $x_{\min}$  and  $x_{\max}$  are the minimum and maximum of the oscillatory signal ( $x_{\min} = 0 \mu\text{M}$ ,  $x_{\max} = 1 \mu\text{M}$  in all calculations), respectively,  $p$  is the period of oscillations,  $d$  is the spike width ( $p = 100 \text{ s}$ ,  $d = 1 \text{ s}$  in all calculations), and  $M$  is the number of  $\text{Ca}^{2+}$  spikes. The number of spikes ( $M$ ) changes from one example to another and the value of  $M$  is specified in the text and in figure captions.

The oscillatory  $\text{Ca}^{2+}$  signals activate proteins in a protein-kinase cascade. The organisation of the protein activation in the cascade consisting of  $N$  levels is schematically presented in Fig. 1. We consider that the  $\text{Ca}^{2+}$  binds to proteins at the first level in the cascade; the activated first-level proteins then activate the proteins at the second level, etc.

The concentration of the activated proteins at the  $i$ th cascade level,  $z_i$ , is given by the following equation:

$$\frac{dz_i}{dt} = J_{\text{on},i} - J_{\text{off},i}, \quad i = 1, 2, \dots, N. \quad (2)$$

The fluxes are defined as:

$$J_{\text{on},i} = \begin{cases} k_{\text{on}} x^n \tilde{z}_i & \text{if } i = 1, \\ k_{\text{on}} z_{i-1} \tilde{z}_i & \text{if } i = 2, \dots, N, \end{cases} \quad (3)$$

where  $\tilde{z}_i = z_{\text{tot}} - z_i$ , and  $n$  represents the number of  $\text{Ca}^{2+}$  ions that cooperatively bind to the protein (we take

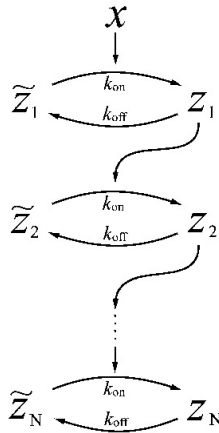


Fig. 1. Schematic presentation of the protein-kinase cascade.

$n = 1$  in all calculations).

$$J_{\text{off},i} = k_{\text{off}} z_i, \quad i = 1, 2, \dots, N. \quad (4)$$

For simplicity reasons,  $k_{\text{on}}$ ,  $k_{\text{off}}$ , and  $z_{\text{tot}}$  have the same values at all cascade levels. This may also be of physiological importance, as for the steady-state responses of protein kinase networks it has been shown that the most efficient cascade design for generating sharp signals has equal on rates, and to achieve the highest amplification and the shortest duration response, the cascade should have equal off rates (Chaves et al., 2004). We take  $z_{\text{tot}} = 10 \mu\text{M}$  and  $k_{\text{on}} = 0.1 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  in all calculations. Values of  $k_{\text{off}}$  are specified later in the text and figure captions.

### 3. Results

#### 3.1. Small values of $k_{\text{off}}$ enable smooth responses

A simple possible way of converting an oscillatory  $\text{Ca}^{2+}$  signal into a stationary output is  $\text{Ca}^{2+}$  binding to proteins in accordance with Eqs. (1)–(4) for  $N = 1$ . Fig. 2 shows that the smoothness of the output signal strongly depends on the kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$  binding to the proteins. The protein activation becomes smoother for smaller values of  $k_{\text{off}}$ . This can be explained by the analytical solution of Eq. (2) for the time during interspike intervals of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. Since, in the time between two successive  $\text{Ca}^{2+}$  spikes, the value of  $x$  is zero ( $x = x_{\min} = 0$ ),

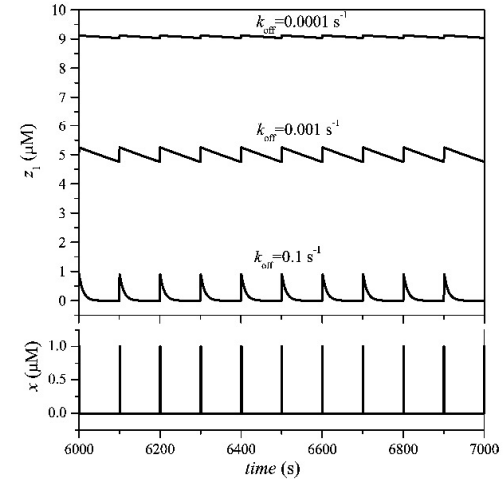


Fig. 2. The output signal ( $z_1$ ) becomes smoother for smaller values of  $k_{\text{off}}$ . Parameter values:  $N = 1$ ,  $M \rightarrow \infty$ .

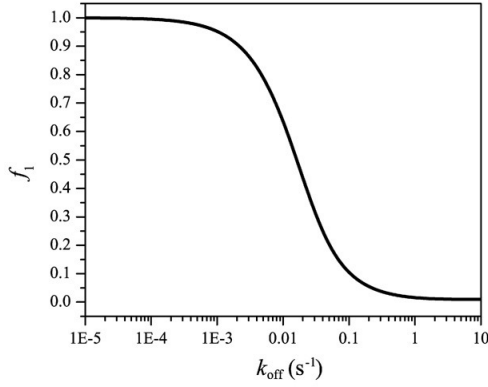


Fig. 3. The smoothness  $f_1$  in dependence on  $k_{\text{off}}$ . Parameter values:  $N=1, M \rightarrow \infty$ .

Eq. (2) simplifies to:

$$\frac{dz_i}{dt} = -k_{\text{off}} z_i. \quad (5)$$

The solution of Eq. (5) is:

$$z_i = z_{i,0} e^{-k_{\text{off}} t}, \quad (6)$$

where  $z_{i,0} = z_i(0)$ , taking  $t=0$  at the beginning of the interspike interval.

According to Eq. (6) the smoothing effect of the output signal directly depends on the value of  $k_{\text{off}}$ . The output signal ( $z_1$ ) is smoother for smaller values of  $k_{\text{off}}$ , as shown in Fig. 2. Another interesting phenomenon is that the output signal ( $z_1$ ) is also amplified at smaller values of  $k_{\text{off}}$ , which is a consequence of a slower decrease in the protein activation during the interspike interval. To quantify the effect of smoothing of the protein activation, we define the following function:

$$f_i = \frac{\langle z_i \rangle}{z_{i,\text{max}}}, \quad (7)$$

where  $z_{i,\text{max}}$  is the maximum value of  $z_i$ , and  $\langle z_i \rangle$  is the average of  $z_i$ :

$$\langle z_i \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T z_i dt, \quad (8)$$

where  $T$  is a sufficiently large multiple of the period. The smoothness  $f_i$  approaches 1 ( $f_i \rightarrow 1$ ) when  $\langle z_i \rangle \rightarrow z_{i,\text{max}}$ . Fig. 3 shows that  $f_1 \rightarrow 1$  if  $k_{\text{off}} \rightarrow 0$ , i.e., the output signal ( $z_1$ ) becomes smoother for smaller values of  $k_{\text{off}}$ , as already shown in Fig. 2 for three particular values of  $k_{\text{off}}$ .

### 3.2. Large values of $k_{\text{off}}$ enable sharper step-like responses

The results presented in Section 3.1 show that a smooth output signal ( $z_1$ ) can be obtained for a small value of  $k_{\text{off}}$ . The smaller the values of  $k_{\text{off}}$  the smoother the output signal ( $z_1$ ), which is a direct consequence of the slow protein deactivation during the interspike intervals (see Eq. (6)). However, small values of  $k_{\text{off}}$  cause also some problems. First, since the protein deactivation is slow at smaller values of  $k_{\text{off}}$ , when the input signal is switched off, this prevents to have a sharp decrease in the protein activation at the end of the signal. Fig. 4 shows that indeed for smaller values of  $k_{\text{off}}$  the protein activation returns to its basal level more slowly. This can be explained by using Eq. (6), which gives  $z_1 = z_{1,\text{max}} e^{-k_{\text{off}} t}$  in this case, and obviously the time  $t$ , needed for returning the protein activation ( $z_1$ ) to its basal level, is larger for smaller values of  $k_{\text{off}}$ .

Another problem, that appears at smaller values of  $k_{\text{off}}$ , is the long time needed for reaching the maximal protein activation (see Fig. 4), which does not contribute to a sharp step-like response and prevents having an effective dynamical switch for the protein activation. The problem is related with higher values of  $z_{1,\text{max}}$  and  $\langle z_1 \rangle$  characterised for smaller values of  $k_{\text{off}}$  (see Section 3.1). Therefore, the time needed to reach the  $z_{1,\text{max}}$  is larger for smaller values of  $k_{\text{off}}$ , which prevents a sharp increase in the protein activation at the onset of the input signal. Interestingly, this problem arises despite the fact that the activation of proteins is actually faster for smaller values of  $k_{\text{off}}$  (see the steepness of the curves in Fig. 4 at the onset of the input signal).

The results shown for three different values of  $k_{\text{off}}$  in Fig. 4 can be presented in a more systematic way. We quantify the sharpness of the on- and offset of the protein activation ( $z_i$ ) by measuring the time  $t_{\text{on},i}$  and  $t_{\text{off},i}$ , respectively. The  $t_{\text{on},i}$  is the time in which the protein activation ( $z_i$ ) increases from 10 to 90% of  $z_{i,\text{max}}$ , and the  $t_{\text{off},i}$  is the time in which the  $z_i$  is reduced from 90 to 10% of  $z_{i,\text{max}}$ . Fig. 5a shows how the onset time,  $t_{\text{on},1}$ , depends on the  $k_{\text{off}}$ . Note that the curve is not continuous because of the zigzag increase in the protein activation  $z_1(t)$ . Fig. 5b shows the dependency of the offset time,  $t_{\text{off},1}$ , on the  $k_{\text{off}}$ . From Fig. 5a and b it can be seen that a sharp step-like protein activation requires large values of  $k_{\text{off}}$ .

By comparing the results in Figs. 3 and 5 it appears impossible to obtain a smooth step-like protein activation in response to  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. For the

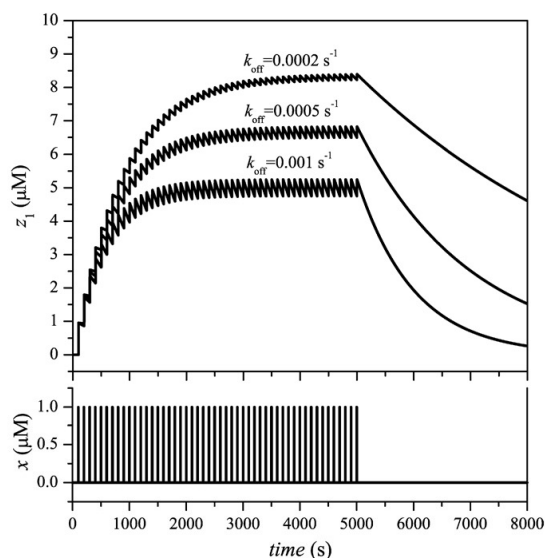


Fig. 4. The sharpness of the protein activation at the on- and offset of the input signal depends on  $k_{\text{off}}$ . Parameter values:  $N = 1$ ,  $M = 50$ .

smoothness of the protein activation, on one hand, small values of  $k_{\text{off}}$  are required (see Fig. 3), whereas on the other hand, large values of  $k_{\text{off}}$  are needed for the sharp on- and offset of the protein activation (see Fig. 5). The problem is, however, indeed unsolvable if only one phosphorylation–dephosphorylation cycle is taken into account, i.e., for  $N = 1$ . In the following we show that this problem can be solved and a smooth step-like protein activation can be obtained for  $N > 1$ .

### 3.3. Protein-kinase cascades enable smooth and sharp step-like responses

We analyse the protein activation in dependence on the number of cascade levels ( $N$ ). In Fig. 6 the smoothness of the protein activation in dependence on the  $k_{\text{off}}$  and the number of cascade levels  $N$  is presented. The case  $N = 1$  in Fig. 6 corresponds to the protein activation shown in Fig. 3. For higher values of  $N$ , the protein activation becomes smoother in a larger range of  $k_{\text{off}}$  values,

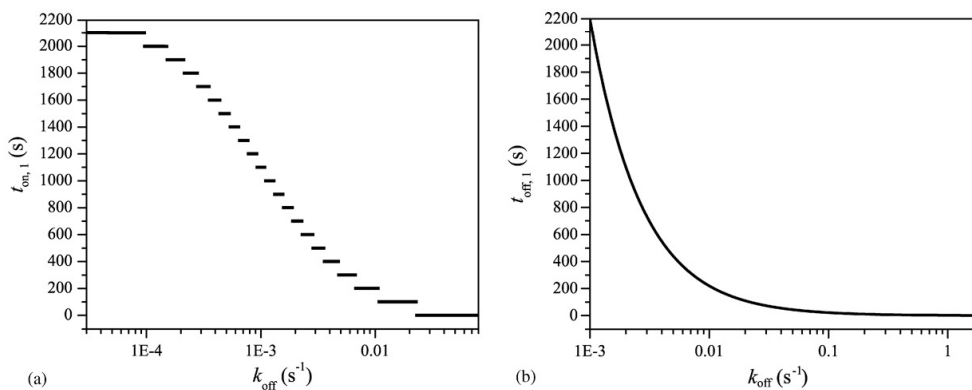


Fig. 5. The sharpness of the on- and offset of the protein activation depends on the  $k_{\text{off}}$ . The onset time  $t_{\text{on},1}$  (a) and the offset time  $t_{\text{off},1}$  (b) decrease with increasing values of  $k_{\text{off}}$ . Parameter values:  $N = 1$ ,  $M = 50$ .

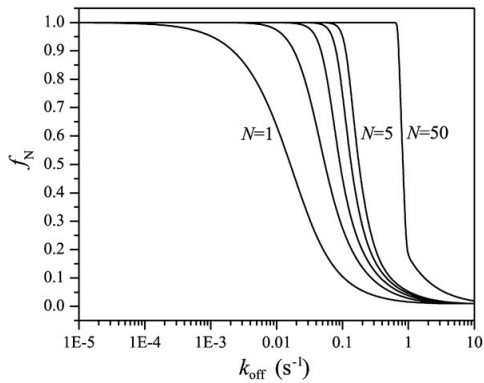


Fig. 6. The smoothness  $f_N$  in dependence on the  $k_{\text{off}}$  and the number of cascade levels  $N$ . Cascades with larger  $N$  provide smoother output signals also at higher values of  $k_{\text{off}}$ . Parameter value:  $M = 50$ .

i.e., also at higher values of  $k_{\text{off}}$ . This can be most simply explained by considering the protein activation at a fixed value of  $k_{\text{off}}$ . For a given  $k_{\text{off}}$  the protein activation becomes smoother with the increasing  $N$  because  $J_{\text{on},i} > 0$  for  $i > 1$  also during the interspike interval, i.e., when  $x(t) = 0$  (see Eqs. (2)–(4)), and this causes a slower deactivation of the protein.

The results in Fig. 6 show that the cascades enable smooth output signals in a larger range of  $k_{\text{off}}$  values. In order to construct an effective smooth step-like protein activation, the only problem remains how to activate and deactivate the proteins very fast. For  $N = 1$ , in Fig. 5, we showed that both on- and offset times ( $t_{\text{on},1}$  and  $t_{\text{off},1}$ ) decrease with increasing values of  $k_{\text{off}}$ . Now we examine this for higher cascade levels ( $N > 1$ ). Fig. 7a shows

how the onset time,  $t_{\text{on},N}$  (the time needed to activate the  $z_N$  from 10 to 90% of  $z_{\text{max},N}$ ), depends on the  $k_{\text{off}}$  for different  $N$ . Note that the curve for  $N = 1$  is identical to that in Fig. 5a. Fig. 7b shows the dependency of the offset time,  $t_{\text{off},N}$  (the time needed to deactivate the  $z_N$  from 90 to 10% of  $z_{\text{max},N}$ ), on  $k_{\text{off}}$  for different  $N$ . The curve for  $N = 1$  is identical to that in Fig. 5b. According to Fig. 5, also the results in Fig. 7 show that large values of  $k_{\text{off}}$  are required for a sharp step-like protein activation. However, with increasing values of  $N$ , i.e., at higher cascade levels, the dependencies of  $t_{\text{on},1}$  and  $t_{\text{off},1}$  on the  $k_{\text{off}}$  converge to limit curves (see Fig. 7).

By comparing Figs. 6 and 7 we see that a smooth step-like response in the protein activation can be obtained for reasonable values of  $k_{\text{off}}$  and  $N$ . Fig. 7 shows that  $k_{\text{off}}$  has to be large enough to enable fast protein activation and deactivation. On the other hand, however, for a smooth response at larger values of  $k_{\text{off}}$ , the number of cascade levels  $N$  has to be large enough (see Fig. 6). Therefore, an effective smooth step-like protein activation can be obtained by taking  $k_{\text{off}}$  in the upper range where the smoothness still can be guaranteed by taking large enough values for  $N$ . It should be noted that by increasing the number of cascade levels ( $N$ ) the range of  $k_{\text{off}}$  values for which we obtain a smooth step-like protein activation considerably increases, which is a consequence of a faster convergence of both  $t_{\text{on},N}$  and  $t_{\text{off},N}$  for  $N \rightarrow \infty$  (see Fig. 7) in comparison with the convergence of the smoothness,  $f_N$ , for  $N \rightarrow \infty$  (see Fig. 6). Therefore, we do not need to take cascades with a very high number of levels to obtain reasonable smooth step-like protein activations. In Fig. 8 we show that values  $k_{\text{off}} = 0.1 \text{ s}^{-1}$  and  $N = 10$ , for example, give good results. The response in the protein activation

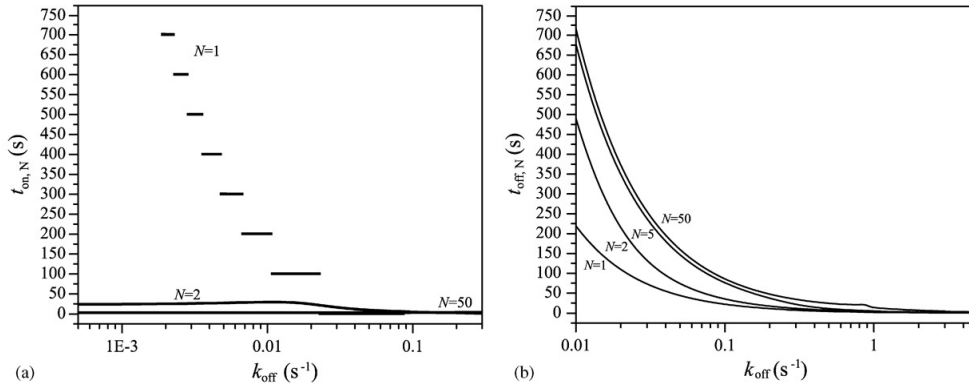


Fig. 7. The onset time  $t_{\text{on},N}$  (a) and the offset time  $t_{\text{off},N}$  (b) in dependence on the  $k_{\text{off}}$ . Results are shown for different values of  $N$ . Parameter value:  $M = 50$ .

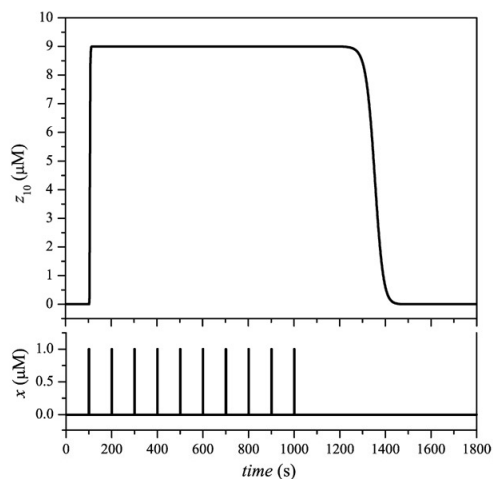


Fig. 8. Smooth step-like protein activation for  $N=10$ ,  $k_{\text{off}}=0.1 \text{ s}^{-1}$ ,  $M=10$ .

is indeed a step-like function with a well-expressed smooth plateau of the protein activation (see Fig. 8).

Fig. 8 indicates an interesting phenomenon that characterises the protein activation in multilevel protein-kinase cascades. We see that the rapid protein deactivation does not begin immediately after the last  $\text{Ca}^{2+}$  spike. A “memory effect” can be observed, i.e., the protein is deactivated with a time delay after that the input signal is switched off. Fig. 9 shows that the

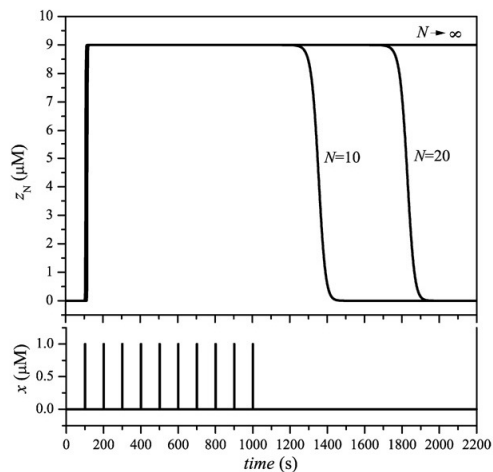


Fig. 9. The memory effect is more pronounced for cascades with a higher number of cascade levels ( $N$ ). Parameter values:  $k_{\text{off}}=0.1 \text{ s}^{-1}$ ,  $M=10$ .

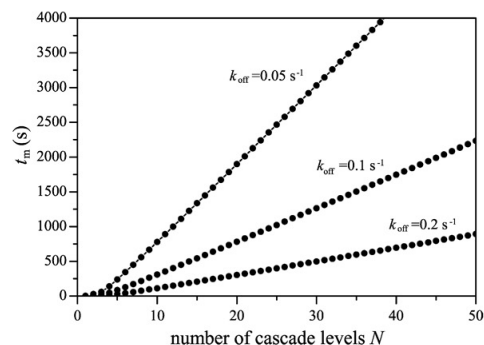


Fig. 10. The memory time,  $t_m$ , in dependence on the number of cascade levels ( $N$ ). Parameter value:  $M=10$ .

“memory time” increases with the number of cascade levels ( $N$ ). In Fig. 9 it can also be observed that the amplitude of the protein activation converges to a limit value when  $N \rightarrow \infty$ . The limit value can be estimated by considering the steady-state solution of Eq. (2) for  $i=N$ . This reasoning is justified because of a very smooth output signal suggesting a close to zero net flux, i.e.,  $dz_N/dt=0$ . For  $N \rightarrow \infty$  we can also take  $z_{N-1}=z_N$  and obtain the limit value  $z_N = z_{\text{tot}} - k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ .

We define the memory time,  $t_m$ , as the time between the last  $\text{Ca}^{2+}$  spike and the reduction of the  $z_N$  to 90% of its maximal value  $z_{\text{max},N}$ . Fig. 10 shows that for the cascades with identical reactions at each level  $i > 1$  (see Eqs. (2)–(4)), the  $t_m$  depends nearly linearly on the number of cascade levels ( $N$ ).

#### 4. Discussion

We show by mathematical modelling that protein-kinase cascades could play an important role in converting oscillatory input signals into stationary step-like outputs. The importance of this result is demonstrated for a switch-like protein activation caused by  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. In biological systems the  $\text{Ca}^{2+}$  mediated switch-like protein activations seem to be of a particular importance because it is known that many cellular processes are regulated via the protein activation induced by  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations (Berridge et al., 1998; for review see Schuster et al., 2002; Falcke, 2004). For the case that  $\text{Ca}^{2+}$  binding to the first level proteins in a cascade is non-cooperative ( $n=1$  in Eq. (3)), our results show that  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations can be successfully converted into a stationary switch-like protein activation. Although we do not show any calculations for  $n > 1$ , it should be noted that all results presented in the paper remain qualitatively the

same, and even more pronounced due to the fast onset of the protein activation, if a cooperative  $\text{Ca}^{2+}$  binding to the proteins is taken into account. This is important because several examples of a protein activation by cooperative  $\text{Ca}^{2+}$  binding exist like, for example, the activation of the multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin kinase II (CaMKII) by  $\text{Ca}^{2+}$  and calmodulin (De Koninck and Schulman, 1998; Dupont et al., 2003).

The switch-like protein activation by oscillatory signals, as presented in the paper, indicates a new dimension in analysing the conversion of input signals into switch-like outputs. The most important novelty is the dynamical aspect of the switch-like protein activation, which could be seen as a “dynamical ultrasensitive switch”. Previous studies have focused mainly on the steady-state responses of enzymes to varying input signals. In particular, graded input signals were of interest. It has been shown that several protein-kinase cascades (like MAPK or JNK cascades mentioned in Section 1) can convert graded input signals into switch-like, ultrasensitive responses (Huang and Ferrell, 1996; Ferrell, 1996; Ferrell and Machleder, 1998; Bagowski and Ferrell, 2001; Bagowski et al., 2003). Only few experimental studies were concerned about the time courses of activating proteins in the cascades, as e.g. Bagowski et al. (2003) analysed the time courses of JNK activity for stationary input signals. In order to evaluate our model predictions, experimental results would be needed for oscillatory input signals. However, for  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations, for example, there exist only few evidences for protein activation like CaMKII (De Koninck and Schulman, 1998), Ras (Kupzig et al., 2005) and Ras GTPase-activating proteins RASAL and CAPRI (Walker et al., 2004; Liu et al., 2005).

Our dynamical ultrasensitive switch shares some common properties of protein-kinase cascades like signal amplification, for example, that has been investigated previously (cf. Ferrell, 1996). The signal amplification was not among the primary goals of our study. Therefore, we did not show detailed results on the signal amplification in dependence on the number of cascade levels ( $N$ ). However, we mentioned that for  $N \rightarrow \infty$  the protein activation  $z_N$  converges to a limit value ( $z_N = z_{\text{tot}} - k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ ). For parameter values used in Fig. 9 the limit value is  $z_N = 9 \mu\text{M}$ .

It is worth discussing our results also in the sense of the role of cascades in providing a robust cell signalling. Recently, the robustness of cellular mechanisms has attracted much interest (Stelling et al., 2002, 2004a,b). For protein-kinase cascades acting as switches it has been shown that the ultrasensitivity in multilevel cascades (e.g. MAPK cascades) is more

robust against changes of the kinetic parameters than the Goldbeter–Koshland-switch (Blüthgen and Herzog, 2003). The robust global sensitivity in multilevel protein-kinase cascades also enables that the downstream cascade structure (of the MAPK cascade, for example) can remain unaffected by the cross-talk (Mutalik et al., 2004). Moreover, the robustness of protein-kinase cascades is also manifested in filtering out noise (cf. Ferrell, 1996). This is tightly connected with ultrasensitive switch-like responses of most cascades. Cascades that convert graded input signals into switch-like outputs can effectively filter out noise because they do not respond to signals of sub-threshold magnitude. It should be noted that the all-or-none response of the cascades is even more pronounced for dynamical ultrasensitive switches responding to oscillatory input signals. Oscillatory signals, like  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations, for example, can be seen as an additional all-or-none responding intermediate important for a robust intracellular signal transduction. It is namely well accepted that one of crucial reasons why  $\text{Ca}^{2+}$  signals are oscillatory is their robustness to perturbations in biological cells (cf. Schuster et al., 2002).

Another advantage of multilevel protein-kinase cascades could be the memory effect reported in the paper. The memory effect enables long-lasting activations of cellular process with relatively short  $\text{Ca}^{2+}$  signals. Due to a shorter duration of  $\text{Ca}^{2+}$  signals in comparison with the long-lasting activation of the corresponding cellular process, the signal transmission requires a smaller amount of  $\text{Ca}^{2+}$  translocated in the cell, which could be of an important physiological advantage in the sense of lowering energy costs needed for an effective signal transduction.

Several previous studies have emphasised the important role of mathematical modelling that enabled, for example, a deeper insight into the functioning of signalling networks (see e.g. Sauro and Kholodenko, 2004; Kolch et al., 2005). Moreover, the predictive power of mathematical modelling has been confirmed by making several predictions that have been verified later experimentally (Ideker and Lauffenburger, 2003; Tyson et al., 2003; Zaslaver et al., 2004; Schuster et al., 2005b). Therefore, we also hope that those results presented in this paper that still need to be verified experimentally will obtain their confirmation, or will at least give rise to new experimental studies in the future.

## References

- Alves, R., Savageau, M.A., 2003. Comparative analysis of prototype two-component systems with either bifunctional or monofunctional

- sensors: differences in molecular structure and physiological function. *Mol. Microbiol.* 48, 25–51.
- Arkin, A.P., 2000. Signal processing by biochemical reaction networks. In: Walleczek, J. (Ed.), *Self-Organized Biodynamics and Nonlinear Control*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 112–144.
- Bagowski, C.P., Ferrell Jr., J.E., 2001. Bistability in the JNK cascade. *Curr. Biol.* 11, 1176–1182.
- Bagowski, C.P., Besser, J., Frey, C.R., Ferrell Jr., J.E., 2003. The JNK cascade as a biochemical switch in mammalian cells: ultrasensitive and all-or-none responses. *Curr. Biol.* 13, 315–320.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Lipp, P., 1998. Calcium—a life and death signal. *Nature* 395, 645–648.
- Blüthgen, N., Herzog, H., 2003. How robust are switches in intracellular signaling cascades? *J. Theor. Biol.* 225, 293–300.
- Buzsáki, G., Draguhn, A., 2004. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304, 1926–1929.
- Cantrell, D., 1996. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 259–274.
- Chaves, M., Sontag, E.D., Dinerstein, R.J., 2004. Optimal length an signal amplification in weakly activated signal transduction cascades. *J. Phys. Chem. B* 108, 15311–15320.
- Dalton, T.P., Shertzer, H.G., Puga, A., 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 67–101.
- De Koninck, P., Schulman, H., 1998. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science* 279, 227–230.
- Dumont, J.E., Dremier, S., Piron, I., Maenhaut, C., 2002. Cross signaling, cell specificity, and physiology. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C2–C28.
- Dupont, G., Houart, G., De Koninck, P., 2003. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations: a simple model. *Cell Calcium* 34, 485–497.
- Falcke, M., 2004. Reading the patterns in living cells—the physics of Ca<sup>2+</sup> signaling. *Adv. Phys.* 53, 255–440.
- Ferrell Jr., J.E., 1996. Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *Trends Biochem. Sci.* 21, 460–466.
- Ferrell Jr., J.E., 1998. How regulated protein translocation can produce switch-like responses. *Trends Biochem. Sci.* 23, 461–465.
- Ferrell Jr., J.E., Machleder, E.M., 1998. The biochemical basis of an all-or-none cell fate switch in *Xenopus* oocytes. *Science* 280, 895–898.
- Gall, D., Baus, E., Dupont, G., 2000. Activation of the liver glycogen phosphorylase by Ca<sup>2+</sup> oscillations: a theoretical study. *J. Theor. Biol.* 207, 445–454.
- Goldbeter, A., 2002. Computational approaches to cellular rhythms. *Nature* 420, 238–245.
- Goldbeter, A., Koshland Jr., D.E., 1981. An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 6840–6844.
- Goldbeter, A., Koshland Jr., D.E., 1984. Ultrasensitivity in biochemical systems controlled by covalent modification. *J. Biol. Chem.* 259, 14441–14447.
- Hartwell, L.H., Hopfield, J.J., Leibler, S., Murray, A.W., 1999. From molecular to modular cell biology. *Nature* 402, C47–C52.
- Heinrich, R., Neel, B.G., Rapoport, T.A., 2002. Mathematical models of protein kinase signal transduction. *Mol. Cell.* 9, 957–970.
- Huang, C.-Y.F., Ferrell Jr., J.E., 1996. Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 10078–10083.
- Ideker, T., Lauffenburger, D., 2003. Building with a scaffold: emerging strategies for high- to low-level cellular modeling. *Trends Biotechnol.* 21, 255–262.
- Itzkovitz, S., Levitt, R., Kashtan, N., Milo, R., Itzkovitz, M., Alon, U., 2005. Coarse-graining and self-dissimilarity of complex networks. *Phys. Rev. E* 71, 016127.
- Kolch, W., Calder, M., Gilbert, D., 2005. When kinases meet mathematics: the system biology of MAPK signalling. *FEBS Lett.* 579, 1891–1895.
- Koshland Jr., D.E., Goldbeter, A., Stock, J.B., 1982. Amplification and adaptation in regulatory and sensory systems. *Science* 217, 220–225.
- Kupzig, S., Walker, S.A., Cullen, P.J., 2005. The frequencies of calcium oscillations are optimized for efficient calcium-mediated activation of Ras and the ERK/MAPK cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 7577–7582.
- Li, Y.-X., Goldbeter, A., 1992. Pulsatile signaling in intercellular communication. *Biophys. J.* 61, 161–171.
- Liu, Q., Walker, S.A., Gao, D., Taylor, J.A., Dai, Y.-F., Arkell, R.S., Bootman, M.D., Roderick, H.L., Cullen, P.J., Lockyer, P.J., 2005. CAPRI and RASAL impose different modes of information processing on Ras due to contrasting temporal filtering of Ca<sup>2+</sup>. *J. Cell. Biol.* 170, 183–190.
- Ma, H.-W., Zhao, X.-M., Yuan, Y.-J., Zeng, A.-P., 2004. Decomposition of metabolic network into functional modules based on the global connectivity structure of reaction graph. *Bioinformatics* 20, 1870–1876.
- Marhl, M., Perc, M., Schuster, S., 2005. Selective regulation of cellular processes via protein cascades acting as band-pass filters for time-limited oscillations. *FEBS Lett.* 579, 5461–5465.
- Marhl, M., Perc, M., Schuster, S., 2006. A minimal model for decoding of time-limited Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Biophys. Chem.* 120, 161–167.
- Milo, R., Shen-Orr, S., Itzkovitz, S., Kashtan, N., Chklovskii, D., Alon, U., 2002. Network motifs: simple building blocks of complex networks. *Science* 298, 824–827.
- Milo, R., Itzkovitz, S., Kashtan, N., Levitt, R., Shen-Orr, S., Ayzenshtat, I., Sheffer, M., Alon, U., 2003. Superfamilies of evolved and designed networks. *Science* 303, 1538–1542.
- Mutalik, V.K., Aditya, P.S., Edwards, J.S., Venkatesh, K.V., 2004. Robust global sensitivity in multiple enzyme cascade system explains how the downstream cascade structure may remain unaffected by cross-talk. *FEBS Lett.* 558, 79–84.
- Nakabayashi, J., Sasaki, A., 2005. Optimal phosphorylation step number of intracellular signal-transduction pathway. *J. Theor. Biol.* 233, 413–421.
- Pearce, A.K., Humphrey, T.C., 2001. Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways. *Trends Cell Biol.* 11, 426–433.
- Prank, K., Gabbiani, F., Brabant, G., 2000. Coding efficiency and information rates in transmembrane signaling. *BioSystems* 55, 15–22.
- Prank, K., Waring, M., Ahlvers, U., Bader, A., Penner, E., Möller, M., Brabant, G., Schöfl, C., 2005. Precision of intracellular calcium spike timing in primary rat hepatocytes. *Syst. Biol.* 2, 31–34.
- Rao, C.V., Arkin, A.P., 2001. Control motifs for intracellular regulatory networks. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 3, 391–419.
- Salazar, C., Politi, A., Höfer, T., 2004. Decoding of calcium oscillations by phosphorylation cycles. In: Mamitsuka, H., Smith, T., Holzhütter, H.G., Kanehisa, M., DeLisi, C., Heinrich, R., Miyano, S. (Eds.), *Proceedings of the Fourth International Workshop on Bioinformatics and Systems Biology*. Kyoto, pp. 50–51.
- Sauro, H.M., Kholodenko, B.N., 2004. Quantitative analysis of signaling networks. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 86, 5–43.

- Schuster, S., Marhl, M., Höfer, T., 2002. Modelling of simple and complex calcium oscillations. From single-cell responses to inter-cellular signalling. *Eur. J. Biochem.* 269, 1333–1355.
- Schuster, S., Knoke, B., Marhl, M., 2005a. Differential regulation of proteins by bursting calcium oscillations—a theoretical study. *BioSystems* 81, 49–63.
- Schuster, S., Klipp, E., Marhl, M., 2005b. The predictive power of molecular network modelling—case studies of predictions with subsequent experimental verification. In: Eisenhaber, F. (Ed.), *Discovering Biomolecular Mechanisms With Computational Biology*. Landes Bioscience, Georgetown, pp. 115–127.
- Stelling, J., Klamt, S., Bettenbrock, K., Schuster, S., Gilles, E.D., 2002. Metabolic network structure determines key aspects of functionality and regulation. *Nature* 420, 190–193.
- Stelling, J., Sauer, U., Szallasi, Z., Doyle, F.J., Doyle, J., 2004a. Robustness of cellular functions. *Cell* 118, 675–685.
- Stelling, J., Gilles, E.D., Doyle, F.J., 2004b. Robustness properties of circadian clock architectures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 13210–13215.
- Tyson, J.J., Chen, K.C., Novak, B., 2003. Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 221–231.
- Ulrich, L.E., Koonin, E.V., Zhulin, I.B., 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* 13, 52–56.
- Walker, S.A., Kupzig, S., Bouyoucef, D., Davies, L.C., Tsuboi, T., Bivona, T.G., Cozier, G.E., Lockyer, P.J., Buckler, A., Rutter, G.A., Allen, M.J., Philips, M.R., Cullen, P.J., 2004. Identification of a Ras GTPase-activating protein regulated by receptor-mediated  $Ca^{2+}$  oscillations. *EMBO J.* 23, 1749–1760.
- Wolf, D.M., Arkin, A.P., 2003. Motifs, modules and games in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 125–134.
- Wolf, J., Passarge, J., Somsen, O.J.G., Snoep, J.L., Heinrich, H., Westerhoff, H.V., 2000. Transduction of intracellular and inter-cellular dynamics in yeast glycolytic oscillations. *Biophys. J.* 78, 1145–1153.
- Yeger-Lotem, E., Sattath, S., Kashtan, N., Itzkovitz, S., Milo, R., Pinter, R.Y., Alon, U., Margalit, H., 2004. Network motifs in integrated cellular networks of transcription-regulation and protein–protein interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 5934–5939.
- Zaslaver, A., Mayo, A.E., Rosenberg, R., Bashkin, P., Sberro, I., Tsalyuk, M., Surette, M.G., Alon, U., 2004. Just-in-time transcription program in metabolic pathways. *Nat. Genet.* 36, 486–491.



## **B Ojačitev signalov v bioloških in električnih sistemih. Univerzalna vloga kaskad**

V prilogi je izvorni znanstveni članek z naslovom »Signal Amplification in Biological and Electrical Engineering Systems. Universal Role of Cascades«, ki je nastal v okviru doktorskega dela in je bil poslan v objavo v revijo **Biophysical Chemistry**.

# **OJAČITEV SIGNALOV V BIOLOŠKIH IN ELEKTRIČNIH SISTEMIH UNIVERZALNA VLOGA KASKAD**

*Vladimir Grubelnik<sup>1,2</sup>, Bogdan Dugonik<sup>3</sup>, Davorin Osebik<sup>3</sup>, Marko Marhl<sup>1,\*</sup>*

<sup>1</sup>Oddelek za fiziko, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Univerza v Mariboru,  
Koroška cesta 160, SI-2000 Maribor, Slovenija

<sup>2</sup>Inštitut za matematiko in fiziko, <sup>3</sup>Inštitut za elektroniko in telekomunikacije, Fakulteta za  
elektrotehniko, računalništvo in informatiko, Univerza v Mariboru,  
Smetanova 35, SI-2000 Maribor, Slovenija



# Signal Amplification in Biological and Electrical Engineering Systems.

## Universal Role of Cascades

Vladimir Grubelnik<sup>1,2</sup>, Bogdan Dugonik<sup>3</sup>, Davorin Osebik<sup>4</sup>, Marko Marhl<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Physics, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Maribor, Koroška cesta 160, SI-2000 Maribor, Slovenia

<sup>2</sup>Institute of Mathematics and Physics, <sup>3</sup>Laboratory of Electronic Systems, <sup>4</sup>Laboratory of Microcomputer Systems, Faculty of Electrical Engineering and Computer Science, University of Maribor, Smetanova 35, SI-2000 Maribor, Slovenia

**Correspondence to:**

Professor Marko Marhl, PhD

Dept. of Physics, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Maribor  
Koroška cesta 160, SI-2000 Maribor

Tel.: +386 2 2293643; Fax: +386 2 251 8180

E-mail: [marko.marhl@uni-mb.si](mailto:marko.marhl@uni-mb.si); URL: [www.marhl.com](http://www.marhl.com)

**Abstract** – In this paper we compare the cascade mechanisms of signal amplification in biological and electrical engineering systems, and show that they share the capacity to considerably amplify signals, and respond to signal changes both quickly and completely. For biological systems, these characteristics are crucial for efficient and reliable cellular signalling. We show that this highly-efficient biological mechanism of signal amplification that has naturally evolved is mathematically fully equivalent with some man-developed amplifiers, which indicates parallels between biological evolution and successful technology development.

**Key Words:** Multi-Stage Amplifier, Protein Cascade, Cellular Signalling, Laplacean transformation.

## 1. Introduction

Cellular signalling is one of the crucial processes enabling normal functioning of biological systems. The complexity of cellular signalling depends on the complexity of living organisms and on the cell type. In prokaryotes, for example, simple one- and two-component systems link external signals with cellular responses [1, 2]. In plant and animal cells, signalling networks can be highly complex, some networks comprising of 60 or more proteins [3]. The cell appears to use complex biochemical networks, in particular intracellular signalling cascades, to regulate multiple functions [4]. The control of gene expression, for example, typically involves the integration of many signals and employs complex enzymatic networks, which effectively implement logical functions [5, 6, 7]. In contrast, olfaction and photoreception involve simpler enzymatic cascades which may be thought of as adaptive amplifiers or transducers [8-10] that detect an extracellular stimulus and convert it into an intracellular signal that can effectively control the information content of the cellular output signal, i.e., neurotransmitter release [11].

Signal amplification is an important issue concerning inter- and intra-cellular signalling. The notion that a protein cascade could amplify signals was understood at least as far back as the 1960's [12, 13], particularly in relation to blood clotting [3]. Cascades have been classically viewed as signal amplifiers [14-16]. The amplification can be achieved in an enzymatic pushpull loop [17, 18]. Signalling pathways are made up of a complex web of enzyme cascades, some of which are known to be highly conserved across living systems [19]. Depending on their regulatory design, protein cascades have been shown to exhibit signal amplification [17, 18, 20-24]. The common view is that the multi-step protein kinase cascades allow large signal amplification, in the same way that a photo-multiplier tube converts a small pulse of photons into a large photocurrent, for example [14]. It has been proven mathematically that the overall sensitivity of a linear cascade is the product of the sensitivities at each level of the cascade [15, 25].

Protein cascades as amplifiers have been extensively studied. Not only the factor of amplification was of interest, but also how fast the signal arrives at its destination and how long the signal lasts [26-29]. For linear kinase-phosphatase cascades, Heinrich et al. [26] have shown that phosphatases have a more pronounced effect than kinases on the rate and duration of signalling, whereas signal amplitude is controlled primarily by kinases. Marhl and Grubelnik [30] show that protein kinase cascades enable converting oscillatory signals into sharp stationary step-like outputs. One of the most known properties of the signal cascade cycle is ultrasensitivity [17, 21, 23, 31, 32], that is, the property of both species in the cycle to switch rapidly in opposite directions in response to a change in the input signal. This behaviour is the resemblance to a man-made device, the transistor [3].

Several studies have been devoted to comparing biological cascade cycles with electronic circuits. For example, metabolic pathways have been compared with electronic circuits by Balaji [33]. Enzymatic amplification was analyzed in engineering terms of gain, bandwidth, noise and power [11]. Basic logic gates were constructed from single cascade cycles [3]. It has also been found that a protein cascade can function as a low-pass filter [34, 35] and as a band-pass filter [36, 37]. The cascades also play important role in filtering out noise [38].

In this paper we compare biological cascade cycles with electronic circuits. We analyse the effectiveness of protein cascades as amplifiers and compare their properties

with those of electrical amplifier consisting from a series of electrical amplifier wired in a cascade. We compare two main characteristics of the amplifiers: the factor of amplification and how close the form of an output signal is preserved compared to the input signal. As the criteria for optimal response we take a high factor of amplification and at the same time the preserved form of the input signal. The preservation of signal form is analysed mathematically by frequency spectra.

In electrical engineering, several active electronic elements are known, which are used as amplifiers. Well-known amplifiers are uni- and bi-polar transistors. The problem of these amplifiers is that their factors of amplification are rather low and do not usually exceed a factor of 100. Higher amplification factors can be obtained by appropriate wiring of these basic elements. One of most known examples of such combination of transistors is the differential amplifier, which is an integrative part of every operational amplifier. The term "operational amplifier" goes all the way back to about 1943 where this name has been coined by Ragazzinni and Philbrick [39].

Today the operational amplifier is almost indispensable part of any electronic circuit. Its factor of amplification depends on the frequency, since it acts as a low-pass frequency filter [40]. This is very similar to basic enzymatic amplifiers [11]. For protein cascades, *e.g.*, MAPK cascade [34, 35], it has been shown that they act as low-pass frequency filter. If an amplifier acts as a low-pass frequency filter, it means that higher frequencies are cut off and the output signal is deformed. The extent of the signal deformation depends on the frequency spectrum lost in this process.

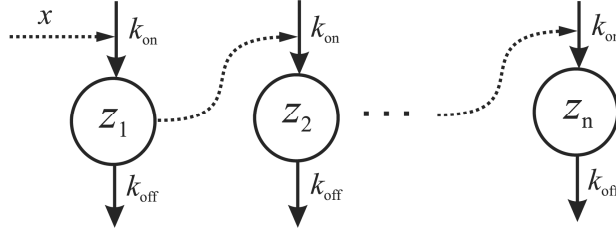
Operational amplifiers can further be combined into cascades in order to get larger amplifications. This is known as multi-stage amplifier. In the present paper multi-stage electrical amplifier are compared with multi-step protein cascades acting as biological amplifiers. We show that a direct analogy between the electrical and biological amplifiers exists. Moreover, mathematical evidence is given that the dynamics of both amplifiers is identical if for protein cascades linearised equations are considered. Our results show that cascades play crucial role in both electrical and biological amplifiers in order to achieve high amplification factors and fast response to input signals, which preserve the form of input signals.

The paper is organised as follows. First, signal amplification in biological cells is analysed by using a simple mathematical model for 1-step and multi-step protein cascades. In particular, frequency characteristics of the cellular amplifiers are analysed. In Section 3 multi-stage electrical amplifiers are studied. In the last two sections a detailed comparison between the biological and electrical amplifiers is provided. We mathematically confirm the analogy between the linearised set of model equations describing the dynamics of the biological amplifier and the equations for the multi-stage electrical amplifier.

## **2. Signal amplification in biological cells**

In biological cells, protein cascades act as signal amplifiers. We take a simplified model for protein cascades activated by  $\text{Ca}^{2+}$  in which each kinase has only one phosphorylation site [26, 29, 30, 37]. The scheme of the protein cascade is shown in Figure 1. At the first level the proteins are activated by  $\text{Ca}^{2+}$  binding, than the activated first-level proteins further activate the proteins at the second level, etc. The concentration of the free cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in the cell is denoted by  $x$ , active forms of

proteins at  $i$ -th level by  $z_i$ ,  $i=1,2,\dots,n$ , and the kinetic constants for binding and dissociation by  $k_{\text{on}}$  and  $k_{\text{off}}$ , respectively.



**Figure 1:** Schematic presentation of the protein cascade.

### 2.1. Mathematical model of cellular amplifier

The dynamics of the protein activation at the  $i$ -th level is gained by the following differential equations:

$$\frac{dz_1}{dt} = k_{\text{on}}x(z_{\text{tot}} - z_1) - k_{\text{off}}z_1. \quad (1a)$$

$$\frac{dz_i}{dt} = k_{\text{on}}z_{i-1}(z_{\text{tot}} - z_i) - k_{\text{off}}z_i, \quad i = 2, 3, \dots, n. \quad (1b)$$

For simplicity reasons,  $k_{\text{on}}$ ,  $k_{\text{off}}$ , and  $z_{\text{tot}}$  have the same values in all cascade levels. This also seems to be of some physiological importance since for the steady-state responses of protein kinase networks it has been shown that the most efficient cascade design for generating sharp signals has equal on rates, and to achieve the highest amplification and the shortest duration response, the cascade should have equal off rates [28]. In all calculations  $z_{\text{tot}} = 100\mu\text{M}$ , whereas values for  $k_{\text{on}}$ ,  $k_{\text{off}}$  changes and are specified in the text and figure captions for particular calculations.

### 2.2. Results for cellular amplifiers

We analyse responses of the protein cascade amplifier to a step-like input signal, which can be mathematically described as:

$$x(t) = \begin{cases} x_{\text{max}}, & \text{if } t_{\text{init}} < t < d \\ x_{\text{min}}, & \text{else} \end{cases}, \quad (2)$$

where  $x_{\text{min}}$  and  $x_{\text{max}}$  are the minimum and maximum of the input signal, respectively,  $t_{\text{init}}$  is the initial quiescent time, and  $d$  is the duration of the signal. We take  $x_{\text{max}} = 1\mu\text{M}$  and  $x_{\text{min}} = 0\mu\text{M}$  in all calculations.

#### 2.2.1. Responses of the 1-step cascade amplifier

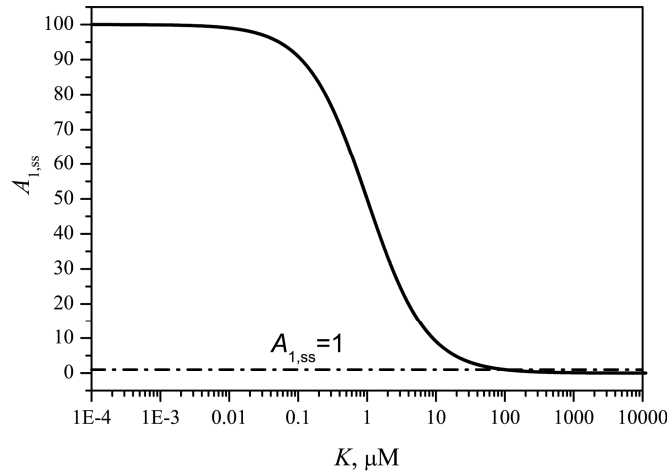
First we analyse responses of the 1-step cascade (Eq. (1a)) to the step-like input signal (Eq. (2)). The maximal amplification of the signal depends on the maximal steady-state value of  $z_1$ :

$$z_{1,\text{ss}} \Big|_{x=x_{\text{max}}} = \frac{x_{\text{max}}}{K + x_{\text{max}}} z_{\text{tot}}, \quad (3)$$

where  $K$  is the dissociation constant defined as  $K = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ . The maximal amplification,  $A_{1,ss}$ , is defined as the quotient between the  $z_{1,ss}|_{x=x_{\text{max}}}$  and the  $x_{\text{max}}$ :

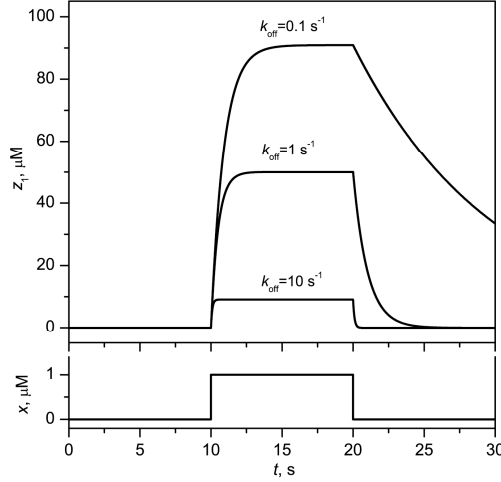
$$A_{1,ss} = \frac{z_{1,ss}|_{x=x_{\text{max}}}}{x_{\text{max}}} = \frac{1}{K + x_{\text{max}}} z_{\text{tot}} \quad (4)$$

Equation (4) shows that for a given value of  $x_{\text{max}}$  and  $z_{\text{tot}}$  the amplification is uniquely determined by  $K$ . For  $x_{\text{max}} = 1\mu\text{M}$  and  $z_{\text{tot}} = 100\mu\text{M}$  the amplification  $A_{1,ss}$  is presented in dependence on the dissociation constant  $K$  in Fig. 2. It is evident that for large amplifications small values of  $K$  are required.



**Figure 2:** Signal amplification  $A_{1,ss}$  in dependence on the dissociation constant  $K$ . Parameter values:  $x_{\text{max}} = 1\mu\text{M}$  and  $z_{\text{tot}} = 100\mu\text{M}$ . The dash-dotted line represents the lower boundary of signal amplification, *i.e.*,  $A_{1,ss} = 1$ .

Although the signal amplification is uniquely defined by the dissociation constant  $K$ , the form of the amplified output signal depends on the rate constants  $k_{\text{on}}$  and  $k_{\text{off}}$ . Figure 3 shows three amplified signals for a fixed value of  $k_{\text{on}}$  and three different values of  $k_{\text{off}}$ . The problem, demonstrated in Fig. 3, is that at high amplifications the form of the input signal is deformed and the question arises if high amplifications are possible with a well-preserved form of the input signal.



**Figure 3:** Amplified signals for three different values of  $k_{\text{off}}$ . The value of  $k_{\text{on}}$  is constant,  $k_{\text{on}} = 1 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ .

A simple mathematical analysis shows how the form of amplified signals depends on the rate constants  $k_{\text{on}}$  and  $k_{\text{off}}$  (see also [37]). When the input signal turned on, *i.e.*,  $x = x_{\text{max}}$ , the protein dynamics is determined by the following function:

$$z_1 = z_{1,ss} \left( 1 - e^{-(k_{\text{off}} + k_{\text{on}} x_{\text{max}})t} \right). \quad (5)$$

When the input signal turned off, *i.e.*,  $x = x_{\text{min}} = 0 \mu\text{M}$ , the protein dynamics can be described as:

$$z_1 = z_{1,ss} e^{-k_{\text{off}} t}. \quad (6)$$

By using Eqs. (5) and (6) the times of switch-on,  $t_{\text{on}}$ , and switch-off,  $t_{\text{off}}$ , can be calculated. The  $t_{\text{on}}$  is defined as the time in which  $z_1$  changes its value from 10% to 90% of the  $z_{1,ss}$ :

$$t_{\text{on}} = \ln \left( \frac{1 - \gamma_1}{1 - \gamma_2} \right) \frac{1}{k_{\text{off}} + k_{\text{on}} x_{\text{max}}}, \quad (7)$$

where  $\gamma_1 = 0.9$  and  $\gamma_2 = 0.1$ . The switch-off time,  $t_{\text{off}}$ , is defined as the time in which the  $z_1$  changes its value from 90% to 10% of the  $z_{1,ss}$ :

$$t_{\text{off}} = \ln \left( \frac{\gamma_2}{\gamma_1} \right) \frac{1}{k_{\text{off}}}. \quad (8)$$

Equations (7) and (8) show that for sharp step-like responses large values of  $k_{\text{on}}$  and  $k_{\text{off}}$  are required; then  $t_{\text{on}}$  and  $t_{\text{off}}$  are small. If at the same time the signals should be highly amplified, the ratio  $K = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  has to be small according to Eq. (4). This means that for high amplified sharp step-like responses we need small values of  $K$  and large values of  $k_{\text{on}}$  and  $k_{\text{off}}$ . If  $k_{\text{off}}$  needs to be large, and at the same time  $K$  should be small, then the  $k_{\text{on}}$  has to be very large, *i.e.*,  $k_{\text{on}} \gg k_{\text{off}}$ . The problem is that for sharp step-like and highly amplified signals very large values of  $k_{\text{on}}$  would be needed, which mostly exceed the physiological values (*e.g.* [41]). One can conclude that for



physiologically relevant values of the rate constants signal amplification, in which signals would be highly amplified and their form preserved, is not possible with 1-step protein cascades. The signal either preserves its form and is weakly amplified, or the input signal is highly amplified but changes its form (see Fig. 2). In the next paragraph we show that the problem can be solved by  $n$ -step protein cascades.

### 2.2.2. Responses of the $n$ -step cascade amplifier

Similar to Eq. (3) the maximal steady-state concentrations of activated proteins at each cascade level are given by:

$$z_{i,ss} \Big|_{x=x_{\max}} = \frac{z_{i-1,ss} \Big|_{x=x_{\max}}}{K + z_{i-1,ss} \Big|_{x=x_{\max}}} z_{\text{tot}}, \quad i = 1, 2, 3, \dots, n, \quad (9)$$

where  $z_{0,ss} \Big|_{x=x_{\max}} = x_{\max}$ . The steady-state concentrations of activated proteins depends recursively on each other:

$$z_{i,ss} \Big|_{x=x_{\max}} = a_i z_{i-1,ss} \Big|_{x=x_{\max}} = A_{i,ss} x_{\max}, \quad (10)$$

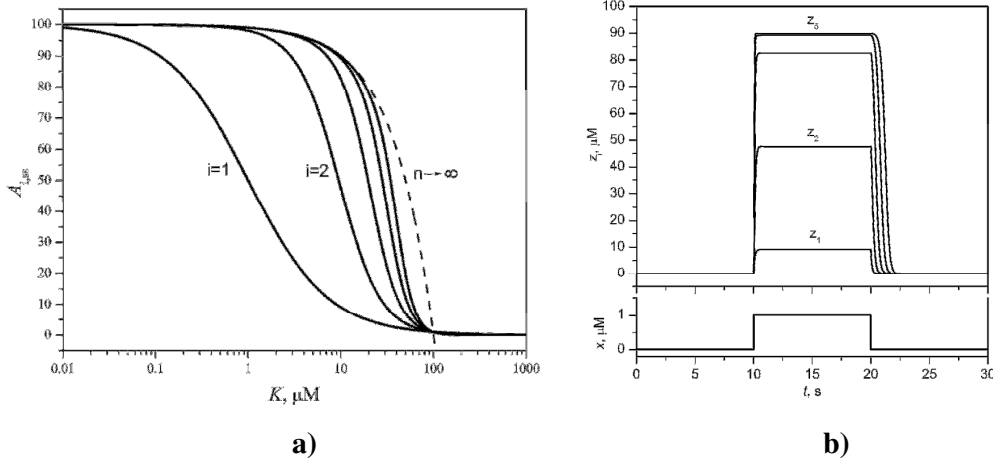
where  $a_i = z_{\text{tot}} / \left( K + z_{i-1,ss} \Big|_{x=x_{\max}} \right)$  and  $A_{i,ss} = a_1 a_2 \dots a_i$ . Taking into account relations  $A_{i,ss} = A_{i-1,ss} a_i$  and  $z_{i-1,ss} = A_{i-1,ss} x_{\max}$ , the maximal signal amplification at the  $i$ -th cascade level,  $A_{i,ss}$ , is given by the following expression:

$$A_{i,ss} = \frac{A_{i-1,ss}}{K + A_{i-1,ss} x_{\max}} z_{\text{tot}}, \quad i = 1, 2, 3, \dots, n, \quad (11)$$

where  $A_{0,ss} = 1$ . In Fig. 4a the maximal signal amplification  $A_{i,ss}$  is presented in dependence on the dissociation constant  $K$ . The results, given for five different cascade levels, indicates the convergence of the amplification for  $i \rightarrow \infty$ . When  $A_{i,ss}$  converges to a limit value, then  $A_{i,ss} \approx A_{i-1,ss}$  for  $i \rightarrow \infty$ , and by using Eq. (11) the limit  $A_{n,ss \rightarrow \infty}$  can be estimated by the following expression (dashed line in Fig. 4a):

$$A_{n,ss \rightarrow \infty} = \frac{z_{\text{tot}} - K}{x_{\max}}. \quad (12)$$

Figure 4a shows that multi-step cascades with increasing  $i$  enable large amplifications also at higher values of  $K$ . This solves the previous problem of the 1-step cascade, where due to the condition  $k_{\text{on}} \gg k_{\text{off}}$ , very large values of  $k_{\text{on}}$  were needed in order to obtain small values of  $K = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  and hence large signal amplifications. Figure 4b demonstrates the effectiveness of a multi-step cascade amplifier for the same parameter values as taken in Fig. 3, *i.e.*,  $k_{\text{on}} = 1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  and  $k_{\text{off}} = 10\text{s}^{-1}$ . It is evident that the output signal is efficiently amplified and the form of the input signal is well preserved. The switch-off of the output signal is characterised by a time delay, the so-called memory time, appearing as a consequence of the chain-protein-deactivation (see [30]).



**Figure 4:** (a) Signal amplification,  $A_{i,ss}$ , for  $i=1,2,\dots,5$ , in dependence on the dissociation constant  $K$ . Parameter values:  $x_{\max} = 1\mu\text{M}$ ,  $z_{\text{tot}} = 100\mu\text{M}$ . The limit  $A_{i,ss \rightarrow \infty}$  is indicated by the dashed line. (b) Amplified signals obtained by  $i$ -step cascades, where  $i=1,2,\dots,5$ ,  $k_{\text{on}} = 1\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , and  $k_{\text{off}} = 10\text{s}^{-1}$ .

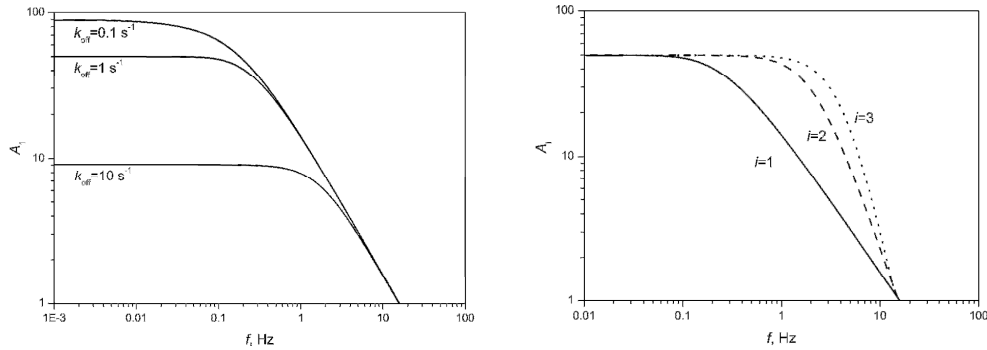
### 2.2.3 Frequency characteristics of cellular amplifiers

A comparison of Figs. (3) and (4b) shows that signal amplification is possible both with 1-step cascade and multi-step cascades. However, the signal amplification with multi-step cascades is much more useful since the form of the signal is better preserved. To quantify mathematically in how much extent the form of the input signal is preserved by the signal amplification, we analyse the frequency characteristics of the amplifiers.

In Fig. 5a the frequency characteristics of the 1-step cascade amplifier is shown for exactly the same parameter values as taken in Fig. 3. The characteristics was obtained by inserting  $x(t) = x_{\max} \sin(\omega t)$ , where  $\omega = 2\pi f$ , into Eq. (1a) and plotting the ratio between the amplitudes of output and input signal,  $A_1 = z_{1,\max}/x_{\max}$ , vs.  $f$ . The results show that the amplifier acts as a low-pass frequency filter, which means that higher frequency are cut off and the output signal is correspondingly deformed. The extent of the signal deformation depends on the frequency spectrum lost in this process. We see that the smallest portion of the high-frequency spectrum is cut off for  $k_{\text{off}} = 10\text{s}^{-1}$ , which is fully in accordance with the best preserving form of the signal in Fig. 3. It is also evident that  $A_1 \rightarrow A_{1,ss}$  for  $f \rightarrow 0$ , which is in accordance with Eq. (4).

How the frequency characteristic of a 1-step amplifier is improved by higher levels of cascades, is shown in Fig. 5b for the case of amplification  $A_{i,ss} = 50$ , as obtained in Fig. 5a for  $k_{\text{off}} = 1\text{s}^{-1}$ . It should be noted, however, if we would like to preserve the same amplification  $A_{i,ss} = 50$  (see Eq. (11)) for all  $i$ , the values of  $k_{\text{off}}$  have to be accordingly modified; in our case:  $k_{\text{off}} = 1\text{s}^{-1}$  for the 1-step cascade amplifier,  $k_{\text{off}} = 9.51\text{s}^{-1}$  for the 2-step cascade amplifier, and  $k_{\text{off}} = 19.7\text{s}^{-1}$  for the 3-step cascade amplifier. The characteristics in Fig. 5b were calculated in the same way as

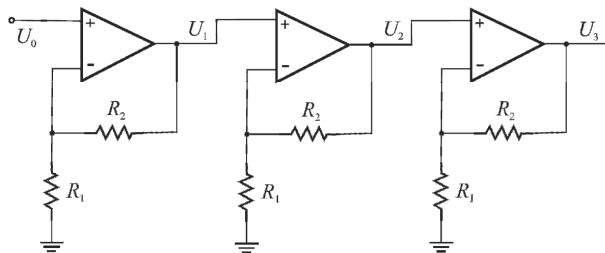
in Fig. 5a, by inserting  $x(t) = x_{\max} \sin(\omega t)$  into Eq. (1a) and plotting the corresponding  $A_i = z_{i,\max} / x_{\max}$  vs.  $f$ .



**Figure 5:** (a) Frequency characteristics of the 1-step amplifier for the same parameter values as taken in Fig. 3. (b) Frequency characteristics of the  $i$ -step cascade amplifier; solid line: 1-step cascade amplifier,  $k_{\text{off}} = 1 \text{ s}^{-1}$ ; dashed line: 2-step cascade amplifier,  $k_{\text{off}} = 9.51 \text{ s}^{-1}$ ; dotted line: 3-step cascade amplifier,  $k_{\text{off}} = 19.7 \text{ s}^{-1}$ .

### 3. Cascade amplifiers in electrical engineering

Cascade amplifiers are also well-known in electrical engineering [40]. In Fig. 6a a cascade of three non-inverting operational amplifiers is presented. The  $U_0$  is the voltage of the input signal, and  $U_1$ ,  $U_2$  in  $U_3$  are the voltages of the amplified output signals at the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, and 3<sup>rd</sup> cascade step, respectively. The amplification is defined by resistors  $R_1$  and  $R_2$ .

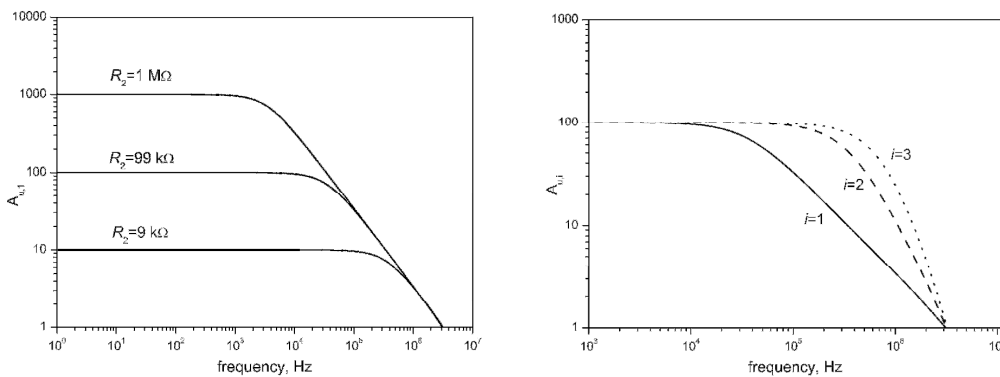


**Figure 6:** Three non-inverting operational amplifier stages connected into a cascade.

First we analyse signal amplification for only one operational amplifier TL082. We take  $U(t) = U_0 \sin(\omega t)$  as the input signal and measure the amplified output signal. We simulate the experiment with the computer program “Electronics Workbench – Multisim 9” [42]. The results are presented in Fig. 7a. The maximal amplification of the 1-stage amplifier,  $A_{u,1}$ , is defined as the quotient between the maxima of the output,  $U_1$ , and the input signal,  $U_0$ , i.e.,  $A_{u,1} = U_1 / U_0$ . The simulation was carried out for three different values of  $R_2$ , while  $R_1$  is constant,  $R_1 = 1 \text{ k}\Omega$ . Figure 7a shows that larger amplifications are obtained for larger values of  $R_2$ . However, despite the larger signal amplifications for larger values of  $R_2$ , the maximum operating frequency of the

amplifiers are higher for smaller values of  $R_2$ . This resembles the situation observed for cellular amplifiers in Fig. 5a.

When simulating the signal amplification by the three-stage amplifier (using TL082), the results (Fig. 7b) resemble those obtained in Fig. 5b. Figure 7b shows that the frequency characteristic of the 1-step amplifier can be significantly improved by higher levels of cascades. We improve the frequency characteristics of the 1-step amplifier shown in Fig. 7a for  $R_2 = 99\text{k}\Omega$ . The amplification  $A_{u,i} = 100$  (in stationary state, i.e., for  $f \rightarrow 0$ ) is hold constant, whereas the number of cascade levels,  $i$ , is changed. This requires concomitant changing of the resistance  $R_2$ ; in our case:  $R_2 = 99\text{k}\Omega$  for the one-stage,  $R_2 = 9\text{k}\Omega$  for the two-stage, and  $R_2 = 3.64\text{k}\Omega$  for the three-stage amplifier.



**Figure 7:** Results of signal amplification for operational amplifier TL082. (a) Frequency characteristics of the one-stage amplifier for  $R_1 = 1\text{k}\Omega$ . (b) Frequency characteristics of the  $i$ -stage amplifier. Solid line: 1-stage amplifier,  $R_2 = 99\text{k}\Omega$ ; dashed line: 2-stage amplifier,  $R_2 = 9\text{k}\Omega$ ; dotted line: 3-stage amplifier,  $R_2 = 3.64\text{k}\Omega$ ; in all cases  $R_1 = 1\text{k}\Omega$ .

Similar to Figs. 5a and 5b, also Figs. 7a and 7b show that multi-stage amplifiers have higher cut-off frequency than the one-stage amplifier. At a given amplification rate, the output signals amplified with the multi-stage amplifiers preserve the original form of the input signal at a much higher degree.

#### **4. Comparison of mechanisms of signal amplification in biological and electrical engineering systems**

By comparing the results for signal amplification in biological cells and electrical circuits (Figs. 5 and 7) we see that cascades represent a unique mechanism in providing significant amplifications of input signals and enable very short turn-on and turn-off switching times which results in clear and reliable responses of the systems. In order to analyse these mechanisms of amplification even further and to compare their common characteristics also from the mathematical point of view, we need to construct the corresponding mathematical model for electrical signal amplification presented in Fig. 7. The mathematical model is constructed on the basis of the amplifier gain characteristic obtained in Fig. 7a. In order to describe the gain characteristic

mathematically, we start with the well-known general description of the gain characteristic for one-stage operational amplifier [40]:

$$A_{u,1}(\omega) = \frac{A_{CL}}{1 + \frac{j\omega}{\omega_c}}. \quad (13)$$

where  $\omega_c$  is the cut-off frequency for a rapid decrease in the  $A_{u,1}(\omega)$ , and  $A_{CL}$  is the closed-loop gain with feedback. The feedback path is determined by the resistances  $R_1$  and  $R_2$  (see Fig. 6), and the amplitude of the closed-loop gain,  $A_{CL}$ , can be expressed as:

$$A_{CL} = 1 + \frac{R_2}{R_1}. \quad (14)$$

The amplitude of the frequency-dependent gain  $A_{u,1}(\omega)$  decreases rapidly at frequencies higher than  $\omega_c$ , so that high amplification is limited to the frequencies within the bandwidth:

$$\omega_c = \left(1 + \frac{A_{OL}}{1 + R_2/R_1}\right)\omega_{OL}, \quad (15)$$

where  $\omega_{OL}$  is the cut-off frequency of the open-loop gain  $A_{OL}$ , when the feedback path is open.

Taking into account specific characteristics for the operational amplifier TL082,  $A_{OL} = 2 \cdot 10^5$  and  $\omega_{OL} = 2\pi \cdot 20s^{-1}$  [43], Eqs. (13-15) represent the mathematical description of the results presented in Fig. 7a.

To be able to compare the amplification mechanisms in electrical engineering and biological systems, we transform Eqs. (13-15) from the frequency space into the time space. We apply the Laplacean transformation. In Eq. 13 the variable  $j\omega$  is replaced by the Laplacean operator  $s$ , and by considering  $A_{u,1} = U_1/U_0$ , Eq. 13 is transformed into the following differential equation:

$$\frac{dU_1}{dt} = \omega_c A_{CL} U_0 - \omega_c U_1, \quad (16a)$$

which determines the time course of the output signal  $U_1(t)$  in response to the given input signal  $U_0(t)$ . For the system of operational amplifiers as presented in Fig. 6, we then have:

$$\frac{dU_i}{dt} = \omega_c A_{CL} U_{i-1} - \omega_c U_i, \quad i = 1, 2, 3, \dots, n. \quad (16b)$$

Now we are able to compare directly the mathematical model for the electrical engineering amplifier, given by Eqs. (16a,b), and the mathematical model for the biological amplifier, given by Eqs. (1a,b). If the system of model Eqs. (1a,b) is linearized for  $z_i \ll z_{tot}$ , as usually considered in the modelling of protein kinase cascades [11, 28, 29], we obtain the following equations for the biological amplifier:

$$\frac{dz_1}{dt} = k_{off} \frac{z_{tot}}{K} x - k_{off} z_1, \quad (17a)$$

$$\frac{dz_i}{dt} = k_{off} \frac{z_{tot}}{K} z_{i-1} - k_{off} z_i. \quad i = 1, 2, 3, \dots, n. \quad (17b)$$

Equations (17a,b) are fully equivalent to Eqs. (16a,b), which mathematically confirms the observed analogy between the presented results for biological and electrical amplifiers. In particular, the maximal amplification  $z_{tot}/K$  is directly related

to  $A_{CL}$ , and  $k_{off}$  to  $\omega_c$ . As the cut-off frequency  $\omega_c$  determines the boundary of low-pass filtering in electrical systems, the  $k_{off}$  plays equivalent role in the biological system.

## 5. Summary and discussion

In this paper the analogy between signal amplification in biological and electrical engineering systems is presented. It is shown that basic mechanisms of multi-stage signal amplification by protein cascades in biological cells and operational amplifiers in electrical engineering systems are mathematically identical. Both for biological and electrical amplifiers the cascades play the key role in assuring highly amplified output signals with short turn-on and turn-off times, which attribute clear and reliable signalling in biological and electrical engineering systems.

According to the mathematical description of biological and electrical engineering amplifiers presented in this paper, the analogy between multi-step protein cascades and multi-stage operational amplifiers is well established. For example, with protein cascades high amplifications are obtained by reducing values of  $k_{off}$  at a given  $k_{on}$  (Eq. 11), and analogously, the multi-stage operational amplifiers provide large amplifications when  $R_1$  is reduced at a given  $R_2$  (Eq. 15). Eqs. (16) and (17) show that  $k_{off}$  in biological systems plays similar role as  $\omega_c$  in operational amplifiers.

The analogy between the multi-step protein cascades and multi-stage operational amplifiers can also be well established by comparing both switching times. Similar to the expressions for switching times in biological amplifiers,  $t_{on}$  and  $t_{off}$  (Eq. (7) and Eq. (8), respectively), we can also calculate the switch-on,  $t_{on,e}$ , and switch-off,  $t_{off,e}$ , times for operational amplifiers:

$$t_{on,e} = \ln\left(\frac{1-\gamma_1}{1-\gamma_2}\right) \frac{1}{\omega_c}, \quad (19)$$

$$t_{off,e} = \ln\left(\frac{\gamma_2}{\gamma_1}\right) \frac{1}{\omega_c}. \quad (20)$$

Here again we see the analogous roles of  $k_{off}$  in protein cascades (Eqs. (7) and (8)) and that of the  $\omega_c$  in operational amplifiers (Eqs. (19) and (20)).

It should be noted that the cascades considerably enlarge the  $\omega_c$  in electrical and the  $k_{off}$  in biological systems, which reduces both the switch-on and switch-off time, and the output signal closely follow the input. The larger bandwidth of the signalling pathway (determined by larger  $\omega_c$ ) represents a higher information capacity of the pathway, i.e., much more information can be transmitted through the pathway per unit time [44].

Figs. 5 and 7 show qualitatively equivalent responses of the studied biological and electrical amplifiers. This equivalency has also been mathematically confirmed by Eqs. (16) and (17). Both in biological and electrical engineering systems turn out that wiring of amplifiers into cascades enable larger signal amplifications and considerably contribute in preserving the form of the input signals. The analyses in the frequency space show that protein cascades and operational amplifiers both act as low-pass filters (Figs. 5 and 7). For protein cascades as well as for operational amplifiers the frequency spectrum is enlarged if the amplification rates of particular amplifiers in the cascade are smaller (Figs. 5a and 7a). Although amplification rates of particular amplifiers in the cascade are smaller, a desired high amplification is achieved by the cascade since the amplification equals to the product of all particular amplifications of the ingredient

partial amplifiers. At the same time, due to the higher permeability of the particular low-pass filters of the ingredient-amplifiers in the cascades, the multi-stage amplifier is also characterised by a higher permeability for higher frequencies (Figs. 5b and 7b). This higher permeability for the frequencies importantly contributes in preserving the initial form of input signals and hence enables high performance of cascade amplifiers in order to have high amplifications and keeping the form of the input signal at the same time.

It should be pointed out that the role of cascades in providing a common mechanism of signal amplification in biological and electrical engineering systems is of particular importance for efficient and reliable functioning of biological and electrical engineering systems. As they enable large amplifications of the input signals with extremely fast turn-on and turn-off characteristics, the protein cascades play crucial role in providing efficient and reliable cellular signalling. It is indeed impressive that these extremely efficient, evolutionary developed, biological mechanisms are mathematically fully equivalent with the man-developed technical systems, which indicates the successful way of technology development.

## References

- 1 R. Alves and M.A. Savageau, Comparative analysis of prototype two-component systems with either bifunctional or monofunctional sensors: differences in molecular structure and physiological function, *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 25-51.
- 2 L.E. Ulrich, E.V. Koonin and I.B. Zhulin, One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes, *Trends Microbiol.* 13 (2005) 52-56.
- 3 H.M. Sauro and B.N. Kholodenko, Quantitative analysis of signaling networks, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 86 (2004) 5-43.
- 4 R.S. Neves and R. Iyengar, Modeling of signaling networks, *BioEssays* 24 (2002) 1110-1117.
- 5 D. Bray, Protein molecules as computational elements in living cells, *Nature* 376 (1995) 307-312.
- 6 G.A. Wray, Promoter logic, *Science* 279 (1998) 1871-1872.
- 7 M. Ptashne, *Genetic Switch: Phage Lambda and Higher Organisms* (Cell Press, Blackwell Scientific Publications, 2nd edn. 1992).
- 8 R.R. Reed, How does the nose know?, *Cell.* 60 (1990) 1-2.
- 9 L. Stryer, Visual excitation and recovery, *J. Biol. Chem.* 266 (1991), 10711-10714.
- 10 D.E. Koshland, Biochemistry of sensing and adaptation, *Trends Biochem. Sci.* 5 (1980), p. 297.
- 11 P.B. Detwiler, S. Ramanathan, A. Sengupta and B.I. Shraiman, Engineering aspects of enzymatic signal transduction: photoreceptors in the retina, *Biophys J.* 79 (2000) 2801-2817.
- 12 G. Wald, Visual excitation and blood clotting, *Science* 150 (1965) 1028-1030.
- 13 S.M. Levine, Enzyme amplifier kinetics, *Science* 152 (1966) 651-653.
- 14 J.E. Ferrell, Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs, *Trends Biochem. Sci.* 21 (1996) 460-466.
- 15 G.C. Brown, J.B. Hoek and B.N. Kholodenko, Why do proteins have more than one level?, *Trends Biochem. Sci.* 22 (1997) p. 288.
- 16 G. Pearson, F. Robinson, T. Gibson, B.E. Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. Cobb, Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions, *Endocr Rev.* 22 (2001) 153-183.

- 17 E.R. Stadtman and P.B. Chock, Superiority of Interconvertible Enzyme Cascades in Metabolic Regulation: Analysis of Multicyclic Systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74 (1977) 2766-2770.
- 18 D.E. Koshland, A. Goldbeter and J.B. Stock, Amplification and adaptation in regulatory and sensory systems, *Science* 217 (1982) 220-225.
- 19 C. Widmann, S. Gibson, M.B. Jarpe and G.L. Johnson, Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human, *Physiol. Rev.* 79 (1999) 143-180.
- 20 P.B. Chock, S.G. Rhee and E.R. Stadtman, Interconvertible enzyme cascades in cellular regulation, *Annu. Rev. Biochem.* 49 (1980) 813-843.
- 21 A. Goldbeter and D.E. Koshland, An Amplified Sensitivity Arising from Covalent Modification in Biological Systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 6840-6844.
- 22 A. Goldbeter and D.E. Koshland, Sensitivity amplification in biochemical systems, *Q. Rev. Biophys.* 15 (1982) 555-591.
- 23 A. Goldbeter and D.E. Koshland, Ultrasensitivity in biochemical systems controlled by covalent modification. Interplay between zero-order and multisteps effects, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 14441-14447.
- 24 V.K. Mutalik, A.P. Singh, J.S Edwards and K.V. Venkatesh, Robust global sensitivity in multiple enzyme cascade system explains how the downstream cascade structure may remain unaffected by cross-talk, *FEBS Letters* 558 (2004) 79-84.
- 25 B.N. Kholodenko, J.B. Hoek, H.V. Westerhoff and G.C. Brown, Quantification of information transfer via cellular signal transduction pathways, *FEBS Letters* 414 (1997) 430-434.
- 26 R. Heinrich, B.G. Neel and T.A. Rapoport, Mathematical models of protein kinase signal transduction, *Mol. Cell.* 9 (2002) 957-970.
- 27 K. Mayawala, C.A. Gelmi and J.S. Edwards, MAPK cascade possesses decoupled controllability of signal amplification and duration, *Biophys J.* 87 (2004) L01-L03.
- 28 M. Chaves, E.D. Sontag and R.J. Dinerstein, Optimal length an signal amplification in weakly activated signal transduction cascades, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 15311-15320.
- 29 J. Nakabayashi and A. Sasaki, Optimal phosphorylation step number of intracellular signal-transduction pathway, *J. theor. Biol.* 233 (2005) 413-421.
- 30 M. Marhl and V. Grubelnik, Role of cascades in converting oscillatory signals into stationary step-like responses, *Biosystems* 87 (2007) 58-67.
- 31 D.E. Koshland, A. Goldbeter and J.B. Stock, Amplification and Adaptation in Regulatory and Sensory Systems, *Science* 217 (1982) 220-225.
- 32 D. Fell, *Understanding the Control of Metabolism* (Portland Press, 1997).
- 33 S. Balaji and S. Lakshminarayanan, Conceptual comparison of metabolic pathways with electronic circuits, *Journal of Bionics Engineering* 1 (2004) 175-182.
- 34 K.H. Chiam, V. Bhargava, G. Rajagopal, Oscillatory dynamics in the mitogen-activated protein kinase cascade, *Computational Systems Bioinformatics Conference, Stanford, California* (2005) 164-165.
- 35 P. Hersen, M.N. Mclean, L. Mahadevan and S. Ramanathan, Signal processing by HOG MAP kinase pathway, *PNAS* 105 (2008) 7165-7170.
- 36 A.P. Arkin, in: *Signal processing by biochemical reaction networks*, ed. J. Walleczek, *Self-Organized Biodynamics and Nonlinear Control* (Cambridge University Press, 2000) 112-144.



- 37 M. Marhl, M. Perc and S. Schuster, Selective regulation of cellular processes via protein cascades acting as band-pass filters for time-limited oscillations, *FEBS Lett.* 579 (2005) 5461-5465.
- 38 J.E. Ferrell, Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs, *Trends Biochem. Sci.* 21 (1996) 460-466.
- 39 J.R. Ragazzini, R.H. Randall, F.A. Russell, *Analysis of Problems in Dynamics by Electronic Circuits*, *Proceedings of the IRE* 35 (1947) 444-452.
- 40 F.B. Theodore, S.B. Jeffrey and R. Guillermo, *Electronic Devices and Circuits*, (Prentice Hall, 6th edn., 2004).
- 41 M. Falcke, Reading the patterns in living cells - the physics of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, *Adv. Phys.* 53 (2004) 255-440.
- 42 J. Adams, *Mastering Electronics Workbench* (McGraw-Hill, 1st edn. 2001).
- 43 National Semiconductor Corporation, <http://cache.national.com/ds/TL/TL082.pdf>, accessed April 2007.
- 44 C.E. Shannon, A mathematical theory of communication, *Bell. Syst. Tech. J.* 27 (1948) 379-423 and 623-656.



## **Kratek življenjepis s prikazom znanstveno raziskovalnega in strokovnega dela**

### **Osebni podatki**

*Ime in priimek:* Vladimir Grubelnik

*Naslov:* Fakulteta za elektrotehniko, računalništvo in informatiko, Univerza v Mariboru, Smetanova ulica 17, 2000 Maribor, Slovenija

*E-mail:* vlado.grubelnik@uni-mb.si

*tel.:* 041 792 566

*Rojstni podatki:* 15. 7. 1974, Slovenj Gradec, Slovenija

*Državljanstvo:* Slovensko

*Naslov doma:* Vladimir Grubelnik, Vorančeva 6, 2366 Muta

### **Izobraževanje**

(1989 – 1993) Srednja strojno-kovinarska šola Ravne na Koroškem

(1993 – 1998) Fakulteta za strojništvo, Univerza v Mariboru

(1994 – 1999) Pedagoška fakulteta, Univerza v Mariboru

1999- diploma na univerzitetnem programu Fizika, Pedagoška fakulteta, Univerza v Mariboru

2002- diploma o magisteriju znanosti s področja fizike – področje izobraževanja, Pedagoška fakulteta, Univerza v Mariboru

### **Habilitacije**

1999- prva izvolitev v naziv asistenta za fiziko, Pedagoška fakulteta, Univerza v Mariboru

2003- ponovna izvolitev v naziv asistenta za fiziko, Pedagoška fakulteta, Univerza v Mariboru

2006- ponovna izvolitev v naziv asistenta za fiziko, Pedagoška fakulteta, Univerza v Mariboru

## **Področje znanstveno raziskovalnega dela**

Na področju znanstveno raziskovalnega dela se ukvarjam z matematičnim modeliranjem enostavnih in kompleksnih oscilirajočih sistemov na primeru znotrajceličnih kalcijevih oscilacij in z možnostmi prenosa modeliranja iz znanstveno-raziskovalne sfere na področje izobraževanja.

V okviru raziskovalnega dela je bilo izdelano magistrsko delo z naslovom »Matematično modeliranje enostavnih in kompleksnih oscilirajočih sistemov«, ki ima dva temeljna poudarka. V prvem delu smo pokazali možnosti prenosa matematičnega modeliranja oscilirajočih sistemov z uveljavljenega znanstveno-raziskovalnega področja na področje izobraževalnega dela. V drugem delu pa je predstavljena obravnava kompleksnih oscilirajočih sistemov na aktualnem biofizikalnem področju intracelične signalizacije. Pokazali smo, da imajo mitohondriji pomembno vlogo pri regulaciji amplitude in s tem učinkoviti frekvenčni kodaciji regularnih in kaotičnih kalcijevih oscilacij. Iz rezultatov magistrskega dela izhajajo še nadaljnje aplikacije modeliranja v izobraževalni sferi.

S področja znotrajcelične signalizacije izhajajo še drugi prispevki, kjer smo uspeli pokazati vlogo proteinskih kaskad pri glajenju signalov s kratkim odzivnim časom in ohranjanju pulzne oblike ojačanega signala. Pokazali smo, kako lahko s pomočjo proteinskih kaskad, z oscilirajočim spreminjanjem kalcija v znotraj celičnem prostoru, povzročimo konstantno aktivacijo proteinov. Uspeli smo tudi pokazati, da proteinske kaskade predstavljajo mehanizem, ki zagotavlja ojačanje signalov v širokem frekvenčnem območju, kar zagotavlja ohranjanje oblike neharmoničnih signalov. Na podlagi teh raziskav temelji tudi doktorsko delo z naslovom »Ojačitev in glajenje kalcijevih celičnih signalov s primerjavo prenosa signalov v tehniki«, kjer v smislu lažjega razumevanja celične signalizacije prikažemo tudi mehanizme, ki omogočajo direktno primerjavo delovanja celične signalizacije s prenosom signalov v tehniki.

## **Področje pedagoškega dela**

Na Pedagoški fakulteti v Mariboru sem se 1. 11. 2000 zaposlil kot visokošolski sodelavec – asistent stažist, s 1. 11. 2002 sem bil razporejen na delovno mesto visokošolskega sodelavca – asistenta z magisterijem. Od 1. 10. 2003 sem kot asistent z magisterijem zaposlen na Fakulteti za elektrotehniko računalništvo in informatiko.

## Osebna bibliografija s področja doktorskega dela

### Izvirni znanstveni članki:

Grubelnik, V., Zahle Larsen, A., Kummer, U., Folke Olsen, L., Marhl, M. (2001) Mitochondria regulate the amplitude of simple and complex calcium oscillations. *Biophys. Chem.* 94: 59-74.

Grubelnik, V., Marhl, M. (2002) Frequency encoding of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 7(1): 129-131.

Marhl, M. in Grubelnik, V. (2007) Role of cascades in converting oscillatory signals into stationary step-like responses. *Biosystems*, 87: 58-67.

Grubelnik V., Dugonik B., Osebik D., Marhl M. (2008) Signal Amplification in Biological and Electrical Engineering Systems. Universal Role of Cascades. *Biophysical Chemistry*. Poslano v objavo.

### Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci

Grubelnik, V., Marhl, M. (2001) Frequency encoding of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals. International Conference on Life Sciences, Gozd Martuljek, Slovenia, 22.-26. 9. 2001. *Book of abstract with programme*, Slovenian Biophysical Society, Ljubljana, str. 162.

Grubelnik, V., Marhl, M. (2002) Kodiranost  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacij in pomen kaosa pri prenosu znotrajceličnih signalov. V: Robnik, Marko (ur.), Korošak, Dean (ur.). 1. simpozij fizikov Univerze v Mariboru, Maribor, 19. in 20. december 2002. *Zbornik povzetkov*. Maribor: CAMTP.

Grubelnik, V., Marhl, M. (2008) Pomen kaskad pri ojačitvi pulznih signalov v bioloških in elektronskih sistemih. V: Humar, Matjaž (ur.), Škarabot, Miha (ur.), CONRADI, Marjetka (ur.). 6. konferenca fizikov v osnovnih raziskavah, Podčetrtek, 7. november 2008. *Zbornik povzetkov*. Ljubljana: DMFA - založništvo, str. 66.



**UNIVERZA V MARIBORU**  
**FAKULTETA ZA NARAVOSLOVJE IN MATEMATIKO**

**IZJAVA**

Podpisani Vladimir Grubelnik izjavljam, da je doktorska disertacija z naslovom »Ojačitev in glajenje kalcijevih celičnih signalov s primerjavo prenosa signalov v tehniki«:

- rezultat lastnega raziskovalnega dela,
- da so rezultati korektno navedeni in
- da nisem kršil avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Vladimir Grubelnik

