

Zusammenfassung

In dieser Arbeit haben wir die Dynamik eines einzelnen IP_3R Clusters untersucht. Die Motivation bildete die fundamentale Rolle von Puffs in der Entstehung von Ca^{2+} Wellen. Das koordinierte Zusammenspiel von mehreren Puffs ist notwendig, um eine Welle auszulösen. Daher ist das Verstehen des Verhaltens eines einzelnen Clusters von zentraler Bedeutung für zukünftige Modellierung und die Interpretation von experimentellen Daten.

Wir haben die Werte der Ca^{2+} Konzentration und der Konzentrationsgradienten untersucht, die an einem Cluster auftreten. Es wurde eine Geometrie gewählt, die in vivo Bedingungen entspricht, d.h. wir haben den Ca^{2+} Fluß durch eine kleine Pore in der Membran des ER untersucht. Die Konzentrationen sind 2 bis 3 Größenordnungen höher als Volumen-Konzentrationen. Es treten enorme Gradienten wegen der starken Lokalisierung der Ca^{2+} Freisetzung auf. Dies läßt die theoretische Untersuchung der Ca^{2+} Dynamik in einem neuen Licht erscheinen. Die oft gemachte Annahme, daß die Steuerung des IP_3 Rezeptors durch die Volumen-Konzentrationen gegeben ist, kann nicht mehr aufrecht erhalten werden. Experimente und theoretische Arbeiten haben gezeigt, daß die Ca^{2+} aktivierenden Prozesse auf Konzentrationswerte nahe der Ruhekonzentration von etwa 100nM eingestellt sind. Die Dissoziationskonstanten der Inhibition liegen im Bereich von einigen μM . Daher führen die hohen Ca^{2+} Konzentrationen an einem offenen Cluster zur Sättigung der Kontrollmechanismen des IP_3 Rezeptors. Diese Einschränkung muß in kommenden Modellierungen berücksichtigt werden.

Unsere Resultate zeigen, dass die Ca^{2+} Ströme proportional zur Wurzel aus der Anzahl der offenen Kanäle sind. Dies gilt allgemein und führt zu neuen Interpretationen von experimentellen Daten. Wir haben Ergebnisse von Parker und Mitarbeitern über den Einfluß von IP_3 auf die Kontrolle der Kanalöffnung genauer untersucht. Unsere Resultate legen nahe, daß 2 IP_3 Moleküle und nicht mehr an den Rezeptor in einer nicht kooperativen Weise binden müssen. Wir haben die Auswirkungen von Puffern auf die Konzentrationsprofile getestet. Sie beeinflussen die Spitzenkonzentrationen kaum. Daher müssen die experimentellen Techniken, die Puffer zur Unterdrückung der Rückkopplung von Ca^{2+} auf den

Kanal verwenden, noch einmal überdacht werden. Wir haben bestätigt, daß die Kopplung zwischen benachbarten Clustern nur schwach ist, da der Anstieg der Ca^{2+} Konzentration in einer Entfernung von einigen Mikrometern von der Stelle des Puffs aus nur einige Nanomolar beträgt. Der zeitliche Zerfall der Ströme nach Beendigung der Ca^{2+} Freisetzung konnte an die Summe von 2 Exponentialfunktionen gefittet werden. Dies entspricht experimentellen Beobachtungen. Eine Interpretation im Hinblick auf die Kontrolldynamik des Rezeptors kann aber nicht gegeben werden. Insbesondere kann die Folgerung, daß es eine IP_3 abhängige Deaktivierung gibt, nicht gezogen werden. Unsere Simulationen haben gezeigt, dass unterstützende Diffusion eine untergeordnete Rolle spielt. Dies steht im Gegensatz zu bisherigen Überlegungen. Die Ergebnisse für die Signalmasse stimmen mit experimentellen Ergebnissen sehr gut überein. Zusammenfassend kann man sagen, dass unsere Ergebnisse als Richtschnur für zukünftige Modellierungen dienen, die die hohen Ca^{2+} Konzentrationen an einem offenen Cluster berücksichtigen müssen.

Die Konsequenzen, die sich aus einer so hohen Ca^{2+} Konzentration ergeben, wurden in Kapitel 3 dargestellt. Wir haben ein deterministisches Modell für die Ca^{2+} Freisetzung entwickelt, das die extreme Lokalisierung der Freisetzung beinhaltet und die Ergebnisse aus Kapitel 2 einschließt. Zu diesem Zweck haben wir einen neuen Zugang zur Beschreibung von Reaktionen zwischen einer räumlich fixierten und einer diffundierenden Spezies vorgestellt. Die unbewegliche Spezies ist auf kleine Räume beschränkt. Eine lineare Stabilitätsanalyse hat gezeigt, daß lineare Instabilitäten nur durch den diffusiven Reaktionspartner hervorgerufen werden können. Dies erleichtert die Durchführung erheblich und erlaubt eine weitgehend analytische Untersuchung. Die Rechnungen basieren auf schwachen Annahmen über die Geometrie des festen Reaktionspartners, die auf eine weite Klasse von Probleme zutrifft. Oszillationen, die in bisherigen deterministischen Modellen mit einer kontinuierlichen Dichte von IP_3 Rezeptoren auftreten, verschwinden, wenn wir die realistischen Konzentrationen aus Kapitel 2 zu Grunde legen. Es herrscht ein monostabiles Regime vor. Wir haben zusätzlich gezeigt, daß die Oszillationen, die in unserem Modell auftreten, nicht diejenigen sind, die man in Experimenten beobachtet. Auf der einen Seite ist das oszillatorische Regime zu klein und befindet sich bei unphysiologischen Parameterwerten. Auf der anderen Seite entsprechen die Amplituden der Oszillation nicht den gemessenen Werten.

Diese Resulte beweisen schließlich, daß deterministische Modelle, die nur IP_3 Aktivierung, Ca^{2+} Aktivierung und Ca^{2+} Inhibierung berücksichtigen, nicht die korrekten Mechanismen der IP_3 stimulierten Ca^{2+} Freisetzung widerspiegeln. Unsere Ergebnisse demonstrieren die Notwendigkeit eines stochastischen Ansatzes zur Modellierung der intrazellulären Ca^{2+} Dynamik. Fluktuationen spielen eine entscheidende Rolle und müssen bei jeder zukünftigen Untersuchung ernst genom-

men werden.

Demzufolge haben wir eine Mastergleichung und 2 entsprechende Fokker-Planck Gleichungen für die Dynamik eines IP_3R Clusters abgeleitet. Wir haben ein Zustandsschema für den IP_3 Rezeptor benutzt, das über die normalerweise verwendeten Schemata hinausgeht. Es berücksichtigt die Fluktuationen in den Ca^{2+} aktivierenden Prozessen. Im Gegensatz zu vorherigen Arbeiten, die die Kontroll-dynamiken des Rezeptors an die Volumen-Konzentration von Ca^{2+} gekoppelt haben, haben wir die Ergebnisse aus Kapitel 2 und 3 angewendet und die realistischen Parameterwerte implementiert. Wir haben den stochastischen Anteil der Puff-Frequenz für alle drei Modelle im Rahmen eines Übergangsprozesses berechnet. Dieser wird durch Fluktuationen getrieben, so daß das Rauschen in der Ca^{2+} Aktivierung nicht vernachlässigt werden darf. Auf der Zeitskala der Ca^{2+} Aktivierung können die Ca^{2+} inhibierenden Prozesse als zeitlich konstant angenommen werden. Daher haben wir die mittlere Übergangszeit mit einem eindimensionalen Modell ermittelt. Für die Mastergleichung und die Ω Entwicklung konnte dies analytisch durchgeführt werden. Für die gewählten Parameter ergab sich, daß der stochastische Anteil der Übergangszeit nicht von Kanalöffnungen begleitet ist. Dies ist ein unerwartetes Ergebnis, aber es bestätigt, daß wir in der Tat den stochastischen Anteil der Puff-Frequenzen berechnet haben. Wäre ein Kanal während des Übergangs aufgegangen, wäre die Interpretation der Übergangszeit als Puff-Frequenz fragwürdig.

Die Abschätzung des stochastischen Anteils stellt einen ersten Schritt einer umfassenden Analyse der Puff-Frequenzen und damit der Wellennukleation dar. Die Berechnung des verbleibenden Teils erfordert andere Techniken. Sobald ein Kanal öffnet, treten Gradienten wie in Abbildung 3.8 auf und beeinflussen deutlich die Dynamik des IP_3 Rezeptors. Hinzukommt, daß die Zeitskalentrennung zwischen Ca^{2+} Aktivierung und Ca^{2+} Inhibierung nicht mehr gegeben sein kann. Dies läuft auf eine genaue Untersuchung von Gleichung (4.1) hinaus. Das zweidimensionale Übergangsproblem stellt die natürliche Fortsetzung dieser Arbeit dar und wird in der Zukunft eingehend untersucht.

Diese Arbeit hat klar gezeigt, daß intrazelluläres Kalzium ein stochastisches Medium ist. Als strukturbildendes System bietet es faszinierende Eigenschaften. Grundlegende stochastische Ereignisse (Puffs) und deterministische Phänomene (Wellen) können gleichzeitig untersucht werden. Die Parameter, die die Kalziumdynamik gestalten, lassen sich einfach kontrollieren. Dies erhebt intrazelluläres Kalzium zu einem Modellsystem der Nichtgleichgewichts-Physik. Das Gebiet besitzt das Potential, das noch viele Arbeiten wie diese folgen werden.

Contents

Zusammenfassung	v
1 Introduction	1
2 Release currents and concentration profiles	9
2.1 Introduction	9
2.2 Methods and parameters	11
2.2.1 Fitting the single channel flux	13
2.2.2 Other parameter values	15
2.3 Results	17
2.3.1 Luminal parameters	23
2.3.2 Cytosolic buffers, spread of released Ca^{2+} in the cytosol . .	26
2.3.3 Long time scales, higher cluster density	31
2.4 Discussion	33
3 Stability of membrane bound reactions	41
3.1 Introduction	41
3.2 General Model	43
3.3 The De Young Keizer model	46
3.4 Calcium dynamics	52
3.5 Results	58
3.6 Conclusion	67

4 Fokker-Planck equations	69
4.1 Introduction	69
4.2 The master equation	71
4.3 Fokker-Planck equations	73
4.4 Waiting time distribution	79
4.4.1 General framework	79
4.4.2 Ca^{2+} dynamics	84
4.5 Discussion	90
5 Summary	95
Appendix	99
A.1 Combinatorics for subunits	99
A.2 Proof of equation (4.39)	103
A.3 Numerical methods	104
Bibliography	105
Danksagung	115