

# Modellierung von Calcium-Signalen in biologischen Zellen

## Dissertation

zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät II  
– Physik und Mechatronik –  
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von  
**Martin Peglow**

Saarbrücken  
2013

Tag des Kolloquiums: 03.06.2014

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Christian Wagner

Mitglieder des  
Prüfungsausschusses: Univ.-Prof. Dr. Heiko Rieger  
Univ.-Prof. Dr. Markus Hoth  
Univ.-Prof. Dr. Ludger Santen  
Dr. Hendrik Hähl

# Abstract

Calcium controls a multitude of vital processes in cells as diverse as fertilisation, proliferation or the humane immune defence. The activation of T-lymphocytes (T-cells) is very important for the human immune defence. The successful T-cell activation needs a high, long lasting and robust calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) signal. This raises the intriguing question of how T-cells overcome all those mechanisms nature provides to remove an increased  $\text{Ca}^{2+}$  level as fast as possible from the cytosol since under normal circumstances high cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations are lethal for the cell.

In this thesis different models were used to study the influence of T-cell polarization - a strong morphological change of the cell - on the  $\text{Ca}^{2+}$  signals and thus on T-cell activation. The results confirm that the experimentally observed mitochondria movement towards the immunological synapse (IS) controls  $\text{Ca}^{2+}$  signals. Furthermore the models predict that an accumulation of special  $\text{Ca}^{2+}$  pumps around the IS is essential for the occurrence of high  $\text{Ca}^{2+}$  signals. In addition to this a model is presented that helps to explain the experimentally observed membrane signals of the enzyme protein kinase C (PKC) by postulating a cooperative binding of PKC's.

These models help to provide insight into T-cell activation under "physiological" conditions which are nearly impossible to realise in experiments and aside encourage the development of new experimental setups.



# Zusammenfassung

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) steuert in Zellen eine Vielzahl von lebenswichtigen Prozessen wie z.B. Befruchtung, Wachstum oder auch die menschliche Immunabwehr. Bei der Immunabwehr spielt die Aktivierung von T-Lymphozyten (T-Zellen) eine wichtige Rolle. Deren erfolgreiche Aktivierung erfordert ein lang andauerndes und hohes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Da im Normalfall zu hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen schädlich für Zellen sind, stellt sich die Frage, wie T-Zellen es schaffen, die vielen Mechanismen zu umgehen, die existieren, um den zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Pegel wieder herunter zu regeln.

In der vorliegenden Dissertation werden verschiedene Modelle untersucht, um den Einfluss der Polarisierung - eine starke morphologische Änderung der Zelle - auf die Entstehung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale zu erklären. Die Ergebnisse bestätigen, dass die experimentell beobachtete Mitochondrienbewegung zur Immunologischen Synapse (IS) die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale kontrolliert und sagen voraus, dass die Anhäufung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen an der IS essentiell für die Existenz hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale ist. Darüber hinaus wird in dieser Dissertation ein Modell präsentiert, mit dessen Hilfe die experimentell beobachteten Membransignale des Enzyms Protein Kinase C (PKC) durch Postulation einer kooperativen Bindung zwischen den PKC erklärt werden können.

Die Modelle liefern neue Erkenntnisse für die T-Zell-Forschung und helfen dabei, die T-Zell-Aktivierung unter „physiologischen“ Konditionen zu untersuchen, die nur sehr schwer in Experimenten zu realisieren sind.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>Biologie der Calcium-Signalgebung</b>	<b>23</b>
2.1	Einleitung . . . . .	23
2.2	Grundlagen der Calcium-Signalgebung . . . . .	24
2.2.1	IP <sub>3</sub> -Rezeptor und Entstehung von lokalen und globalen Calcium-Signalen . . . . .	25
2.2.2	Proteinkinase C $\alpha$ . . . . .	29
2.3	Calcium-Signale am Beispiel von T-Lymphozyten . . . . .	30
2.3.1	T-Lymphozyten . . . . .	30
2.3.2	Funktion der Mitochondrien für die Calcium-Signalgebung . . . . .	31
2.3.3	Calcium-ATPase (SERCA / PMCA -Pumpe) . . . . .	33
2.3.4	Calcium „Toolkit“ und Aktivierung von T-Lymphozyten . . . . .	35
2.4	CRAC-Kanal und T-Zell-Polarisierung . . . . .	38
2.4.1	CRAC-Kanal . . . . .	38
2.4.2	T-Zell-Polarisierung und Calcium-Signalgebung . . . . .	41
<b>3</b>	<b>Aktueller Stand der Methodik</b>	<b>45</b>
3.1	Einleitung . . . . .	45
3.1.1	Reaktions-Diffusions Systeme . . . . .	46
3.2	Stochastische Beschreibung . . . . .	47
3.3	Gillespie-Algorithmus . . . . .	49
3.3.1	„Direct Method“ . . . . .	52
3.3.2	„First Reaction Method“ . . . . .	53
3.3.3	Fazit . . . . .	54
3.4	Gibson und Brucks „Next Reaction Method“ . . . . .	55
3.5	Die „Next Subvolume Method“ . . . . .	58
<b>4</b>	<b>Lokale Membran Translokations-Ereignisse / Proteinkinase C <math>\alpha</math> LTEs</b>	<b>63</b>
4.1	Einleitung . . . . .	63
4.1.1	Motivation . . . . .	63

4.1.2	Zwei Populationen von lokalen Translokations-Ereignissen . . . . .	64
4.2	<b>Das Simulationsmodell . . . . .</b>	<b>66</b>
4.2.1	Reaktions-Diffusions-System der PKC-Membrantranslokationen . .	66
4.2.2	Monte-Carlo-Algorithmus und Modellannahmen . . . . .	70
4.2.3	„Base-Case“ - oder Standard-Konfiguration . . . . .	79
4.3	<b>Ergebnisse . . . . .</b>	<b>81</b>
4.3.1	Simulations-Ergebnisse . . . . .	81
4.3.2	Experimenteller Nachweis einer möglichen Wechselwirkung der membrangebundenen PKC $\alpha$ -Proteine . . . . .	90
4.4	<b>Zusammenfassung . . . . .</b>	<b>91</b>
<b>5</b>	<b>Formation des CRAC-Kanals . . . . .</b>	<b>95</b>
5.1	<b>Einleitung und Motivation . . . . .</b>	<b>95</b>
5.2	<b>Stochastisches Reaktions-Diffusions Modell . . . . .</b>	<b>96</b>
5.3	<b>Ergebnisse . . . . .</b>	<b>102</b>
5.4	<b>Zusammenfassung . . . . .</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>Calcium-Signale während der T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Polarisierung . . . . .</b>	<b>111</b>
6.1	<b>Einleitung und Motivation . . . . .</b>	<b>111</b>
6.2	<b>Eindimensionales T-Zell Modell . . . . .</b>	<b>113</b>
6.2.1	Stationäres Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationsprofil . . . . .	114
6.2.2	Wahl der Parameter . . . . .	116
6.2.3	Ergebnisse . . . . .	117
6.3	<b>1D-Modell eines Random Walks / Effekt der Randbedingungen . . . . .</b>	<b>119</b>
6.4	<b>Dreidimensionales Reaktions-Diffusions Modell . . . . .</b>	<b>131</b>
6.4.1	Motivation und Vorbetrachtung . . . . .	131
6.4.2	3D T-Zell-Modell . . . . .	133
6.4.3	Parameterwerte des Base-Case Szenarios . . . . .	141
6.4.4	Ergebnisse I: Geblockte SERCA-Pumpen und Einfluss der Mito- chondrien- und PMCA-Pumpenposition . . . . .	143
6.4.5	Ergebnisse II: Aktive SERCA-Pumpen und Einfluss der ER / SERCA-Position . . . . .	150
6.5	<b>Einfluss der Struktur des Mitochondriennetzwerkes sowie der Position des Endoplasmatischen Retikulums auf das globale Calcium- Signal . . . . .</b>	<b>156</b>
6.5.1	Einleitung . . . . .	156
6.5.2	2D-T-Zell-Modell . . . . .	157
6.5.3	Ergebnisse . . . . .	160
6.6	<b>Zusammenfassung . . . . .</b>	<b>167</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick . . . . .</b>	<b>169</b>
	<b>Anhang . . . . .</b>	<b>191</b>

A.1	<b>FRET-Mikroskopie</b>	191
A.1.1	Effizienz des FRET-Signals	191
A.1.2	Messung des FRET-Signals	193
A.1.3	Experimente	194
A.1.4	Durchführung und Bildanalyse	194
A.1.5	Ergebnisse der Referenzmessungen	195
A.2	<b>Ergänzungen zum Kapitel 6 „Calcium-Signale während der T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Polarisierung“</b>	197
A.2.1	Ergebnisse des 1D-Modells für unterschiedliche Mitochondrienlängen	197
A.2.2	Erweiterungen des 1D-Modells	197
A.2.3	3D-T-Zell Würfelgeometrie. Effekt der Randbedingung und des Wettbewerbs	205
A.2.4	2D-T-Zell Modell: Stationäre zytosolische Calciumkonzentration für verschiedene Mitochondrienetzwerke	207



# Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung des $IP_3$ -Rezeptors. . . . .	25
2.2	Lokale und globale Calcium-Signale und CICR. . . . .	27
2.3	Aktivierungsschema und Membrantranslokation von Proteinkinase C. . .	29
2.4	Mikroskopie-Aufnahmen einer T-Zelle. . . . .	31
2.5	Aufbau und Form von Mitochondrien. . . . .	32
2.6	Calcium-Transportzyklus und Struktur der SERCA-Pumpe. . . . .	34
2.7	Schematische Darstellung der Calcium-Signalgebung. . . . .	36
2.8	STIM1-Signalweg vom ER zur Plasmamembran. . . . .	39
2.9	Schematische Darstellung der T-Zell-Polarisierung. . . . .	41
3.1	Datenstruktur der Prioritätsliste und des Abhängigkeitsgraphen. . . . .	56
4.1	PKC-Aktivierung und Modellgeometrie . . . . .	67
4.2	Wechselwirkung zwischen den DAG-gebundenen PKC-Molekülen . . . . .	77
4.3	Schematische Darstellung des Lawineneffekts. . . . .	78
4.4	PKC-Membrantranslokationen ohne Annahme einer kooperativen Membranbindung. . . . .	82
4.5	Zeitlicher Verlauf der LTE-Signale in der Plasmamembran. . . . .	83
4.6	PKC-Membrantranslokationen unter Annahme einer kooperativen Membranbindung. . . . .	85
4.7	Entwicklung der maximalen PKC-Clustergröße. . . . .	86
4.8	Zeitlicher Verlauf eines kurz andauernden LTE-Signals. . . . .	87
4.9	Verteilung der Membran-Signaldauer. . . . .	88
4.10	Zeitlicher Verlauf eines lang andauernden LTE-Signals. . . . .	89
4.11	Zeitliche Entwicklung der Strahlungsintensität des Akzeptors YFP. . . . .	92
4.12	Zeitliche Entwicklung der Strahlungsintensität des Donors CFP. . . . .	92
4.13	Ergebnisse der FRET-Experimente. . . . .	93
5.1	Modellgeometrie des zweidimensionalen Reaktions-Diffusions Modells. . .	99
5.2	Ergebnisse Stochastisches 2D-Modell zur STIM1/Orai1-Kanalbildung I . .	103
5.3	Ergebnisse des 2D-Modells bei Annahme von STIM1-Hopping bzw. Orai1-Hexameren. . . . .	105

5.4	Ergebnisse Stochastisches 2D-Modell zur STIM1/Orai1-Kanalbildung II	107
6.1	Schematische Darstellung des 1D-Modells	114
6.2	Lokale und globale Calcium-Signale des 1D-Modells.	118
6.3	Skizze eines diskreten und symmetrischen 1D Random Walks.	120
6.4	Schematische Darstellung des Transmissions- und Absorptions-Modus.	121
6.5	Skizze des 1D Random Walk Modells zur Untersuchung von $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen in T-Zellen.	123
6.6	Baumdiagramm zur Bestimmung der „Mean First Exit“ Zeit.	126
6.7	Ergebnisse des 1D Random Walk Modells.	128
6.8	Modellgeometrie des 3D-Modells zur T-Zell-Aktivierung und Polarisierung.	133
6.9	3D-Schnappschüsse der zytosolischen Calciumkonzentration $c_{\text{cyt}}$	144
6.10	3D-Schnappschüsse der stationären zytosolischen Calciumkonzentration $c_{\text{cyt}}$	145
6.11	Lokale und globale $\text{Ca}^{2+}$ -Signale als Funktion des Abstands zwischen Mitochondrien und Immunologischer Synapse	146
6.12	Robustheit der Modellvorhersagen.	148
6.13	Einfluss der PMCA-Pumpenverteilung auf die entstehenden Calcium-Signale	150
6.14	Zeitlicher Verlauf der Calcium-Signale in Abhängigkeit der SERCA-Pumpenposition	152
6.15	3D-Schnappschüsse der zytosolischen Calciumkonzentration $c_{\text{cyt}}$ bei aktiven SERCA-Pumpen I	153
6.16	3D-Schnappschüsse der zytosolischen Calciumkonzentration $c_{\text{cyt}}$ bei aktiven SERCA-Pumpen II	154
6.17	Zeitlicher Verlauf der Calcium-Signale bei veränderter ER-Geometrie	155
6.18	Modellgeometrie des 2D-T-Zell-Modells.	157
6.19	Einfluss der Struktur des Mitochondriennetzwerkes. Ergebnisse des 3D-Modells.	161
6.20	Einfluss der Struktur des Mitochondriennetzwerkes. Ergebnisse des 2D-Modells, Teil I.	164
6.21	Einfluss der Struktur des Mitochondriennetzwerkes. Ergebnisse des 2D-Modells, Teil II.	166
A.1	Schematische Darstellung des FRET-Signals sowie Photobleichens	192
A.2	Visualisierung der ROIs.	195
A.3	Referenzmessung (CFP).	196
A.4	Referenzmessung (YFP).	196
A.5	Calcium-Signale des 1D-Modells für Mitochondrien der Länge $l = 2 \mu\text{m}$ .	198
A.6	Calcium-Signale des 1D-Modells für Mitochondrien der Länge $l = 3 \mu\text{m}$ .	199
A.7	Calcium-Signale des 1D-Modells mit PMCA-Pumpen an der IS.	203
A.8	Calcium-Signale des 1D-Modells mit einer $\text{Ca}^{2+}$ -Diffusion innerhalb der Mitochondrien.	204
A.9	3D-T-Zell-Modell und Einfluss der PMCA-Pumpenposition.	206
A.10	Stationäre Calciumkonzentration für verschiedene Mitochondriennetzwerke.	208

# Tabellenverzeichnis

4.1	Reaktionsraten bei kooperativer Bindung. . . . .	76
4.2	Parameter des „Base-Case“, Teil I. . . . .	79
4.3	Parameter des „Base-Case“, Teil II. . . . .	80
5.1	Parameter des stochastischen CRAC-Kanal Modells. . . . .	100
6.1	Base-Case Parameter des 1D-Modells . . . . .	117
6.2	Parameter und Anfangswerte des 3D-Modells. . . . .	142
6.3	Parameter und Anfangswerte des 2D-Modells. . . . .	159



# Abkürzungsverzeichnis

#	.....	Anzahl an
[M]	.....	Einheit der Konzentration, Mol
<i>ran</i>	.....	Auf dem Intervall ]0, 1[ gleichverteilte Zufallszahlen
ATP	.....	Adenosintriphosphat
bzw.	.....	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	.....	Calcium
CFP	.....	Cyan Fluorescent Protein
CRAC	.....	Calcium release-activated Calcium
DAG	.....	Diacylglycerine
ER	.....	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	.....	et alii (Maskulinum), et aliae (Femininum) oder et alia (Neutrum), deutsch: und andere
FRAP	.....	Fluorescence Recovery After Photo-Bleaching
FRET	.....	Förster Resonanz Energie Transfer
IP <sub>3</sub>	.....	Inositoltrisphosphat
IP <sub>3</sub> R	.....	Inositoltrisphosphat-Rezeptor oder Kanal
IS	.....	Immunologische Synapse
LTE	.....	Local Translocation Event
NRM	.....	Next Reaction Method
NSM	.....	Next Subvolume Method
PKC $\alpha$	.....	Protein Kinase C $\alpha$
PM	.....	Plasmamembran
PMA	.....	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMCA	.....	Plasmamembran calcium ATPase
PMJ	.....	Plasmamembran-Junction
PS	.....	Phosphatidylserine
RDME	.....	Reaction Diffusion Master Equation

ROI .....	Region of Interest
SERCA .....	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SOC .....	Store Operated Calcium
STIM .....	Stromal Interaction Molecule
SV .....	Subvolumen
TIRF .....	Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie)
usw. ....	und so weiter
YFP .....	Yellow Fluorescent Protein
z.B. ....	zum Beispiel

# Kapitel 1

## Einleitung

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ist der vielseitigste, universellste und wichtigste Signalgeber in nahezu allen lebenden Zellen [1–3]. Zellen sind die kleinste lebende Einheit aller Organismen und der menschliche Körper zum Beispiel besteht aus ca.  $10^{14}$  solcher winziger Bausteine. Viele für das Leben und die Reproduktion der Organismen entscheidende Prozesse werden durch Calcium in seiner Funktion als sogenannter „Second Messenger“<sup>1</sup> gesteuert. Als Second Messenger bindet Calcium innerhalb der Zelle an Enzyme und Proteine, aktiviert diese und steuert dadurch weitere Signalwege, die eine zelluläre Antwort zur Folge haben. Seine außergewöhnliche und einzigartige Bedeutung für das Leben beruht darauf, dass Calcium solch unterschiedliche und essentielle Prozesse, wie z.B. Befruchtung [3, 4], Proliferation (Zell- bzw. Gewebswachstum) [3, 5] oder auch Lernen und Gedächtnis [6] kontrolliert. Wie wichtig die Erforschung Calcium abhängiger Prozesse ist, zeigt beispielsweise die diesjährige Verleihung des Medizin-Nobelpreises 2013, der für das Verständnis des zellulären Transportsystems an James E. Rothman, Randy W. Schekman und Thomas C. Südhof verliehen wurde. Ihre Arbeiten beschäftigen sich damit, wie Vesikel an Zellen andocken, mit den Zellen verschmelzen und dadurch die von den Vesikeln transportierten Güter in das Zellinnere freigesetzt werden. Insbesondere die Arbeiten von Thomas C. Südhof haben gezeigt, dass der richtige Zeitpunkt der Verschmelzung von Vesikeln und Zellmembran durch die Freisetzung von Calcium-Ionen bestimmt wird [7].

Die oben genannten Prozesse wie Befruchtung, Proliferation usw. werden durch Calcium-Signale initialisiert und gesteuert. Als Calcium-Signal versteht man im Allgemeinen jegliche Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Um jedoch zu verstehen, wie die verschiedensten Zelltypen in der Lage sind, eine Konzentrationserhöhung zu nutzen,

---

<sup>1</sup>Sekundärer Botenstoff, Sekundärsignal: Second Messenger dienen der intrazellulären Weiterleitung eines von außen (extrazellulär) kommenden primären Signals/Stimulus.

um die unterschiedlichsten Prozesse auf Zeitskalen von Mikrosekunden bis hin zu Stunden zu steuern, muss man die genaue räumlich-zeitliche Gestalt der Signale betrachten. Die Vielfältigkeit von Calcium-Signalen hat ihren physikalischen Ursprung in Calcium-Kanälen und Calcium-Pumpen, welche die Calcium-Ionen innerhalb der Zelle zwischen den verschiedenen Zell-Organellen hin und her transportieren und außerdem den Austausch zwischen Zellinnerem und extrazellulärem Raum gewährleisten. Diese Transportmechanismen beruhen entweder auf einer einfachen Diffusion entlang von Konzentrationsgradienten, oder es sind aktive Prozesse, die durch den Konsum des intrazellulären Energieträgers Adenosintriphosphat ermöglicht werden. Die Aktivität der Calcium-Kanäle und -Pumpen hängt meist nichtlinear von der Calciumkonzentration ab, und es existieren sowohl Kanäle, die durch positive Feedback-Mechanismen (z.B. IP<sub>3</sub>-Rezeptor [8]) aktiviert werden, als auch Kanäle, die durch negative Feedback-Mechanismen (z.B. CRAC-Kanal [9–11]) deaktiviert oder inhibiert werden. Dadurch entstehen sehr interessante räumlich-zeitliche Signale, die von elementaren Calcium-Signalen bis zu Oszillationen oder intra- und interzellulären Calcium-Wellen reichen. Durch die Dekodierung des Informationsgehalts, der in den Amplituden bzw. in Kinetik und Frequenz der Calcium-Oszillationen und Wellen enthalten ist, wird die Zelle in die Lage versetzt, verschiedene Calcium abhängige Prozesse zu unterscheiden und zu steuern.

Aufgrund ihrer Bedeutung und Komplexität ist die Physik der Calcium-Signale seit mehreren Dekaden immer wieder Gegenstand der aktuellen Forschung und der computerbasierten Modellierung (Review zur Physik der Calcium-Signale, siehe [12]). Allerdings vernachlässigen nach meinem Wissen nahezu alle existierenden Modelle den Einfluss der räumlichen Struktur der Zelle und die relative Lage der verschiedenen Zell-Organellen zueinander. Dass dieser Ansatz nicht vollständig korrekt ist, zeigen experimentelle Studien, die in Abhängigkeit der Mitochondrienposition relativ zum Ort des Calcium-Einstroms unterschiedliche Calcium-Signale beobachteten [13]. Des Weiteren ist bekannt, dass sehr spezifische lokale Calcium-Signale existieren, sogenannte Mikrodomänen<sup>2</sup>, die eine Reihe von Prozessen kontrollieren, wie zum Beispiel die neuronale Funktion, die Muskelkontraktion sowie die Genexpression [14–17]. Auch um die Entstehung von Calcium-Mikrodomänen und deren Einfluss auf die Calcium abhängige Regulierung von Calcium-Kanälen und -Pumpen zu berücksichtigen, darf die räumliche Komponente in den Modellen nicht vernachlässigt werden. Aus diesem Grund ist eines der Hauptziele der vorliegenden Dissertation, die Untersuchung und Modellierung von Calcium-Signalen, wobei die exakte räumliche Anordnung der verschiedenen Bausteine innerhalb der Zelle eine besondere Berücksichtigung findet.

Eine Form der örtlichen Modulation von Calcium-Signalen wird in Zellen durch die Entstehung von elementaren Ereignissen erreicht. Diese sogenannten Puffs oder Blips [18–20] bezeichnen das Öffnen einzelner Calcium-Kanäle des Endoplasmatischen Retikulums und haben typischerweise eine Lebensdauer, die von einigen hundert Millisekunden bis hin zu ca. zwei Sekunden reicht [3, 18, 21]. Zur Dekodierung dieser elementaren Er-

---

<sup>2</sup>Mikrodomänen entstehen in direkter Umgebung von Calcium-Kanälen und bezeichnen Orte mit einer räumlichen Ausdehnung von einigen hundert Nanometern und einer sehr hohen Konzentration im Mikromolbereich.

eignisse nutzt die Zelle das Enzym Proteinkinase C (PKC), das durch Binden von zwei Calcium-Ionen aktiviert wird. In Folge der Aktivierung transloziert PKC zur Zellplasmamembran und bindet dort über zwei unabhängige Bindungsdomänen, die sogenannten C1- und C2-Domänen, an die Zellmembran. Eine der Fragen, die im Rahmen dieser Dissertation mit Hilfe von mathematischen Modellen beantwortet werden soll, ist es zu klären, wie die zwei von Reither et al. [22] beobachteten Populationen von lokalen PKC-Translokationsereignissen (kurz LTE's) verstanden werden können. In den Experimenten von Reither et al. werden kurz andauernde und lang andauernde LTE's beobachtet. Während die kurz andauernden LTE's mit den Lebenszeiten der zugrunde liegenden elementaren Calcium-Signale übereinstimmen, übersteigen die Lebenszeiten der lang andauernden LTE's die ihnen zugrunde liegenden Calcium-Signale um das Zehnfache. Zur Klärung der Diskrepanz zwischen der Theorie der Calcium-Signale und den experimentellen Beobachtungen von Reither et al. wird in Kapitel 4 ein dreidimensionaler Monte-Carlo Algorithmus vorgestellt, der sich zur Untersuchung der lokalen PKC-Translokationsereignisse eignet. Eine These, die anhand der Modellergebnisse die Koexistenz der beiden LTE-Populationen erklären kann, ist das Vorhandensein einer kooperativen Wechselwirkung zwischen den via C2-Domäne gebundenen PKC-Molekülen. Solch ein kooperativer Effekt könnte auch unabhängig von dem hier betrachteten Enzym PKC sein und vielmehr eine universelle Eigenschaft der C2-Domäne darstellen, die Bestandteil vieler weiterer Membranproteine ist. Ein kooperativer Mechanismus zwischen den PKC-Molekülen kann in Experimenten mittels FRET<sup>3</sup>-Messungen untersucht werden, wie sie im Rahmen dieser Dissertation auch durchgeführt wurden.

Neben der enormen Bedeutung von Calcium-Signalen für Zellen und Organismen im Allgemeinen, sind Calcium-Signale im Speziellen auch entscheidend an der korrekten Funktion der menschlichen Immunabwehr beteiligt. Durch die Zerstörung von krankhaften Zellen, die z.B. durch eine Virusinfektion oder Mutation entstanden sind, dient eine Gruppe der weißen Blutzellen der Immunabwehr: die sogenannten T-Lymphozyten oder T-Zellen. Die erfolgreiche Aktivierung der T-Zellen benötigt ein sehr starkes und robustes Calcium-Signal, das über mehrere Minuten bis hin zu Stunden aufrechterhalten werden muss. Da im Normalfall zu hohe Calciumkonzentrationen schädlich für die Zelle sind, und mehrere Mechanismen existieren, den erhöhten Calcium-Spiegel schnellstmöglich wieder herunter zu regulieren, stellt sich unmittelbar die Frage: wie schaffen es T-Zellen, diese speziellen Calcium-Signale zu erzeugen?

Es gibt Hinweise darauf, dass die zu Beginn der T-Zell-Aktivierung einsetzende T-Zell-Polarisierung - eine starke morphologische Änderung der Zelle - maßgeblichen Anteil an einer erfolgreichen Aktivierung hat [13, 23]. Die genauen Zusammenhänge zwischen der T-Zell-Aktivierung und der parallel dazu ablaufenden T-Zell-Polarisierung sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Ich möchte deshalb in der vorliegenden Dissertation den Einfluss der T-Zell-Polarisierung auf die entstehenden Calcium-Signale untersuchen. Neben den augenscheinlichen physiologischen Fragestellungen werden gleichzeitig auch physikalisch interessante Aspekte untersucht: spielen kooperative Effekte im Rahmen der Entstehung der Calcium-Kanäle eine Rolle und welche räumlichen Konfigurationen

---

<sup>3</sup>Förster-Resonanzenergietransfer Mikroskopie

führen zu möglichst starken und robusten Calcium-Signalen und somit zu einer optimalen T-Zell-Aktivierung?

Die Haupteinstromquelle für Calcium in T-Zellen bildet der sogenannte Calcium release-activated Calcium (CRAC) Kanal, ein speichergesteuerter Ionen-Kanal, der in der Zellplasmamembran lokalisiert ist. Die Bedeutung des Calcium-Einstroms  $I_{\text{CRAC}}$  durch den CRAC-Kanal für die Immunabwehr wird im Fall von Immunkrankheiten deutlich, bei denen die Betroffenen an einer Störung des speichergesteuerten Calcium-Einstroms leiden [24]. Da der genaue Reaktionsablauf, der zur Bildung dieses Ionen-Kanals führt, nicht bekannt ist, wird in Kapitel 5 ein stochastisches Modell vorgestellt, das die aus der Literatur bekannten Mechanismen berücksichtigt und zur Studie der CRAC-Kanal-Cluster Bildung und dem daraus resultierenden Calcium-Strom  $I_{\text{CRAC}}$  verwendet wird. Wie gezeigt wird, ist dieses Modell in der Lage, die experimentell von Hoover und Lewis [25] gemessenen CRAC-Ströme  $I_{\text{CRAC}}$  korrekt zu reproduzieren, und die physikalischen Prozesse zu benennen, die für die entsprechenden Strom-Verläufe verantwortlich sind. Zusätzlich können mit Hilfe des Modells hypothetische Mechanismen benannt werden, die einen zum Wildtypen geänderten Stromverlauf für eine Mutation des Ionen-Kanals [26] hervorrufen können.

Wie bereits erwähnt, ist jedoch nicht nur der Calcium-Einstrom für die erfolgreiche Aktivierung der T-Zellen wichtig, sondern auch die Dauer und Stärke des Calcium-Signals. Inwiefern die T-Zell-Polarisierung dabei eine Rolle spielt und inwiefern das Zusammenspiel zwischen der räumlichen Anordnung verschiedener Zell-Organellen sowie Calcium-Kanäle und Calcium-Pumpen zum Vorkommen von speziellen lang anhaltenden Calcium-Signalen führen kann, ist noch nicht vollständig verstanden. Aus diesem Grund werden in Kapitel 6 verschiedene Modelle präsentiert, die sich dazu eignen, den Einfluss der räumlichen Anordnung beispielsweise von Mitochondrien auf die entstehenden Calcium-Signale zu untersuchen. Quintana et al. [13] berichten zum einen, dass sich die Mitochondrien im Laufe der T-Zell-Aktivierung aktiv zum Immunologischen Synapse, dem Ort des Calcium-Einstroms, bewegen. Zum anderen kommt es im Zuge der T-Zell-Polarisierung in der Nähe der Immunologischen Synapse zu einer Anhäufung von speziellen Calcium-Pumpen, den sogenannten PMCA-Pumpen. Deshalb schlage ich hier eine Funktion der Mitochondrien vor, die bisher noch nicht untersucht worden ist: Noch bevor das Calcium die PMCA-Pumpen erreichen kann nehmen die Mitochondrien es in direkter Umgebung des Einstromortes auf und verteilen es in tiefer liegende Bereiche des Zellzytosols. Die meisten in der Literatur vorhandenen Modelle, die sich mit Calcium-Signalen beschäftigen, vernachlässigen die Auswirkungen von Mitochondrien gänzlich (auch im Fall von Calcium-Signalen in T-Zellen [27]) oder berücksichtigen lediglich die Puffer-Kapazität der Mitochondrien ([28–30]). Diese existierenden Modelle nehmen eine räumlich homogene Calciumkonzentration innerhalb des Zytosols an und vernachlässigen die Ausbildung von lokalen Mikrodomänen, die durch die räumliche Anordnung der Calcium-Quellen und Senken entstehen. Dadurch sind sie nicht in der Lage die entscheidende Frage zu klären, die in der vorliegenden Dissertation beantwortet wird: Wie wirkt sich die komplexe Korrelation zwischen der räumlichen Anordnung der Zell-Organellen und Calcium-Kanäle/Pumpen auf die Ausbildung der lokalen (Mikrodomänen) und globalen (zytosolisch) Calcium-Signale aus und befähigt im Falle der

T-Zell-Aktivierung die Zellen dazu, einen erhöhten zytosolischen Calcium-Spiegel aufrecht zu erhalten. Die von mir entwickelten Modelle hingegen sind meines Wissens die Ersten, die eine Erklärung dafür liefern, wie sich die Distanz zwischen verschiedenen Zell-Organellen und die relative Anordnung verschiedener Calcium-Quellen und Senken auf die zu erwartenden Calcium-Signale auswirken.

Das übergreifende Ziel dieser Dissertation ist es nicht nur, die experimentellen Ergebnisse zu reproduzieren, sondern vielmehr dazu beizutragen, die in der Zelle ablaufenden Vorgänge zu verstehen und Vorhersagen zu treffen, die nicht ohne Weiteres unter realen / physiologischen Bedingungen überprüft werden können. So bestätigen zum Beispiel die Modelle aus Kapitel 6, dass die Position der Mitochondrien relativ zur Immunologischen Synapse die entstehenden lokalen und globalen Calcium-Signale kontrolliert. Sie sagen gleichzeitig voraus, dass auch die experimentell beobachtete Pumpen-Anhäufung essentiell für die T-Zell-Aktivierung ist. Des Weiteren versetzen die Modelle uns in die Lage, ein neues Licht auf die T-Zell-Aktivierung zu werfen, indem Calcium-Signale unter „physiologischen“ Bedingungen untersucht werden können, die nicht ohne weiteres in Experimenten zu realisieren sind. Die Ergebnisse ermutigen dazu, neue experimentelle Methoden zu entwickeln, um z.B. die Vorhersage zu überprüfen, dass die Pumpen-Akkumulation in der Nähe der IS essentiell für die Aktivierung der T-Zellen ist. Daneben möchte ich auch erwähnen, dass die bisherigen Modelle in Zukunft noch weiter verfeinert und ausgebaut werden, um neue Erkenntnisse in der Calcium-Signalegebung lebender Zellen zu erlangen.

Im Weiteren ist diese Dissertation wie folgt aufgebaut: In Kapitel 2 werden zunächst alle biologisch relevanten Fakten und Prozesse vorgestellt, die zum vollständigen Verständnis der Motivation sowie zum Verständnis der Modellentwicklung der Dissertation notwendig sind. Nachdem der biologische Hintergrund in Kapitel 2 erklärt wurde, können die einzelnen Kapitel als selbständige Einheiten betrachtet werden, die unabhängig voneinander gelesen und verstanden werden können. Jedes dieser Kapitel beginnt mit einer kurzen Einleitung und endet mit einer Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse. In Kapitel 3 werden die aus der Literatur bekannten Algorithmen vorgestellt, die als Grundlage der Modellierung der Studien in Kapitel 4 und 5 dienen. Die Beschreibung von PKC-Membrantranslokationen ist Gegenstand des Kapitels 4. Ein stochastisches Modell, mit dessen Hilfe die Bildung des CRAC-Kanals untersucht wird, ist in Kapitel 5 vorgestellt. Kapitel 6 beschäftigt sich mit der Modellierung von Calcium-Signalen während der T-Zell-Polarisierung und -Aktivierung, bevor dann in Kapitel 7 die Zusammenfassung der vorliegenden Arbeit präsentiert wird.

Teile der in dieser Dissertation präsentierten Modelle und deren Ergebnisse wurden bereits in zwei Peer-Review-Artikeln veröffentlicht [26, 31].



# Kapitel 2

## Biologie der Calcium-Signalgebung

### 2.1 Einleitung

Dieses Kapitel soll dazu dienen, die wesentlichen biologischen Fakten und Prozesse der Calcium-Signalgebung zusammenzufassen. In Form einer systematischen Übersicht (Review) werden die aktuellen Forschungsergebnisse dargestellt, die zum Verständnis der Motivation und Modellentwicklung der vorliegenden Dissertation notwendig sind. Zunächst werden die wichtigsten Mechanismen der Calcium-Signalgebung am Beispiel einer spezifischen Zellspezies, sogenannter T-Lymphozyten, vorgestellt. Diese T-Lymphozyten, auch T-Zellen genannt, spielen eine wichtige Rolle für die menschliche Immunabwehr, und ihre Aktivierung wird wesentlich von der in den Zellen vorherrschenden Calciumkonzentration bestimmt. Gerade bei T-Zellen sind das komplexe Zusammenspiel und die räumliche Anordnung der verschiedenen Zellorganellen sowie Calcium-Kanäle und -Pumpen enorm wichtig für die Aufrechterhaltung von langandauernden, starken Calcium-Signalen. Deshalb folgt im zweiten Teil dieses Kapitels die Fokussierung auf die einzelnen Zellbausteine, die bei der Entstehung der unterschiedlichen Signale beteiligt sind. Außerdem wird erläutert, wie biologische Zellen die Calcium-Signale nutzen, um verschiedenste Prozesse zu initialisieren und zu regulieren.

## 2.2 Grundlagen der Calcium-Signalgebung

Calcium ist ein für nahezu alle Lebewesen sehr wichtiges Element. Im menschlichen Körper zum Beispiel ist es als Mengenelement mit einer Masse von ca. 1 kg vertreten. Dabei ist es hauptsächlich in den Knochenzellen, aber auch in fast allen anderen Zellen gespeichert. Seine herausragende Stellung besitzt Calcium aufgrund seiner Funktion als einer der einfachsten und zugleich vielseitigsten intrazellulären Signalgeber [1–3]. In einigen Fällen, wie z.B. der Polarisierung von Membranen, operiert Calcium selbst als Signalgeber; meist jedoch spielt Calcium eine bedeutende Rolle als sogenannter „Second Messenger“<sup>4</sup>. Als Second Messenger bindet Calcium an Enzyme oder Proteine, welche dadurch aktiviert werden und in ihrem aktivierten Zustand weitere Calcium-abhängige Signalwege in Gang setzen, die wiederum eine zelluläre Antwort zur Folge haben.

Calcium kann auch als Signal des Lebens und des Todes bezeichnet werden [3], da „Almost everything that we do is controlled by  $\text{Ca}^{2+}$  – how we move, how our heart beats and how our brains process information and store memories<sup>5</sup>“ [3]. Calcium steuert solch unterschiedliche Prozesse, wie z.B. Befruchtung [3, 4], Proliferation (Zell- bzw. Gewebswachstum) [3, 5], Lernen & Gedächtnis [6] sowie die Muskelkontraktion [3], ist aber auch in zu hohem Maß toxisch für Zellen, wodurch der Zelltod durch Nekrose oder Apoptose herbeigeführt werden kann. Diese auf sehr unterschiedlichen Zeitskalen ablaufenden Prozesse (Muskelkontraktion im Bereich von Millisekunden, Befruchtung und Wachstum im Bereich von mehreren Stunden) beruhen auf den ersten Blick im Wesentlichen alleine auf einer Erhöhung der Calciumkonzentration innerhalb des Zellzytosols. Bei Aktivierung steigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ruhekonzentration, die bei ca. 100 nM liegt, auf eine „Aktivierungs“-Konzentration von ca. 1000 nM an [1–3].

Hier stellt sich direkt die Frage, wie eine reine Erhöhung der Konzentration solch verschiedene und komplexe Prozesse steuern kann? Um dies zu verstehen, muss das konkrete Aussehen der Calcium-Signale betrachtet werden. Calcium-Signale sind sowohl räumlich als auch zeitlich sehr komplex. Die Existenz von lokalen Mikrodomänen aber auch von globalen Wellen (intra- und interzellulär) mit unterschiedlichen Frequenzen und Amplituden, die durch sowohl positive als auch negative Feedback-Mechanismen und die räumliche Anordnung von verschiedenen Zellstrukturen zueinander gesteuert werden, machen Calcium-Signale zu einem interessanten Gebiet für physikalische Fragestellungen und computerbasierte Modellierung.

---

<sup>4</sup>Sekundärer Botenstoff, Sekundärsignal: Second Messenger dienen der intrazellulären Weiterleitung eines von außen (extrazellulär) kommenden primären Signals/Stimulus.

<sup>5</sup>Nahezu alles, was wir tun wird durch Calcium gesteuert - wie wir uns bewegen, wie unser Herz schlägt, und wie unser Gehirn Informationen verarbeitet und im Gedächtnis abspeichert.

### 2.2.1 IP<sub>3</sub>-Rezeptor und Entstehung von lokalen und globalen Calcium-Signalen

Die Vielseitigkeit von Calcium als Signalgeber ist in der zeitlichen und räumlichen Struktur der Calcium-Signale begründet. Die meisten Calcium-Signale haben ihren Ursprung in lokalen Ereignissen sogenannter „Blips“ und „Puffs“ [18–20], welche die Öffnung eines einzelnen Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) -Rezeptors bzw. das Öffnen mehrerer Kanäle eines einzigen Rezeptor-Clusters bezeichnen (siehe Abbildung 2.2). Im Folgenden wird zunächst die Funktionsweise des IP<sub>3</sub>-Rezeptors genauer erklärt, bevor dann der Mechanismus der Calcium-abhängigen Calcium-Freisetzung besprochen wird.

Durch einen Zellstimulus wird in der Zellmembran eine Reihe von chemischen Reaktionen in Gang gesetzt, deren Endprodukt IP<sub>3</sub> ist, das dann im Zytosol diffundiert und an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor bindet (Review zum IP<sub>3</sub>-Rezeptor, siehe z.B. [8]). Der IP<sub>3</sub>-Rezeptor ist ein ligandenaktivierter Ionen-Kanal [32, 33], der in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert ist [34, 35]. Seine Leitfähigkeit ist nicht nur durch IP<sub>3</sub> bestimmt, sondern auch durch andere Liganden und dabei insbesondere durch Calcium. Durch die Freisetzung von Calcium aus dem wichtigsten intrazellulären Calcium-Speicher, dem Endoplasmatischen Retikulum, ist der IP<sub>3</sub>-Rezeptor an der Entstehung von komplexen Calcium-Signalen beteiligt und somit an der Regulierung vieler zellulärer Prozesse.

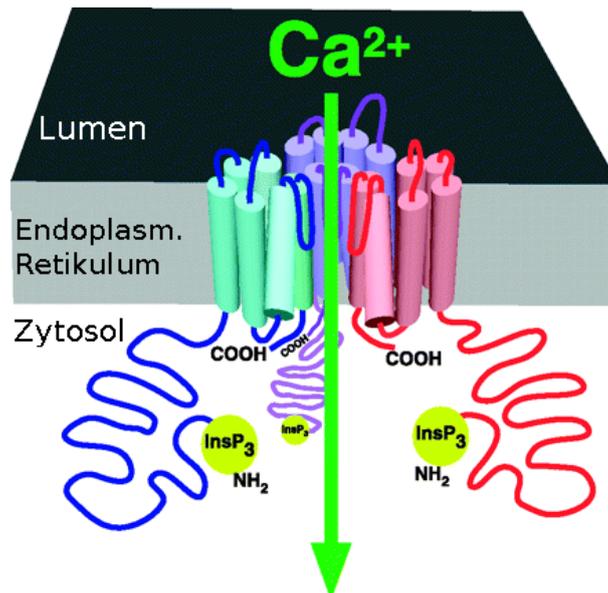


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors. Die Skizze zeigt drei von vier IP<sub>3</sub>-Molekülen (in verschiedenen Farben), die zusammen einen Tetramer bzw. einen einzelnen IP<sub>3</sub>-Rezeptor bilden. Durch den Zusammenschluss der vier Untereinheiten entsteht ein leitfähiger Kanal, der den Calciumstrom aus dem Lumen des Endoplasmatischen Retikulums in das Zytosol ermöglicht. Entnommen aus [8].

Der IP<sub>3</sub>-Rezeptor ist ein Tetramer und ein funktionsfähiger Kanal wird aus vier homomeren Protein-Untereinheiten gebildet (siehe Abbildung 2.1). Die IP<sub>3</sub>-Kanäle sind zu Clustern aus ca. 20-100 Kanälen organisiert [18], wobei der Abstand zwischen einzelnen Clustern im Bereich von Mikrometern liegt [36, 37]. Die Freisetzung von Calcium durch den IP<sub>3</sub>-Rezeptor wird durch das Binden von IP<sub>3</sub> an den Rezeptor eingeleitet. Des Weiteren haben Experimente [38, 39] (*Xenopus*, Ratte Typ 1) gezeigt, dass eine zweistufige Regulierung des Kanals durch Calcium vorliegt. Bei Ruhekonzentration der Zelle von ca. 50-100 nM besitzt der IP<sub>3</sub>-Rezeptor eine sehr niedrige Leitfähigkeit bzw. Öffnungswahrscheinlichkeit. Für zytosolische Calciumkonzentrationen im Bereich von einigen hundert Mikromol ist der IP<sub>3</sub>-Rezeptor maximal aktiviert und die Öffnungswahrscheinlichkeit liegt bei ca. 80 %. Eine weiterer Erhöhung der Calciumkonzentration deaktiviert den Kanal schließlich wieder. Die Öffnungswahrscheinlichkeit des IP<sub>3</sub>-Rezeptors wird somit durch einen positiven und auch durch einen negativen Calcium-Feedback-Mechanismus gesteuert.

Da die IP<sub>3</sub>-Kanäle durch das Binden von Calcium aktiviert werden, spricht man auch von Calcium-induzierter Calcium-Freisetzung (CICR<sup>6</sup>). Die Clusterung der IP<sub>3</sub>-Kanäle sowie die räumliche Anordnung der Cluster zusammen mit der positiven Regulierung der IP<sub>3</sub>-Kanäle durch Calcium (CICR) ermöglicht die Entstehung von lokalen und langreichweitigen Calcium-Signalen als Folge der Aktivierung einzelner IP<sub>3</sub>-Kanäle. Diese lokalen Ereignisse oder Events (Blips, Puffs) besitzen eine Lebensdauer von ca. ein bis zwei Sekunden [3, 18, 21]. Je nach Stärke der lokalen Events kann es vorkommen, dass Calcium die Strecke bis zum nächsten IP<sub>3</sub>-Kanal Cluster diffundiert ohne gepuffert / abgesaugt zu werden und die IP<sub>3</sub>-Kanäle dieses Nachbar-Clusters aktiviert. Durch diesen Mechanismus können globale Ereignisse, sogenannte Calcium-Wellen (intra- und interzellulär), entstehen (siehe Abbildung 2.2).

Neben den elementaren Ereignissen und Calcium-Wellen mit unterschiedlichsten Amplituden und Frequenzen können auch Calcium-Mikrodomänen eine spezifische Form von Signal darstellen. Diese Mikrodomänen, hohe Calciumkonzentrationen nahe der Calcium ausschüttenden Kanäle, kontrollieren z.B. die neuronale Funktion, Muskelkontraktionen oder Genexpression [14–17]. Auch in der direkten Umgebung des IP<sub>3</sub>-Kanals entstehen solche Mikrodomänen, in denen die Calciumkonzentrationen im zweistelligen Mikromolbereich liegt.

Um die diversen orts- und frequenzabhängigen Calcium-Signale zu entschlüsseln, besitzen Zellen „molekulare Maschinen“. Nach heutigen Erkenntnissen sind dies die beiden Proteine Calmodulin und Proteinkinase C (PKC). PKC wird experimentell zum Nachweis von Calcium-Ereignissen im Zytosol benutzt, da es an der Zellmembran sehr leicht durch Fluoreszenzproteine nachgewiesen werden kann. Dies ist nicht zuletzt aufgrund der Größenunterschiede<sup>7</sup> in Bezug auf Calcium ein entscheidender Vorteil. Bevor ich im nächsten Abschnitt auf das Enzym PKC eingehe, möchte ich noch einige Aspekte der theoretischen Modellierung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors diskutieren.

---

<sup>6</sup>Calcium induced calcium release, englisch für Calcium-induzierte Calcium Freisetzung.

<sup>7</sup>Masse : Calcium  $\approx 40$  Da  $\leftrightarrow$  PKC 82.000 Da. Dalton: 1 Da = 1 u  $\approx 1,6 \cdot 10^{-27}$  kg.

Atomradius Calcium 180 pm  $\leftrightarrow$  Stokescher Radius PKC ca. 50 Å [40].

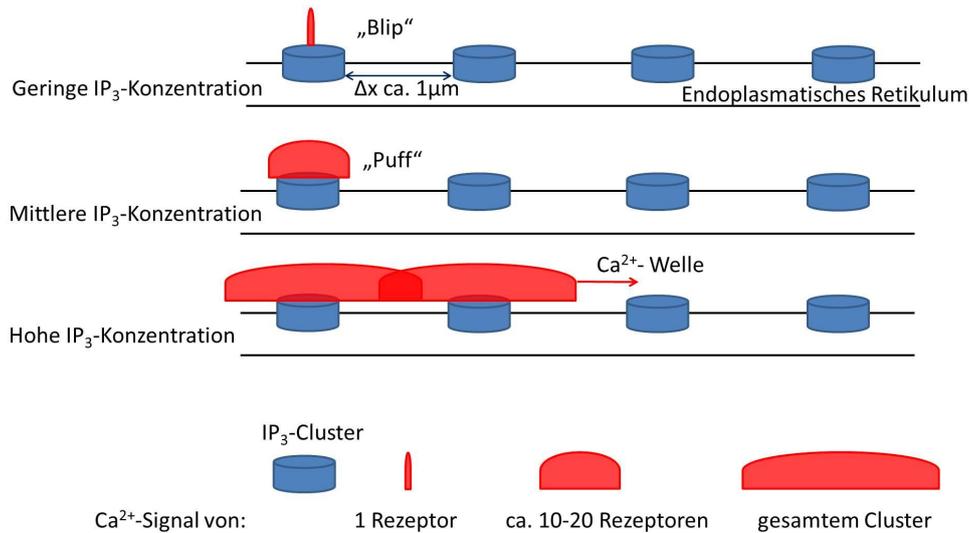


Abbildung 2.2: Lokale und globale Calcium-Signale und Calcium-abhängige Calcium-Freisetzung (CICR). Abhängig von der Stärke des IP<sub>3</sub>-Stimulus entstehen entweder lokale oder globale Calcium-Signale. Bei niedrigen bis mittleren IP<sub>3</sub>-Konzentrationen öffnet sich lediglich ein einziger IP<sub>3</sub>-Rezeptor bzw. öffnen sich wenige IP<sub>3</sub>-Rezeptoren und es entstehen lokale Calcium-Signale, die sogenannten „Blips“ oder „Puffs“. Bei niedrigen IP<sub>3</sub>-Konzentrationen reicht die Calcium-Ausschüttung nicht aus, um die Calcium-abhängige Calcium-Freisetzung benachbarter Rezeptor-Cluster zu induzieren, da zytosolische Calcium-Puffer und Pumpen das freigesetzte Calcium vorher wieder aus dem Zytosol entfernen. Im Gegensatz dazu führen hohe IP<sub>3</sub>-Konzentrationen oft zu globalen Calcium-Signalen, den sogenannten Calcium-Wellen, die aus der Calcium-induzierten Öffnung benachbarter IP<sub>3</sub>-Kanal Cluster resultieren.

Der IP<sub>3</sub>-Rezeptor ist der in der Literatur wohl am häufigsten und detailliertesten modellierte Ionen-Kanal, was sicherlich auch darin begründet ist, dass er experimentell sehr ausführlich studiert wurde. Hinzu kommt, dass die oben beschriebenen positiven und negativen Calcium Feedback-Mechanismen des Rezeptors sehr viele interessante Fragestellungen bieten, die Anlass zur theoretischen Untersuchung geben. Da die Calcium-Freisetzung durch den IP<sub>3</sub>-Rezeptor die Grundlage für die Entstehung von lokalen Ereignissen bis hin zu komplexen Wellen darstellt, ist der IP<sub>3</sub>-Rezeptor fester Bestandteil fast aller Zell-Modelle, die sich mit der Calcium-Signalgebung beschäftigen.

In Modellen zur Calcium-Signalgebung kommt je nach betrachteter Fragestellungen eine mehr oder weniger detaillierte Beschreibung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors zum Einsatz. In Zell-Modellen, die meist auf großen Zeit- und Längenskalen betrachtet werden, ist nicht

die komplexe Beschreibung der Kanal-Kinetik notwendig. In solchen Modellen wird aus verschiedenen Gründen, wie beispielsweise der Einsparung an Computerrechenzeit, auf eine eher qualitative Beschreibung der IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Dynamik zurückgegriffen. Diese Ganzzell-Modelle beziehen die Dynamik des IP<sub>3</sub>-Rezeptors und die resultierende Calcium-Änderung in Form von gekoppelten Differentialgleichungen ein [27, 41, 42].

Im Gegensatz zu der deterministischen Beschreibung werden stochastische Modelle verwendet, falls man an der Untersuchung von Einzelkanalströmen, Calcium-Profilen in direkter Nähe eines einzelnen Rezeptors oder an der Kanalaktivität als Funktion der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration interessiert ist.

Diese stochastischen Modelle ergeben sich meist als Verbesserung oder Weiterentwicklung des IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Modells von De Young und Keizer [43]. Bei dieser Art von Modellen geht man davon aus, dass die Übergänge zwischen den verschiedenen Kanalzuständen stochastische Prozesse sind, und befasst sich meist mit den Auswirkungen von entweder Einzelkanalströmen oder Clusterströmen auf die zellulären Calcium-Signale [44–49].

Ausgangspunkt des ursprünglichen Modells von De Young und Keizer ist, dass der IP<sub>3</sub>-Rezeptor aus vier Untereinheiten besteht, die jeweils eine Bindungsstelle für IP<sub>3</sub> und zwei Bindungsstellen für Calcium besitzen. Diese drei Bindungsstellen können entweder frei ( $\hat{=} 0$ ) oder besetzt ( $\hat{=} 1$ ) sein, so dass sich pro Untereinheit des Kanals  $2^3 = 8$  mögliche Zustände ergeben. Für die Übergänge zwischen den verschiedenen Kanalzuständen wird ein kinetisches Reaktionsschema zugrunde gelegt. Befinden sich gleichzeitig mindestens drei der vier Untereinheiten im Zustand 110 (IP<sub>3</sub> gebunden, Ca<sup>2+</sup> gebunden, unbesetzt), so öffnet der Kanal und Calcium wird aus dem ER freigesetzt. Sobald die zweite Calcium-Bindungsstelle, die eine langsamere Reaktionskinetik als die erste Calcium-Bindungsstelle besitzt, ebenfalls mit einem Calcium-Ion besetzt ist, sich die Untereinheit also im Zustand 111 befindet, wird diese Untereinheit blockiert. Dadurch berücksichtigt das Modell sowohl den positiven als auch den negativen Calcium-Feedback-Mechanismus des IP<sub>3</sub>-Rezeptors: Zunächst wird der Kanal durch Calcium und IP<sub>3</sub> aktiviert, doch durch eine weitere Erhöhung der Calciumkonzentration wird es wahrscheinlicher, dass mehr als eine Untereinheit blockiert und der IP<sub>3</sub>-Kanal schließt.

Wie oben bereits erläutert, werden die stochastischen Modelle oft dazu verwendet, um die Auswirkungen von lokalen Calcium-Ereignissen (Blips, Puffs) auf die entstehenden komplexen Calcium-Signale oder die entstehenden Konzentrationsprofile in Kanalnähe zu untersuchen. Ein weiterer Verdienst dieser Modelle ist es, dass die experimentell beobachtete Calcium abhängige Kanalinhibierung als Funktion der Calcium- und der IP<sub>3</sub>-Konzentration reproduziert und erklärt werden kann.

2.2.2 Proteinkinase C  $\alpha$ 

Proteinkinase C  $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) ist ein Protein, welches an der Signaltransduktion der Zelle beteiligt ist und als Read-out Sensor für elementare Calcium-Signale herangezogen werden kann [22] (Review zu PKC, siehe [50]). Des Weiteren ist PKC $\alpha$  ein Musterbeispiel dafür, wie die Regulation der Proteinfunktion von zwei Membranbindungsmodulen gesteuert wird [51]. Im inaktiven Zustand frei im Zytosol diffundierend wird PKC $\alpha$  nur dann aktiviert, wenn gleichzeitig beide Bindungsmodule, die sogenannte C1- und C2-Domänen, mit den „Second Messenger“ Diacylglycerol und Calcium / Phosphatidylserin besetzt sind (siehe Abbildung 2.3). Die Aktivierung von PKC $\alpha$  beginnt mit der äußeren Stimulation der Zelle durch ein Signal („First Messenger“), das an die Zellmembran andockt und in der Membran eine Kaskade von biochemischen Mechanismen in Gang setzt. Am Beginn dieser Kaskade steht die Aktivierung von Phospholipase C, welche dann die Hydrolyse von Phosphatidylinositol (PIP $_2$ ) katalysiert. Hierbei entstehen die beiden „Second Messenger“ Inositoltriphosphat (IP $_3$ ) und Diacylglycerol (DAG). DAG verbleibt in der Plasmamembran, das IP $_3$  jedoch diffundiert frei im Zytosol und öffnet dort die IP $_3$ -Kanäle des endoplasmatischen Retikulums. Die freigesetzten Ca $^{2+}$ -Ionen diffundieren ebenfalls frei im Zytosol und können an die C2-Domäne des PKC $\alpha$ -Proteins binden. Falls zwei Ca $^{2+}$ -Ionen an die C2-Domäne des PKC gebunden sind, ist die elektrostatische Abstoßung zwischen der C2-Domäne und der Plasmamembran soweit verringert, dass der PKC-2Ca $^{2+}$  Komplex bei seinem Random Walk durch das Zytosol der Membran so nahe kommen kann, dass die C2-Domäne an das in der Membran vorhandene

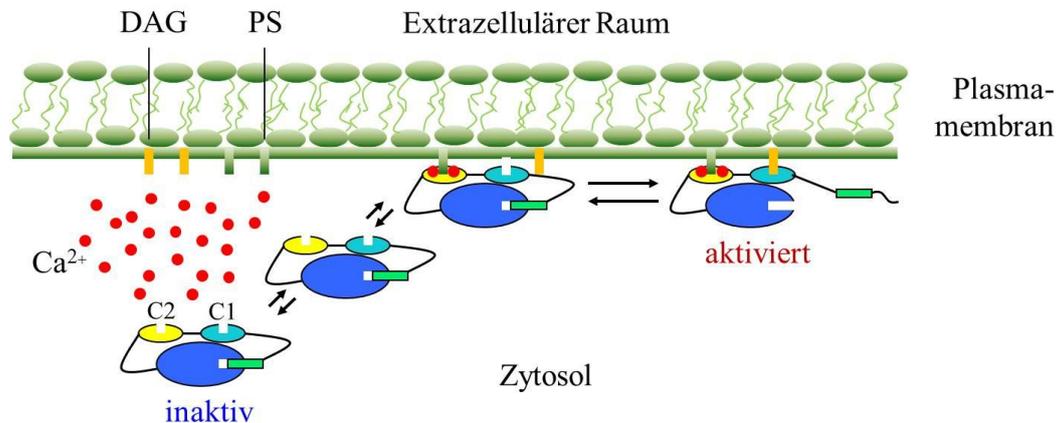


Abbildung 2.3: Aktivierungsschema und Membrantranslokation von Proteinkinase C. Das Binden von zwei Ca $^{2+}$ -Ionen an die C2-Domäne von PKC führt zu der Membrantranslokation von PKC. An der Membran kommt es zur Bildung von zwei unterschiedlichen Membran-PKC-Komplexen mit verschiedener Lebensdauer. Erst eine Bindung an sowohl PS als auch an DAG aktiviert das Enzym.

Phosphatidylserin (PS) binden kann [52].

Das Binden an die Membran kann in Experimenten z.B mit Hilfe von Fluoreszenzproteinen nachgewiesen werden. Dieser Prozess, bei dem das im Zytosol vorhandene PKC $\alpha$  durch Ca<sup>2+</sup>-Aktivierung an die Membran diffundiert bzw. transloziert und dort bindet, bezeichnet man als PKC-Membrantranslokation. Der PKC-2Ca<sup>2+</sup>-PS Komplex hat eine relativ kurze Lebensdauer, was bedeutet, dass die Ablöserate sehr hoch ist. Trifft dieser Komplex jedoch bei seiner zweidimensionalen Diffusion in der Plasmamembran auf ein ebenfalls in der Membran diffundierendes DAG-Molekül, so kann PKC $\alpha$  mittels seiner C1-Domäne zusätzlich noch an DAG binden. Dadurch entsteht ein weitaus stabilerer Komplex mit bis zu 20-fach höheren Lebenszeiten [53] und entsprechend kleinerer Membran-Ablöserate. Das Andocken von PKC $\alpha$  mittels C1-Domäne bzw. mittels C2-Domäne geschieht unabhängig voneinander [54] und es wird vermutet, dass die C1-Membran-Wechselwirkung die Lebensdauer des Komplexes an der Membran bestimmt [55]. Nachdem sowohl C1- als auch C2-Domäne des PKC an die Membran gebunden haben, kommt es zu einer Konformationsänderung des Komplexes und der Freisetzung des Pseudosubstrates (grünes Rechteck, siehe Abbildung 2.3) aus dem aktiven Zentrum und somit zur Aktivierung des Enzyms [56].

## 2.3 Calcium-Signale am Beispiel von T-Lymphozyten

### 2.3.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten oder kurz T-Zellen sind fast perfekt kugelförmige Zellen (siehe Abbildung 2.4 a), gehören zu einer Gruppe der weißen Blutzellen und sind bedeutender Bestandteil des Immunsystems. In der Zellmembran der T-Zellen befindet sich der sogenannte T-Zell-Rezeptor, der nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip auf ganz bestimmte Moleküle von schädlichen, antigenpräsentierenden Zellen passt. T-Zellen können unterschiedliche Funktionen haben. Eine Spezies der Lymphozyten, die T-Killerzellen, besitzen die Aufgabe den Organismus nach Zellen, deren Zelloberfläche z.B. durch Virusinfektionen oder Mutation (Tumorzellen) verändert wurde, zu durchsuchen und diese dann zu zerstören. Um ihre jeweiligen Funktionen korrekt ausführen zu können, müssen die T-Zellen durch Aktivierung bestimmter Gene des Zellkerns zunächst in ihren aktivierten Zustand übergehen. Der erste Schritt zur erfolgreichen T-Zell-Aktivierung stellt die Ausbildung einer Immunologischen Synapse dar [57, 58]. Die Immunologische Synapse bezeichnet im Wesentlichen die Kontaktfläche zwischen dem Lymphozyten und der antigenpräsentierenden Zelle (siehe Abbildung 2.4 b). Ihre vollständige Ausbildung - im Gegensatz zum Vorkommen einer transienten / kurzfristigen Synapse - erfordert ein langanhaltendes und robustes Calcium-Signal über mehrere Minuten bis hin zu Stunden. Wie dies in T-Zellen erreicht wird, soll im Folgenden erläutert werden.

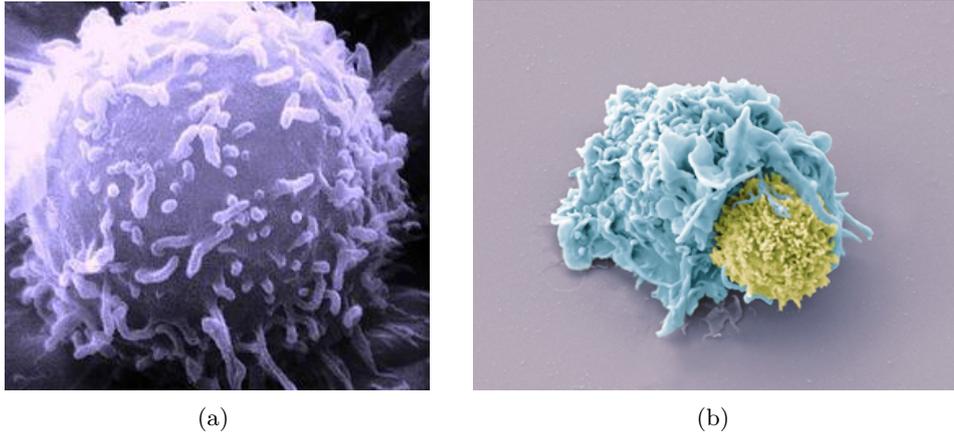


Abbildung 2.4: Mikroskopie-Aufnahmen einer T-Zelle. a) Aufnahme einer T-Zelle mittels Elektronenmikroskopie [59]. b) Kontakt zwischen einem T-Lymphozyten (gelb) und einer antigenpräsentierenden Zelle (dendritische Zelle; blau). Die Ausbildung dieses Kontakts kann zur Bildung einer Immunologischen Synapse führen. Mit freundlicher Genehmigung des Institut Pasteur Paris [60].

### 2.3.2 Funktion der Mitochondrien für die Calcium-Signalgebung

Mitochondrien werden meist als Kraftwerke der Zelle bezeichnet, da sie das energiereiche Molekül Adenosintriphosphat (ATP) bilden, das für eine Vielzahl von intrazellulären Prozessen als chemische Energiequelle dient. Sie haben einen Durchmesser von etwa  $0,5\text{--}1,5\ \mu\text{m}$  und sehr unterschiedliche Formen, von einzelnen kleinen Gebilden bis zu komplexen Netzwerken [61, 62] (siehe Abbildung 2.5 b)). In T-Zellen kann abgeschätzt werden, dass sie in 2D ca. 10% der Zellfläche einnehmen. Mitochondrien sind aus einer inneren und einer äußeren Membran aufgebaut (siehe Abbildung 2.5 a)). Im Inneren der Organelle befindet sich die flüssige Mitochondrienmatrix, in der hauptsächlich die Energieproduktion des Mitochondriums stattfindet.

Neben ihrer Funktion als Energielieferant ist mittlerweile aber auch bekannt, dass Mitochondrien Einfluss auf die Calcium-Signalgebung haben (Reviews, siehe z.B [63, 64]) und an der Steuerung der Signaltransduktion [65] und Apoptose [66] beteiligt sind. Des Weiteren sind Mitochondrien sehr starke Calcium-Puffer, die über eine direkte (physische und funktionelle) Kopplung zum ER verfügen und das aufgenommene Calcium über ihr weitverzweigtes Netzwerk im Zellzytosol verteilen. Die Calcium-Aufnahme der Mitochondrien erfolgt durch einen in der inneren Membran lokalisierten Calcium-Uniporter, wohingegen die Abgabe von mitochondrialem Calcium  $\text{Ca}_m^{2+}$  durch einen Natrium-Calcium-Austauscher erfolgt. Wichtig zu erwähnen ist, dass die Calcium-Aufnahme durch den Uniporter von der extramitochondrialen Calciumkonzentration  $\text{Ca}_e^{2+}$  abhängt. Für kleine Erhöhungen der zytosolischen Calciumkonzentration stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der zytosolischen Calciumkonzentration  $\text{Ca}_e^{2+}$  und der Konzentration innerhalb der

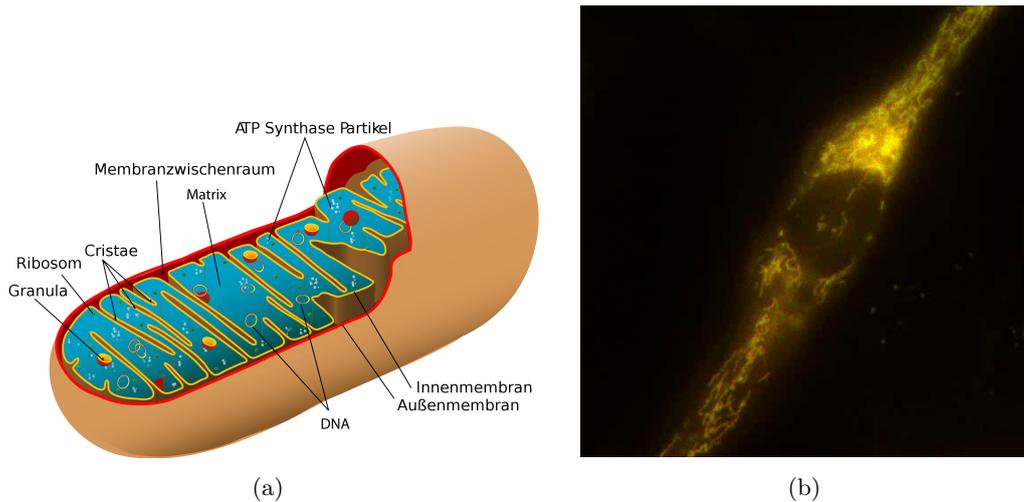


Abbildung 2.5: Aufbau und Form von Mitochondrien. a) Die Hülle der Mitochondrien besteht aus einer äußeren und einer inneren Membran. Die äußere Membran umhüllt das Organell wie eine Schale, wohingegen die innere Membran zur Oberflächenvergrößerung gefaltet und gefächert ist. Zwischen diesen Falten befindet sich die flüssige Mitochondrienmatrix, in der die Energieproduktion des Mitochondriums stattfindet. Die für die Calcium-Signalgebung wichtigen Transportproteine sind in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert. Calcium wird sehr schnell durch den Uniporter aufgenommen und langsam durch den Calcium-Austauscher wieder ins Zytosol abgegeben. Abbildung übernommen von [67]. b) Mitochondrien (gelb eingefärbt) in einer Krebs Zelle (Wistar Melanoma), die mit dem ATP-Sensor Ateam markiert sind. Gut zu erkennen ist die teilweise röhrenförmige Struktur der Mitochondrien sowie der Zusammenschluss der Mitochondrien zu weitreichenden Netzwerken. Mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe Prof. Markus Hoth [68].

Mitochondrien  $\text{Ca}_m^{2+}$  ein. Ab einem Wert von  $\text{Ca}_e^{2+}$  von ca. 400-500 nM übersteigt jedoch die Calcium-Aufnahme durch den Uniporter die Calcium-Abgabe durch den Natrium-Calcium-Austauscher und die Mitochondrien beginnen mit der Pufferung von Calcium [63, 69]. Diese Pufferfunktion für erhöhte zytosolische Konzentrationen erlaubt die Regulierung von Calcium-Kanälen durch die Mitochondrien. Es wurde gezeigt, dass beispielsweise  $\text{IP}_3$ -Kanäle [70] und auch CRAC-Kanäle [65] durch Mitochondrien reguliert werden.

Nicht nur aufgrund der Regulierung des CRAC-Kanals, der Haupteinstromquelle von extrazellulärem Calcium in T-Zellen, lässt sich vermuten, dass Mitochondrien essentiell für die erfolgreiche T-Zell-Aktivierung sind. Vielmehr gibt es mittlerweile zahlreich Hinweise darauf, dass Mitochondrien an der Calcium-Signalgebung in T-Zellen beteiligt sind. Beispielsweise führt eine Blockade der als Calciumpuffer wirkenden Mitochondrien zu einer Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration [71], auch wenn man intuitiv

das gegenteilige Ergebnis erwarten würde. Mitochondrien reduzieren in T-Zellen also nicht die Calcium-Signale, sondern verstärken diese. Außerdem kommt es im Zuge der Zellpolarisierung auch zu einer aktiven Translokation von Mitochondrien zu der Immunologischen Synapse [13, 72–74]. Die Auswirkungen dieser Translokation werden im Abschnitt 2.4 noch genauer erläutert.

### 2.3.3 Calcium-ATPase (SERCA / PMCA -Pumpe)

Calcium-Signale entstehen durch einen Austausch von Calcium-Ionen zwischen Zytosol und dem extrazellulären Raum sowie zwischen dem Zytosol und intrazellulären Calciumspeichern. Die Calciumruhekonzentration liegt in Zellen typischerweise im Bereich von 50-100 nM [3]. Sowohl die Konzentration im Endoplasmatischen Retikulum [75, 76] als auch im extrazellulären Raum beträgt einige Millimol, wodurch sich in beiden Fällen ein riesiger Gradient von ca.  $10^3 - 10^4$  Größenordnungen zur Konzentration des Zytosols ergibt. Diese hohen Konzentrationsunterschiede können aufrechtzuerhalten werden, da Pumpen durch Energieverbrauch Calcium entgegen den Gradienten aus dem Zytosol heraus transportieren. Im Falle des Endoplasmatischen Retikulums bezeichnet man diese Pumpe als „Sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase“ (SERCA) und im Falle der Plasmamembran als „Plasma membrane calcium ATPase“ (PMCA).

Die Struktur und Funktionsweise der beiden Calcium-Pumpen ist sehr ähnlich (SERCA, siehe Abbildung 2.6 b)). Beide nutzen ATP als Energielieferant um Calcium aus dem Zytosol heraus zu transportieren. Entscheidend für ihre Funktionsweise ist das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Konformationen der Proteine, was im Folgenden am Beispiel der SERCA-Pumpe erläutert werden soll.

Ein Pumpzyklus kann als Abfolge verschiedener Reaktionen aufgefasst werden (siehe Abbildung 2.6 a)) und läuft für SERCA [77] und PMCA [78] fast identisch ab: 1) Die als E1 bezeichnete Konformation bindet mit sehr hoher Affinität zwei Calcium-Ionen des Zytosols. 2) Danach bindet ATP an die Pumpe wodurch die Phosphorylierung der SERCA eingeleitet wird. 3) Es findet eine Konformationsänderung der Pumpe in den sogenannten E2-Zustand mit geringer Calcium-Affinität statt. 4) Die beiden Calcium-Ionen werden in das Endoplasmatische Retikulum freigesetzt. 5) Der nächste Schritt besteht in der Dephosphorylierung der SERCA. 6) Es folgt der Übergang von der E2-Konformation (ER-Lumen, niedrige  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität) zur E1-Konformation (Zytosol, hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität), wodurch der Pumpzyklus erneut beginnen kann.

Beide ATPase-Pumpen haben einen großen Einfluss auf die Calcium-Signalgebung in Zellen. Der nichtlineare Calcium-Austausch zwischen ER und Zytosol, der über die  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren sowie die SERCA-Pumpen erfolgt, erzeugt Calcium-Oszillationen und Calcium-Wellen wie beispielsweise die Experimente in *Xenopus*-Eizellen zeigen [79, 80]. Die PMCA-Pumpe wiederum hat einen starken regulatorischen Effekt auf den CRAC-Kanal [81, 82], dessen Calciumstrom so essentiell für die T-Zell-Aktivierung ist. Die Aktivität der beiden Pumpen ist unter Ruhebedingungen relativ gering und steigt mit erhöhter Calciumkonzentration an [81–84], bis sie schließlich in eine Sättigung übergeht.

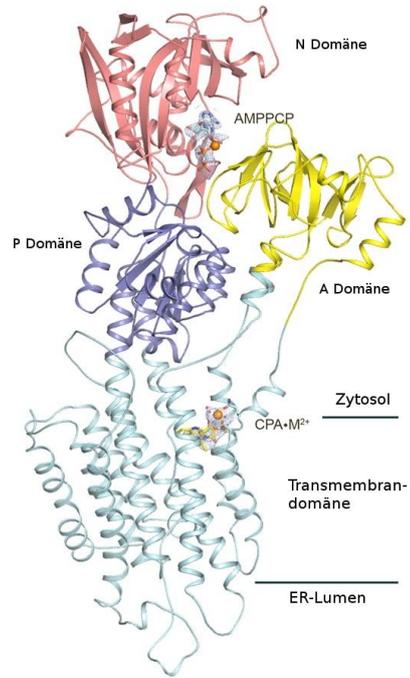
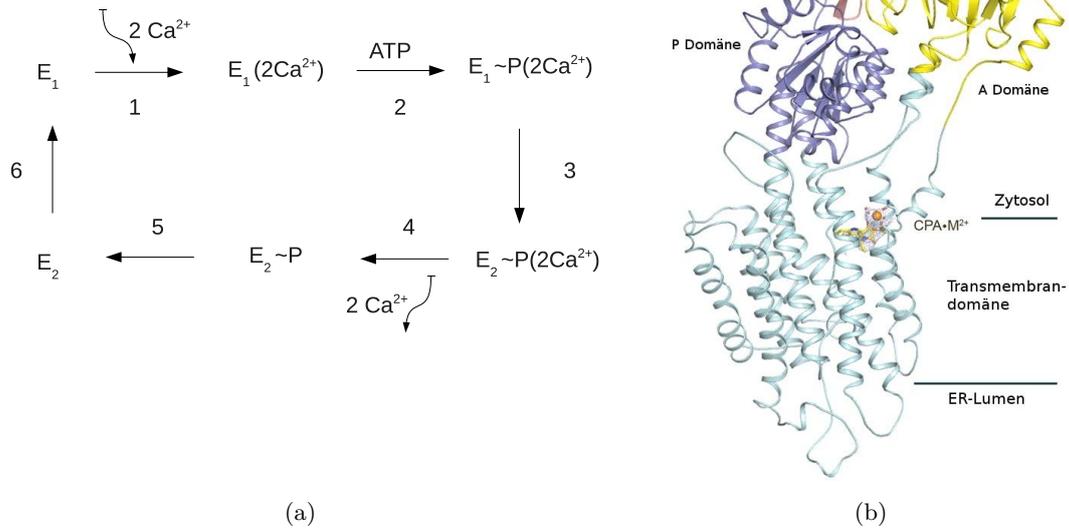


Abbildung 2.6: Calcium-Transportzyklus und Struktur der SERCA-Pumpe. a) Reaktionsschema für den Transport von Calciumionen durch die SERCA-Pumpe. Skizziert ist der oben im Text beschriebenen Transportzyklus, wobei die E1-Konformation eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität besitzt und zwei Calciumionen aus dem Zytosol bindet und die E2-Konformation mit niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität das Calcium im ER-Lumen freisetzt. b) Schematische Darstellung der SERCA: gezeigt ist die N-Domäne (rot, Nucleotidbindende Domäne), die A-Domäne (gelb, Aktivierungs- oder  $\beta$ -Faltblatt), die P-Domäne (lila, Phosphorylierungsdomäne) und die Transmembrandomäne (hellblau). Entnommen aus [85].

### 2.3.4 Calcium „Toolkit“ und Aktivierung von T-Lymphozyten

#### Calcium „Toolkit“

Calcium kann selbst Signalgeber sein, steuert jedoch meist als Second Messenger diverse Zellprozesse. Unabhängig von der Funktion als Primär- oder Sekundärsignal kann die Calcium-Signalgebung auf der einfachsten Ebene der Beschreibung in vier Schritte unterteilt werden (Reviews zur Calcium-Signalgebung, siehe [1–3]):

1. Stimulus, der zur Erzeugung der Calcium-Signale führt.
2. On-Mechanismus (Ein-Mechanismus), der eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration bewirkt.
3. Calcium stimuliert verschiedene Calcium-sensitive Prozesse.
4. Off-Mechanismus (Aus-Mechanismus), der die Zelle in ihren Ruhezustand zurückbringt.

Den Anfang macht ein äußerer Stimulus, der an die Zellmembran bzw. an darin enthaltene Rezeptoren andockt und eine Reaktionskaskade in der Zellmembran in Gang setzt. Im Zusammenhang mit der Calcium-Signalgebung ist das Endprodukt dieser Reaktionen meist Inositoltrisphosphat, welches wiederum den On-Mechanismus einleitet. Unter dem On-Mechanismus werden alle möglichen Prozesse zusammengefasst, die zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führen. Dazu zählen sowohl extrazelluläre Calcium-Einströme durch Membrankanäle (spannungs-, rezeptor- und speicher-gesteuerte Kanäle) als auch die Ausschüttung von Calcium aus intrazellulären Calcium-Speichern. Nach erfolgreicher Erzeugung des Calcium-Signals durch den On-Mechanismus laufen diverse Calcium-sensitive Prozesse ab, deren Konsequenz eine entsprechende Zellantwort, z.B. Muskelkontraktion, darstellt. Sobald Calcium seine Funktion durch Entstehung des Calcium-Signals erfüllt hat, wird es schnellstmöglich wieder aus dem Zytosol entfernt und die Zelle geht in ihren Ruhezustand über. Dazu wird es entweder von Pumpen aus der Zelle befördert oder in die vorhandenen Speicher zurück gepumpt. Es kann aber auch von mobilen und immobilen Puffern sowie diversen Zellorganellen aufgenommen und langsam wieder abgegeben werden.

Die genauen Abläufe der Calcium-Signalgebung werden im Folgenden detaillierter am Beispiel der T-Zell-Aktivierung erläutert (siehe Abbildung 2.7).

#### Calcium-Signale während der T-Zell-Aktivierung

Die Entstehung von Calcium-Signalen ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zellorganellen, Calcium-Kanälen und Calcium-Pumpen. Diese Kanäle und Pumpen transportieren und verteilen das Calcium zwischen den verschiedenen Zellbestandteilen sowie dem Zellinneren (Zytosol) und dem extrazellulären Raum. Wie bereits erwähnt, ist zur korrekten Ausübung der T-Zell-Funktion zunächst die Aktivierung der T-Zelle und damit verbunden ein langanhaltendes, robustes Calcium-Signal notwendig (Review

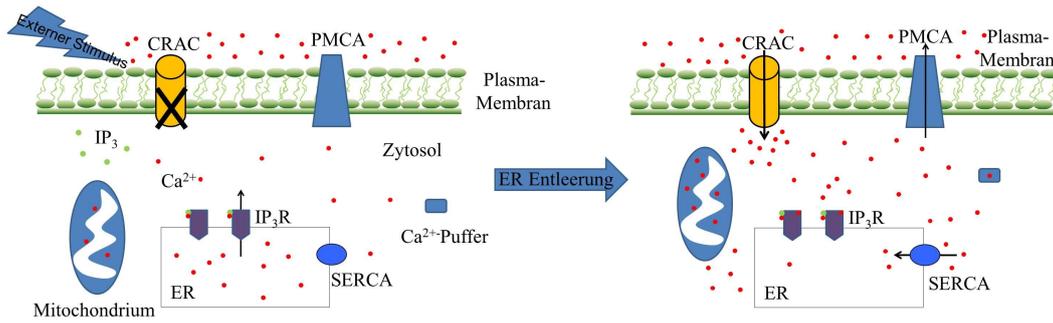


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Calcium-Signalgebung. Links zu sehen ist die Stimulation der Zelle durch einen äußeren Reiz, welcher zur Calcium-Freisetzung durch die  $IP_3$ -Rezeptoren ( $IP_3R$ ) führt. Die Calcium-Freisetzung hat die Entleerung des Endoplasmatischen Retikulums zur Folge, was dann die Öffnung des speichergesteuerten CRAC-Kanals induziert. Rechts dargestellt ist die Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration durch den massiven Calcium-Einstrom, die von der Aktivierung der Calcium-Pumpen (SERCA- und PMCA-Pumpen) begleitet wird.

zur Calcium-abhängigen T-Zell-Aktivierung, siehe z.B. [86]).

Die Calcium-Signalgebung in T-Zellen beginnt mit einem äußeren Stimulus, der durch die Wechselwirkung des T-Zell-Rezeptors mit einer antigenpräsentierenden Zelle dargestellt wird. Danach kommt es zur Ausbildung einer Kontaktfläche, der sogenannten Immunologischen Synapse (IS), zwischen der T-Zelle und der antigenpräsentierenden Zelle [57, 58]. Diese Kontaktfläche bleibt bis zur vollständigen Aktivierung der T-Zellen für mehrere Minuten bis hin zu Stunden bestehen [87, 88]. Im frühen Stadium der T-Zell-Aktivierung kommt es an der IS zur Bildung von  $IP_3$ , welches ins Zytosol freigesetzt wird und darin diffundiert bis es an die  $IP_3$ -Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums (ER) bindet.  $IP_3$ -Rezeptoren besitzen vier Untereinheiten mit jeweils drei Bindungsstellen, eine für  $IP_3$  und zwei für Calcium. Sind gleichzeitig bei mindestens drei der vier Untereinheiten die  $IP_3$ -Bindungsstelle und die erste, jedoch nicht die zweite Calcium-Bindungsstelle besetzt, so öffnet der Kanal und Calcium wird aus dem ER freigesetzt. Sobald die zweite Calcium-Bindungsstelle, die eine langsamere Reaktionskinetik als die erste Calcium-Bindungsstelle besitzt, ebenfalls mit einem Calcium-Ion besetzt ist, wird die Untereinheit blockiert. Durch eine weitere Erhöhung der Calciumkonzentration wird es also wahrscheinlicher, dass mehr als eine Untereinheit blockiert und der  $IP_3$ -Kanal schließt. Somit besitzt der  $IP_3$ -Rezeptor sowohl einen positiven als auch einen negativen Calcium-Feedback-Mechanismus.

Die Entleerung des ER und die damit verbundene Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration würde nicht zur T-Zell-Aktivierung ausreichen, ist aber notwendig, um die speichergesteuerten Calcium-Kanäle der Zellmembran zu aktivieren. Abhängig vom ER-Füllstand öffnen sich die sogenannten „Calcium Release-Activated Calcium“<sup>8</sup> (CRAC)

<sup>8</sup>Calcium-Freisetzung aktiviert Calcium

Kanäle, die in der Zellmembran sitzen und bei entleertem Speicher den Einstrom von extrazellulärem Calcium ins Zellzytosol ermöglichen. Der CRAC-Kanal wird durch die beiden Proteine STIM (Stromal Interaction Molecule) und Orai gebildet [89–91] und ist in T-Zellen die einzig nennenswerte Quelle für Calcium-Einstrom [92, 93]. Durch diesen Einstrom entstehen komplexe Calcium-Signale, die im Allgemeinen nun Calcium-sensitive Prozesse steuern und in T-Zellen für die korrekten Genexpressions-Profile und die T-Zell-Aktivierung verantwortlich sind.

Da unter normalen Umständen eine zu hohe Calciumkonzentration schädlich ist, kommt es nach der Entstehung der Calcium-Signale zu dem Off-Mechanismus. Dieser sorgt dafür, dass die Erhöhung der Calciumkonzentration endet, das Calcium wieder aus dem Zytosol entfernt wird, und die Zelle in ihren Ruhezustand übergeht. Ein Teil des Off-Mechanismus besteht in der Verringerung der zytosolischen Calciumkonzentration schon während der eigentlichen Signalgebung. Dies geschieht einerseits durch Abpumpen des Calciums in den extrazellulären Raum. In T-Zellen sind dafür hauptsächlich die in der Membran sitzenden PMCA-Pumpen verantwortlich [81]. Zum anderen wird Calcium von mobilen und immobilisierenden Calciumpuffern gebunden und dann mit der Zeit langsam wieder ins Zytosol abgegeben. Außerdem wird Calcium auch von den Mitochondrien gepuffert und nach Ende des Calcium-Signals wieder abgegeben, wobei die Mitochondrien zusätzlich zur Pufferung auch noch eine räumliche Umverteilung des Calciums vornehmen.

Der zweite Teil des Off-Mechanismus besteht in der Beendigung einer weiteren Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration, also der Schließung der jeweiligen Calcium-Kanäle, im Fall der T-Zelle also der Inhibierung der CRAC-Kanäle. Es gibt verschiedene Calcium-abhängige Mechanismen, die zu einer Deaktivierung oder zumindest zu einer geminderten Aktivität des CRAC-Kanals führen [94–97]. Als speichergesteuerter Kanal ist natürlich das Wiederauffüllen des ER mittels der sogenannten SERCA-Pumpen ein möglicher Weg der Deaktivierung. Aber auch die Entstehung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomäne in der direkten Umgebung des CRAC-Kanals mindert die Kanalaktivität. Es existieren also mindestens zwei unabhängige und durch Calcium gesteuerte Feedback-Mechanismen die zu einer Inhibierung der CRAC-Kanäle führen [9–11].

Aber gerade an dieser Stelle sind die T-Zell-Aktivierung und die Calcium-Signalgebung in T-Zellen einzigartig und nehmen eine besondere Stellung ein. Denn obwohl die Natur eine Reihe von Mechanismen zur Verfügung stellt, die unter normalen Umständen dafür sorgen, dass der Off-Mechanismus relativ schnell eintritt um eine mögliche toxische / schädliche Wirkung einer zu hohen Calciumkonzentration zu verhindern, schaffen es T-Zellen, die zytosolische Konzentration über mehrere Stunden konstant hoch zu halten. Gerade dieses langandauernde und robuste Calcium-Signal ist entscheidend für die korrekte T-Zell-Aktivierung, T-Zell Funktion und Proliferation [98]. Es gibt Hinweise, dass die Polarisation von T-Zellen, also die räumliche Neuordnung von Zellorganellen, Calcium-Kanälen und Pumpen, maßgeblichen Anteil an der Aufrechterhaltung der Calciumsignale hat [13].

## 2.4 CRAC-Kanal und T-Zell-Polarisierung

### 2.4.1 CRAC-Kanal

Der CRAC-Kanal wird durch die beiden Proteine STIM und Orai gebildet [89–91], und es gibt eine direkte STIM-Orai Wechselwirkung, die hinreichend für die Öffnung des CRAC-Kanals ist [89]. Er gehört zu der Klasse der speichergesteuerten oder SOC<sup>9</sup>-Kanäle, und der Calcium-Einstrom durch die Plasmamembran wird ausgelöst, wenn der intrazelluläre Calcium-Speicher, das Endoplasmatische Retikulum, entleert ist.

STIM-Proteine wirken wie ein Sensor und erkennen den Füllstand bzw. die Calcium-Entleerung des ER. STIM ist ein Transmembranprotein, welches an seiner Transmembrandomäne im Lumen des ER eine Calcium-Bindungsstelle besitzt [99]. Diese ist bei aufgefülltem ER (Konzentrationen im Millimol Bereich) mit genau einem Ca<sup>2+</sup>-Ion besetzt [100]. Sobald die Entleerung des ER durch Öffnung der IP<sub>3</sub>-Rezeptoren einsetzt, dissoziiert Calcium von dieser Bindungsstelle, und die Oligomerisation bzw. Dimerisation der STIM-Moleküle setzt ein [99]. Nachdem sich die STIM-Oligomere geformt haben, translozieren diese mit unbesetzter Calcium-Bindungsstelle („empty-handed“) zur Plasmamembran und bilden dort Cluster, die sogenannten „Puncta“. Diese Cluster oder Puncta haben typischerweise Oberflächenausdehnungen von 1600–9000 nm<sup>2</sup> [91]. Aus FRET<sup>10</sup>- und TIRF<sup>11</sup>-Mikroskopie-Experimenten weiß man, dass sich die STIM-Oligomere an speziellen ER-Plasmamembran Verbindungsstellen („Junctions“) anlagern, die sich durch ihren sehr geringen Abstand ER-Plasmamembran von ca. 10-25 nm auszeichnen [101]. Die Clusterung der STIM an der Plasmamembran ist ein sehr schneller Prozess, der innerhalb weniger Sekunden und vor der Aktivierung der CRAC-Kanäle abläuft. Außerdem sind die STIM-Oligomerisation sowie die Entstehung von Puncta reversible Prozesse, die durch den ER-Füllstand kontrolliert werden [102]. Die Oligomerisation der STIMs, sowie deren Translokation zu ER-Plasmamembran Junctions und die Bildung von Punctas sind zwei sequentielle Prozesse. Nach der Entleerung des ER dauert es nur ca. 5 Sekunden, bis sich die STIM-Oligomere in der ER-Membran gebildet haben, wobei es jedoch in den gleichen Zellen ca. 40 Sekunden dauerte, bis die Oligomere zu den ER-Plasmamembran Junctions transloziert sind [102]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Oligomerisation der STIMs notwendig und hinreichend für die Translokation zu den ER-Plasmamembran-Junctions und für die CRAC-Kanal Aktivierung ist. In Experimenten wurde die STIM-Oligomerisation chemisch induziert, was zu Membrantranslokationen und zur CRAC-Kanal Aktivierung führte, ohne dass das ER entleert wurde [100].

Die STIM Signal-Transduktion ist ein lokaler Prozess. Mittels FRAP<sup>12</sup>-Experimenten wurde die Diffusionsrate von STIM vor und nach der ER-Entleerung zu 0,1 bzw. 0,05  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  bestimmt [102]. Eine einfache Abschätzung der mittleren freien Rekrutierungslänge

---

<sup>9</sup>(„store-operated“)

<sup>10</sup>Förster-Resonanzenergietransfer Mikroskopie

<sup>11</sup>Total internal reflection fluorescence microscopy (Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie)

<sup>12</sup>Fluorescence recovery after photo-bleaching

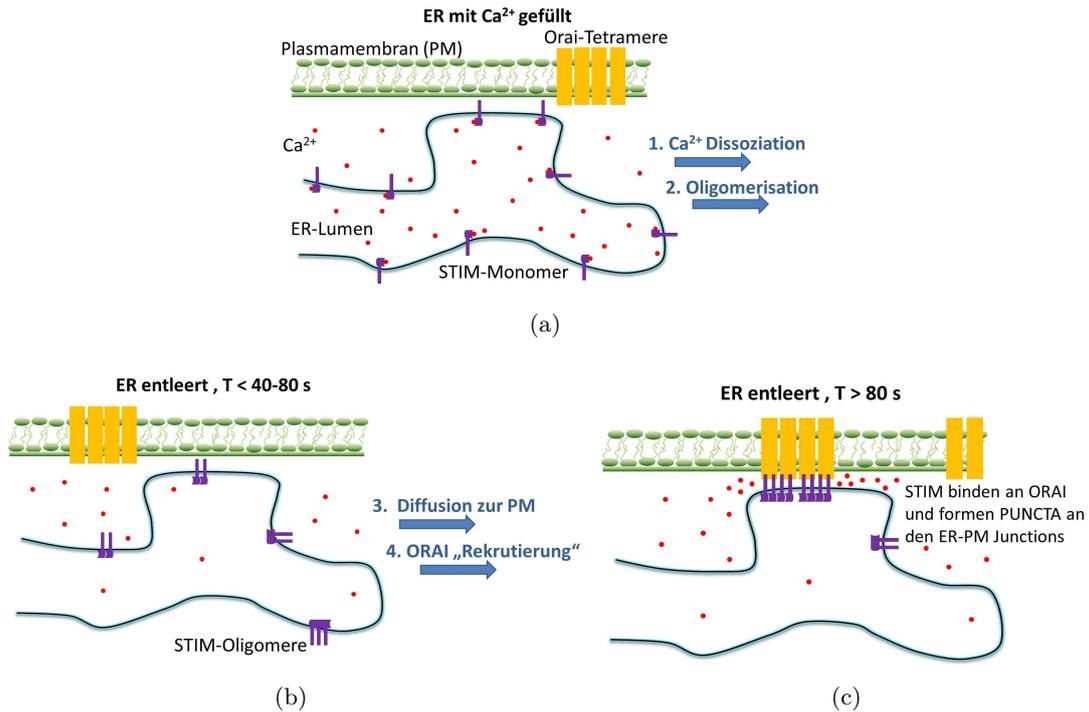


Abbildung 2.8: Vier Schritte des STIM1-Signalwegs vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) hin zur Plasmamembran. Bei gefülltem ER verhindert eine Ca<sup>2+</sup>-Bindung an die STIM1-Proteine deren Oligomerisation. Als ein erster Aktivierungsschritt führt die Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung zu einer Dissoziation der Calcium-Ionen von den STIM1-Proteinen. STIM1, die keine Calcium-Ionen gebunden haben, oligomerisieren sehr schnell und diffundieren frei in der ER-Plasmamembran. An den sogenannten ER-Zellmembran-Junctions fangen die STIM1-Oligomere die in der Zellmembran diffundierenden Orai1-Proteine ein und bilden zusammen mit ihnen den CRAC-Kanal. In Anlehnung an eine Abbildung aus [102].

über die Beziehung  $\langle x_{rekrut} \rangle = (4Dt/\pi)^{1/2}$  lieferte bei Annahme einer Zeitspanne von  $t = 40$  s, die die oligomerisierten STIMs benötigen, um die Punctas zu bilden, ein  $x_{rekrut}$  von 1,6 bzw. 2,3  $\mu\text{m}$  [103]. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass lediglich STIM-Proteine mit einem Abstand  $x_{rekrut} < 2 \mu\text{m}$  zur Bildung der Punctas beitragen können. Die geclusterten STIM-Proteine fangen dann an diesen Stellen, die in der Plasmamembran frei diffundierenden Orai, wie in einer Art „Diffusion-Trap“ (Diffusionsfalle) Modell ein [25]. FRAP-Experimente lassen die Diffusionsrate der Orai sowie das Verhältnis von fest in der Membran zu frei diffundierenden Orai abschätzen. Aus den Experimenten ergibt sich eine freie Diffusion der Orai in der Plasmamembran (PM) zu  $D_{Orai} = 0,07 \pm 0,011 \mu\text{m}^2/\text{s}$  [91]. Außerdem kann abgeschätzt werden, dass ca.  $84\% \pm 2\%$  der Kanäle in der Membran mobil sind [91]. Insgesamt kann der STIM-Signalweg vom ER

bis hin zur Plasmamembran in vier Schritte gegliedert werden (siehe Abbildung 2.8) [102]:

- i) Rezeptor-induzierte Reduzierung der ER Calciumkonzentration und damit verbunden eine Verringerung der Anzahl an STIMs, deren Transmembrandomäne im ER-Lumen mit Calcium besetzt ist.
- ii) STIMs, an die kein Calcium gebunden ist, bilden sehr schnell Oligomere entlang des ER-Netzwerkes ( $t < 5$  s).
- iii) Es kommt zu einer Ansammlung von STIM-Oligomeren (deren Abstand  $x_{rekruit} < 2 \mu\text{m}$  ist) an ER-Plasmamembran Junctions. Es bilden sich die sogenannten Punctas aus.
- iv) An diesen ER-Plasmamembran Junctions rekrutiert STIM in einer Art Diffusionsfalle Orais und aktiviert somit die CRAC-Kanäle.

In Abhängigkeit von der Anzahl an STIMs, die an die Orai-Tetramere gebunden sind, kommt es zu abgestuften CRAC-Strömen [25, 104]. Ein maximaler Strom wird bei CRAC-Kanälen gemessen, die aus einem Orai-Tetramer und daran gebunden 8 STIM-Proteinen bestehen. Der maximale Strom kann durch eine Bereitstellung von mehr STIM-Proteinen, z.B. durch eine künstliche STIM Überexpression, nicht weiter erhöht werden [104]. Des Weiteren kann gezeigt werden, dass eine Überexpression von STIM zusammen mit Orai hinreichend für starke CRAC-Ströme ist [105].

Neben der CRAC-Kanal-Bildung und -Aktivierung ist natürlich auch die Kanal-Deaktivierung bzw. Inhibierung ein wichtiges Forschungsfeld [94–96]. Gerade im Fall der T-Zell-Aktivierung ist die Frage nach den möglichen Inhibierungsmechanismen von großer Bedeutung, da nur eine Umgehung dieser Inhibierungsmechanismen zu einer stabilen und langandauernden T-Zell-Aktivierung führen kann. Zusätzlich zum Wiederanstieg der ER Calciumkonzentration gibt es wahrscheinlich noch weitere Mechanismen, die zur Inhibierung der CRAC-Kanäle beitragen. Diese negative Feedback-Mechanismen resultieren direkt aus dem Calcium-Einstrom durch den CRAC-Kanal und dem damit verbundenen, lokalen Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration, bzw. der Entstehung von Calcium-Mikrodomänen [9–11, 106]. Der genaue Ablauf dieser Deaktivierungs / Inhibierungsmechanismen ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig verstanden.

2.4.2 T-Zell-Polarisierung und Calcium-Signalgebung

T-Zell-Polarisierung

Auf die Bildung einer Immunologischen Synapse (IS) folgt in T-Zellen die Polarisation der Zelle. Unter der Zellpolarisierung versteht man im Allgemeinen eine starke morphologische Veränderung der Zelle, die in T-Zellen nach heutigem Forschungsstand maßgeblichen Anteil an der erfolgreichen T-Zell-Aktivierung hat [13, 23]. Während der Zellpolarisierung kommt es an der IS zu einer Anhäufung bzw. Verarmung an Rezeptoren, Zellorganellen, dem Zytoskelett, Calcium-Pumpen und Kanälen. In T-Zellen sind die wichtigsten Bestandteile, die an der Polarisation beteiligt sind, die CRAC / Orai-Kanäle, PMCA-Pumpen, Mitochondrien, sowie das ER mit den in der ER-Membran lokalisierten SERCA-Pumpen und IP<sub>3</sub>-Rezeptoren (siehe Abbildung 2.9).

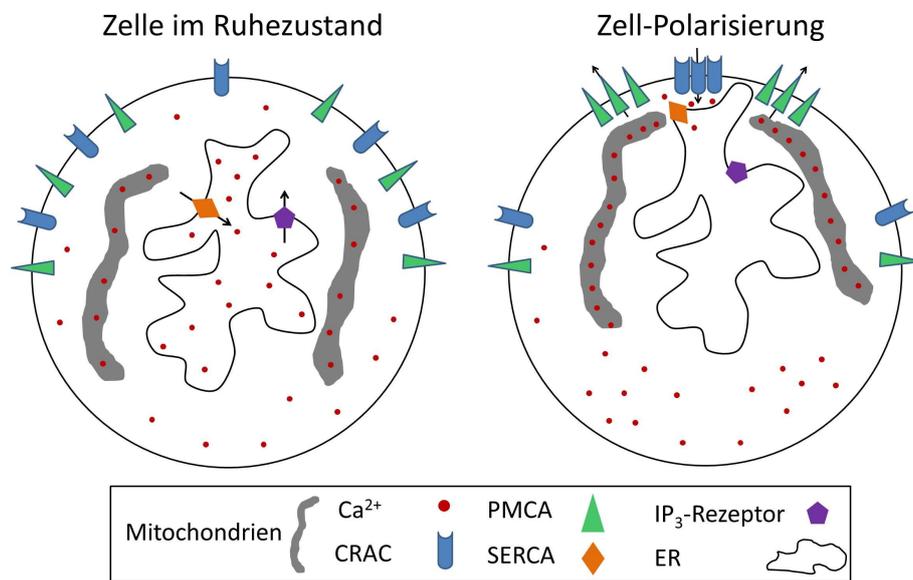


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der T-Zell-Polarisierung. Links zu sehen ist die Verteilung der Calcium-Kanäle und -Pumpen sowie der Zellorganellen unter Ruhebedingungen. Rechts dargestellt ist die räumliche Neuordnung der Zelle nachdem die T-Zell-Aktivierung durch Bildung einer Immunologischen Synapse eingesetzt hat.

### Einfluss der T-Zell-Polarisierung auf die Calcium-Signalgebung

Die Zellpolarisierung ist essentiell für die Calcium-abhängige T-Zell-Aktivierung und die damit verbundene Zellantwort, z.B die Zerstörung einer mutierten oder antigen-präsentierenden Zelle. Nach der Bildung einer Kontaktfläche zwischen T-Zelle und antigen-präsentierender Zelle kommt es zu einer Anhäufung von CRAC / Orai-Kanälen an dem durch die IS ausgezeichneten Zellpol [13, 107]. Nur in Einzelfällen kann auch ein verstärktes Vorkommen von Kanälen an dem der IS gegenüberliegenden Pol beobachtet werden [108]. Da die zur Aktivierung der CRAC-Kanäle benötigten STIM-Proteine hauptsächlich in der Plasmamembran des ER sitzen, ist es logisch, dass auch eine räumlichen Umordnung des ER notwendig ist. Denn nur an Stellen, an denen die Distanz zwischen ER und Zellmembran weniger als ca. 25 nm beträgt [101], können die STIM-Oligomere an Orai-Tetramere binden.

Zusätzlich zu dem Anstieg der CRAC / Orai-Konzentration an der IS und der Umstrukturierung des ER kommt es während der T-Zell-Aktivierung auch zu einer Umverteilung der PMCA-Pumpen. Nach Beginn der Bildung einer IS kann eine verstärkte Präsenz von PMCA-Pumpen an der IS, die sich in der Nähe der CRAC-Kanäle ansammeln, beobachtet werden [13].

Dies ist ein sehr interessantes Ergebnis, da das Abpumpen des zytosolischen Calcium in den extrazellulären Bereich bei T-Zellen fast ausschließlich durch PMCA-Pumpen erfolgt [81]. Die PMCA-Pumpen sind bei Ruhekonzentration recht schwache Pumpen, werden aber durch die Calciumkonzentration moduliert und erreichen recht schnell nach Aktivierung der CRAC-Kanäle (10-60 Sekunden) eine bis zu fünfmal höhere Maximalpumpstärke [81, 82]. Eine Ansammlung von Pumpen in der direkten Umgebung vom Einstromort - wobei jede einzelne Pumpe durch den Einstrom in ihrer Pumpleistung gestärkt wird - ist auf den ersten Blick ein energetisch nicht sehr sinnvoller Prozess, der auch noch im Widerspruch zu den für die T-Zell-Aktivierung notwendigen, langandauernden Calcium-Signalen steht. Um ein starkes und langanhaltendes Calcium-Signal aufrechtzuerhalten, muss das Abpumpen durch die PMCA-Pumpen minimiert und die Calcium-abhängige CRAC-Kanal-Inhibierung gemindert werden.

Es gibt starke Hinweise darauf, dass den Mitochondrien hierbei eine wichtige Rolle zukommt [13, 23, 71, 73]. Zum einen sind Mitochondrien wie bereits beschrieben sehr starke Calcium-Puffer, zum anderen besitzen sie eine direkte (physische und funktionelle) Kopplung zum ER und verteilen das aufgenommene Calcium über ihr weitverzweigtes Netzwerk im Zellzytosol. Im Gegensatz zu der Erwartung, dass eine Blockade der als Calcium-Puffer wirkenden Mitochondrien zu einer Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration führt, konnte das Gegenteil gezeigt werden [71]. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die im Zuge der Zellpolarisierung stattfindende aktive Translokation der Mitochondrien zu der IS [13, 72, 73]. Diese Translokation der Mitochondrien ist Calcium-abhängig [72], wohingegen zu hohe Calciumkonzentrationen die Mobilität der Mitochondrien stark einschränkt oder sogar ganz verhindert [62, 109]. An der IS befinden sich die Mitochondrien in kurzer Distanz (< 200 nm) zu den CRAC-Kanälen [13, 72] und den PMCA-Pumpen [13]. Dadurch sind sie in der Lage, die an den Kanälen entstehende

Calcium-Mikrodomäne und somit die Calcium-abhängige Kanalinhibierung zu reduzieren [65], indem sie in einer Art Wettbewerb oder „Competition“ mit den PMCA-Pumpen um das einströmende Calcium konkurrieren [23].

Zusammenfassend ist die T-Zell-Polarisierung, die kurz nach Bildung einer Immunologischen Synapse einsetzt, von entscheidender Bedeutung für das erfolgreiche Aufrechterhalten eines hohen Calciumsignals und somit für die T-Zell-Aktivierung. Die T-Zell-Polarisierung zeichnet sich hauptsächlich aus durch eine räumliche Umstrukturierung des Endoplasmatischen Retikulums, der Anhäufung von CRAC / Orai-Kanälen sowie PMCA-Pumpen an der IS und einer aktiven Bewegung der Mitochondrien hin zur IS. Experimentelle Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Mitochondrien nahe der IS die Calcium-Mikrodomäne verringern, somit die CRAC-Kanal-Inhibierung reduzieren, einen Wettbewerb um das einströmende Calcium gegen die PMCA-Pumpen führen und das Calcium tief im Zytosol wieder freisetzen. Dieses komplexe Zusammenspiel, inklusive der starken räumlichen Abhängigkeit der Organell- sowie Pump- und Kanal-Positionen, ist nach heutigem Forschungsstand der Schlüssel für eine erfolgreiche T-Zell-Aktivierung.



# Kapitel 3

## Aktueller Stand der Methodik

### 3.1 Einleitung

Die herausragende Stellung von Calcium als „Second Messenger“ rückt das Studium der Calcium-Signalgebung seit zwei Dekaden immer wieder in den Fokus der mathematischen / physikalischen Beschreibung und Modellierung (für ein Review über die Physik der Calcium-Signalgebung siehe Falcke [12]). Bei der Modellierung von Calcium-Signalen ist es fast immer unmöglich, alle an der Entstehung der Signale beteiligten Mechanismen einzubeziehen. Dies liegt zum einen daran, dass an der Calciumsignalgebung meist sehr viele verschiedene Zellorganellen, mobile und immobile Calciumpuffer sowie Calcium-Kanäle und -Pumpen beteiligt sind. Zum anderen sind die Aktivierung und Inhibierung dieser Kanäle und Pumpen meist selbst Calcium-abhängig und werden durch positive oder auch negative Calcium-Feedbackmechanismen gesteuert. Aus diesem Grund sind die Kanäle und Pumpen selbst Gegenstand der aktuellen Forschung und Modellierung, wie die Beispiele des  $IP_3$ -Rezeptors [43, 110, 111], der SERCA-Pumpe [112, 113] sowie des CRAC-Kanals zeigen [25]. Hinzu kommt noch die Schwierigkeit, dass Calcium-Signale auf sehr unterschiedlichen Zeit- und Längenskalen stattfinden, und die räumliche Struktur der Zelle eine wichtige Rolle spielt, was am Beispiel der T-Zell Aktivierung und Polarisierung (siehe Abschnitt 2.4) deutlich wird. Zusammenfassend ist in den meisten konkreten Fragestellungen eine detaillierte bzw. vollständige Beschreibung, der an der Calcium-Signalgebung beteiligten Prozesse, nicht möglich. Deshalb muss bei der computerbasierten Modellierung ein Kompromiss gefunden werden, der eine hinreichend genaue Beschreibung der Zellabläufe mit einer noch vertretbaren Computerrechenzeit vereinbart und gleichzeitig eine Reproduktion experimenteller Ergebnisse sowie das Treffen von Vorhersagen ermöglicht.

### 3.1.1 Reaktions-Diffusions Systeme

Calcium-Signale, die eine lokale oder globale Erhöhung der zytosolischen Calcium-Konzentration bewirken (siehe Kapitel 2), können in die Klasse der Reaktions-Diffusions Systeme eingeordnet werden. Als Reaktions-Diffusions Systeme bezeichnet man Modell-Systeme, bei denen sich die Konzentration einer oder mehrerer Spezies entweder durch eine Umwandlung von Stoffen / Spezies (Reaktion) oder durch die räumliche Bewegung der Stoffe / Spezies (Diffusion) ändert.

Es gibt prinzipiell zwei mögliche mathematische Beschreibungen von gekoppelten biochemischen Systemen, deren zeitliches Verhalten durch partielle Differentialgleichungen beschrieben wird: zum einen deterministisch, durch Lösen der Differentialgleichungen oder zum anderen diskret, durch stochastische Prozesse. Ein stochastischer Prozess ist eine geordnete Folge von zufälligen Vorgängen, die die zeitliche Entwicklung eines Systems beschreibt. Bei der deterministischen Formulierung sind die Variablen die Stoffkonzentrationen, die durch kontinuierliche, zeit- und ortsabhängige Funktionen beschrieben werden und sich gemäß der entsprechenden Reaktionsraten ändern. Im Gegensatz dazu sind bei der stochastischen Beschreibung die Teilchen- oder Molekülzahlen die Variablen. Die Reaktionsraten werden durch die Reaktionswahrscheinlichkeit pro Zeiteinheit ersetzt, und die zeitliche Entwicklung des Systems wird durch einen Markov-Prozess beschrieben. Physikalisch gesehen ist die stochastische der deterministischen Formulierung zum Beispiel in Grenzfällen von sehr wenigen Teilchen oder im Falle von Reaktionsraten, die nichtlinear von den Teilchenzahlen abhängen, überlegen. Jedoch ist die deterministische Beschreibung mathematisch meist leichter umzusetzen, und die Lösung der Systemgleichungen kann mit weniger zeitintensiven Computerberechnungen gewonnen werden. Je nach Problemstellung bieten also beide Arten der Beschreibung Vor- und Nachteile und werden dementsprechend beide in der Literatur zur Modellierung von Calcium-Signalen verwendet.

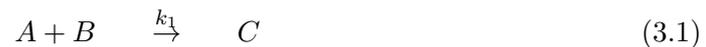
Exemplarisch für die deterministische Beschreibung soll hier das „One-Pool“ Modell [114] genannt werden, eines der ersten Modelle, mit dessen Hilfe die in Zellen beobachteten Calcium-Oszillationen beschrieben werden konnten. Einer der bekanntesten Vertreter für stochastische Modelle im Kontext der Calcium-Signalgebung ist das IP<sub>3</sub>-Rezeptor Modell von De Young und Keizer [43], welches wie das „One-Pool“ Modell ebenfalls zur Erklärung von Calcium-Oszillationen benutzt werden kann. Natürlich gibt es auch die Möglichkeit teils deterministische, teils stochastische Algorithmen zu entwickeln [115], was bei der Modellierung von Calcium-Signalen in großen Geometrien zu einer erheblichen Ersparnis der Computerrechenzeit führen kann. Diese Rechenzeitverkürzung kann erreicht werden, indem man die sehr schnelle Calcium-Diffusion vom restlichen System entkoppelt und deterministisch beschreibt, wohingegen die übrigen Reaktionen / Diffusionen weiterhin stochastisch behandelt werden, wie dies zum Beispiel bei der Modellierung von elementaren Calcium-Signalen auf großen Zellgeometrien angewendet wurde [116].

In der vorliegenden Dissertation werden sowohl die deterministische als auch die stochastische Beschreibung von Reaktions-Diffusions Systemen zur Modellierung von Calcium-

Signalen verwendet. Während alle in der Dissertation beschriebenen Modelle (Kapitel 3-5) eigenständig entwickelt wurden und mit keinen Modellen, die bereits in der Literatur beschrieben wurden korrelieren, orientieren sich die Computer-Algorithmen an bereits aus der Literatur bekannten Verfahren. Für die deterministische Modellierung (Kapitel 5) nutze ich aufgrund der sehr komplexen dreidimensionalen Systemgeometrie die kommerzielle FEM (Finite-Elemente-Methode) Software „Comsol Multiphysics“ [117]. Bei den Modellen, die in Kapitel 3 und 4 vorgestellt werden, handelt es sich um selbst implementierte, stochastische Monte-Carlo-Algorithmen, die Trajektorien von Markov-Prozessen der zugehörigen „Reaction-Diffusion Master Equation“ (RDME) sampeln. Aufgrund der großen Simulationsvolumina und der enormen Teilchenzahlen des betrachteten Reaktions-Diffusions Systems werden sehr effiziente Algorithmen benötigt. Deshalb wurde ein Algorithmus entwickelt, der auf die betrachteten Systeme optimiert ist und von der sogenannte „Next Subvolume Method“ [118] inspiriert ist. Die „Next Subvolume Method“ ist eine numerisch sehr effektive Methode, die sich aus Kombination von Gillespies direkter Methode [119, 120] und der von Gibson und Bruck daraus abgeleiteten „Next Reaction Method“ [121] ergibt. Hauptmerkmal der „Next Subvolume Method“ ist die Unterteilung des Simulationsvolumens in viele kleine Subvolumina. In den folgenden Abschnitten dieses Kapitels soll zunächst der Gillespie-Algorithmus und darauf aufbauend dessen Erweiterungen, die „Next Reaction Method“ und die „Next Subvolume Method“ , vorgestellt werden.

### 3.2 Stochastische Beschreibung

Reaktions-Diffusions Systeme können sowohl deterministisch als auch stochastisch beschrieben werden. Eine diskrete Beschreibung ist bei Reaktions-Diffusions Systemen oft wünschenswert, da chemische Reaktionen und Diffusionen stochastische Prozesse darstellen, in dem Sinn, dass man nicht vorhersagen kann, wo und wann das nächste Ereignis stattfinden wird. Die stochastische Beschreibung soll an einem Beispiel erläutert werden; ich betrachte dazu folgendes Reaktions-System:



Bei der stochastische Beschreibung ist der Systemzustand zu jedem Zeitpunkt  $t$  durch Angabe der Molekülzahlen aller Spezies bestimmt und ändert sich diskret, falls eine Reaktion oder ein Diffusionsprozess stattfindet. Der Systemzustand  $S = (\#A, \#B, \#C, \#D, \#E)$  geht z.B. durch Ausführung einer Reaktion von Typ 3.1 in den Systemzustand  $S' = (\#A - 1, \#B - 1, \#C + 1, \#D, \#E)$  über<sup>13</sup>. Um die Wahrscheinlichkeiten aller möglichen Zustandsänderung anzugeben, müsste man nun alle Moleküle der Spezies  $A(A_1, A_2, \dots, A_{\#A})$ , der Spezies  $B(B_1, B_2, \dots, B_{\#B})$  sowie der beiden Spezies  $C$  und

---

<sup>13</sup># bedeutet: Anzahl an.

$D$  markieren. Es gibt dann  $\#A \cdot \#B$  verschiedene Realisierungen der Reaktion 3.1 und  $\#C \cdot \#D$  verschiedene Realisierungen der Reaktion 3.2. Betrachtet man jedoch homogene Systeme innerhalb derer die Position der einzelnen Moleküle keine Rolle spielt, so kann man die Reaktionen nach Molekülen zu einer **einzigen** Reaktion gruppieren bzw. zusammenfassen und erhält so für die Wahrscheinlichkeit der Zustandsänderung von  $S \rightarrow S'$ :

$$P(S', t + dt | S, t) = k_1 \cdot (\#A) \cdot (\#B) dt + O(dt^2). \quad (3.3)$$

Dies ist die bedingte Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich das System zum Zeitpunkt  $t + dt$  im Zustand  $S'$  befindet, wenn es zum Zeitpunkt  $t$  im Zustand  $S$  war. Diese Übergangswahrscheinlichkeit hängt nur vom aktuellen Zustand ab, es handelt sich also um einen Markov-Prozess. In der stochastischen Formulierung schreibt man mit Hilfe der Übergangswahrscheinlichkeiten pro Zeiteinheit  $W(S_j | S_i)$ , die man aus Gleichung 3.3 gewinnt, die sogenannte Master-Gleichung auf:

$$\frac{\partial P(S_i, t)}{\partial t} = \sum_{S_j \neq S_i} [W(S_i | S_j)P(S_j, t) - W(S_j | S_i)P(S_i, t)] \quad (3.4)$$

mit  $W(S_j | S_i) = P(S_j, t_j | S_i, t_i) / (t_j - t_i) \geq 0$  und  $t_j \geq t_i$ . Die Master-Gleichung, eine Art Bilanzgleichung, beschreibt die zeitliche Entwicklung des Systems als ein gekoppeltes Differentialgleichungssystem, das Wahrscheinlichkeiten als Variablen besitzt. Für lineare Systeme mit sehr wenigen Zuständen kann man dieses Gleichungssystem vollständig aufschreiben und lösen. Für komplexe Reaktions-Diffusions Systeme ist dies jedoch nicht praktikabel. Zur Erläuterung betrachtet man als Beispiel ein System, bei dem sich  $M$  verschiedene Spezies in einem in  $N$  Teilvolumina aufgeteilten dreidimensionalen Volumen  $V$  befinden, die an  $R$  verschiedenen Reaktionen teilnehmen können. In 3D besitzt jedes dieser Teilvolumina sechs nächste Nachbarvolumina, so dass zu jedem Zeitpunkt  $N(6M + R)$  elementare Reaktionen den Systemzustand verändern können. Bei der realistischen Beschreibung biologischer Systeme überschreitet der Wert für  $N$  meist  $10^5$ , so dass eine Simulation solcher Systeme selbst mit sehr schnellen Rechnern indiskutabel wird. Des Weiteren skaliert die Anzahl an Systemzuständen in einer Reaktions-Diffusions Master-Gleichungs-Formulierung exponentiell mit der Anzahl  $N$  der Teilvolumina [118]. Ein alternativer Ansatz zur stochastischen Beschreibung von Reaktions-Diffusions Systemen stellen Monte-Carlo-Algorithmen dar (Einführung in Monte-Carlo-Simulationen, siehe [122]). Bei dem Ansatz der Master-Gleichung versucht man das komplette Gleichungssystem für alle möglichen Trajektorien simultan zu lösen.

Im Gegensatz dazu besteht die Kernidee der Monte-Carlo-Methode darin, Reaktionen und Zeiten nach der korrekten Wahrscheinlichkeitsverteilung auszuwählen, so dass die Trajektorien genau mit der gleichen Wahrscheinlichkeit generiert werden, wie dies im Fall der Master-Gleichung auch geschieht. Hat man einen exakten Monte-Carlo-Algorithmus entwickelt, in dem Sinne exakt, dass der Algorithmus die Trajektorien nach der richtigen Wahrscheinlichkeitsverteilung sampelt / generiert, so erhält man Werte für die physikalischen Observablen aus der Statistik. Man erzeugt sehr viele unabhängige Trajektorien und mittelt dann über diese, um die entsprechenden Parameterwerte zu erhalten. Zwei solcher exakten Monte-Carlo-Algorithmen für chemische Reaktionssysteme

me wurden 1976 von Daniel Gillespie vorgeschlagen [119]. Im Folgenden sollen beide äquivalenten Verfahren sowie darauf aufbauende algorithmische Verbesserungen vorgestellt werden.

### 3.3 Gillespie-Algorithmus

Daniel Gillespie entwickelte 1976 [119] einen Algorithmus, der sich zur exakten stochastischen Beschreibung von chemischen Systemen eignet. Dieser Algorithmus stellt eine Monte-Carlo Methode dar, bei der Markov-Prozesse gesampelt werden, die die Wahrscheinlichkeitsverteilung der zugrunde liegenden chemischen Master-Gleichung eindeutig wiedergeben, ohne die Master-Gleichung explizit zu benutzen. Der Algorithmus kann als exakt im mathematischen Sinne bezeichnet werden, da er in keiner Form Gebrauch von Approximationen macht. Lediglich bei der Verwendung von computergenerierten Zufallszahlen, die in dem Monte-Carlo Schritt des Algorithmus verwendet werden, kann es zu kleinen Ungenauigkeiten kommen. Im Folgenden werde ich den Algorithmus sowie die wichtigsten mathematischen Schritte vorstellen und mich dabei an Gillespies Notation orientieren [119, 120]. Betrachtet wird stets ein System, welches aus  $N$  verschiedenen Spezies  $S_i$  besteht. Die Spezies sind homogen im Volumen  $V$  verteilt, und ihre Teilchen- oder Molekülanzahl ist gegeben durch die Variablen  $X_i$ ,  $i = 1, \dots, N$ . Die Moleküle können an  $M$  verschiedenen Reaktionen  $R_\mu$  ( $\mu = 1, \dots, M$ ) teilnehmen, die durch die Reaktionsparameter  $c_\mu$  charakterisiert werden (siehe Beispielreaktionen, Gl. 3.5-3.8). Beispielreaktionen für  $N=2$  und  $M=4$ :



Reaktionen vom Typ 3.5 beschreiben spontane Teilchenkreationen bzw. externe Teilchen-Quellen, wohingegen bei Reaktionen vom Typ 3.6 ein Teilchen einer einzigen Spezies, bei Reaktionen vom Typ 3.7 jeweils ein Teilchen zweier unterschiedlicher Spezies und bei Reaktionen vom Typ 3.8 zwei Teilchen der gleichen Spezies umgewandelt werden. Die Produkte obiger Beispielreaktionen sind offen gelassen und können ein einziges oder auch mehrere Teilchen einer bzw. unterschiedlicher Spezies sein.

Um die zeitliche Entwicklung solcher Reaktions-Systeme, also die zeitliche Entwicklung der Systemvariablen  $\{X_i\}$ , bei Kenntnis der Anfangswerte  $\{X_i^0\}$  sowie Kenntnis aller Reaktionsparameter  $\{c_\mu\}$  zu simulieren, entwickelte Gillespie den nach ihm benannten Algorithmus. Zu jedem Zeitpunkt befindet sich das System genau in einem Zustand, der durch die zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Teilchenzahlen  $X_i$  der verschiedenen Spezies gegeben ist. Übergänge zwischen Systemzuständen erfolgen durch Ausführung von Reaktionen, so dass es  $M$  mögliche Übergänge gibt. Die Übergangswahrscheinlichkeiten

hängen immer nur vom aktuellen Systemzustand ab, was das Merkmal von Markov-Prozessen ist. Die Schwierigkeit ist es nun, im sogenannten Monte-Carlo Schritt die computergenerierten Zufallszahlen nach der korrekten Wahrscheinlichkeitsverteilung zu erzeugen und diese dann zur Auswahl der Systemübergänge zu verwenden. Gillespie entwickelte zwei äquivalente Methoden, die genau diese Kriterien erfüllen: die „Direct Method“ und die „First Reaction Method“.

Den Ausgangspunkt zur Herleitung des Gillespie-Algorithmus [119] bildet die fundamentale Hypothese der chemischen Kinetik, nämlich dass die Reaktionsparameter  $c_\mu$  wie folgt definiert werden können:

$$c_\mu \delta\tau \equiv \text{durchschnittliche Wahrscheinlichkeit, dass eine zufällige Kombi-} \quad (3.9)$$

nation von Reaktanten der Reaktion  $R_\mu$  im  
nächsten Zeitintervall  $\delta\tau$  reagieren wird.

Ausgehend von dieser Hypothese leitet Gillespie [119] die „Reaction Probability Density Function“ (Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion der Reaktion)  $P(\mu, \tau)$  her.

$$P(\mu, \tau)d\tau \equiv \text{Wahrscheinlichkeit, dass zum Zeitpunkt } t \text{ die nächste} \quad (3.10)$$

Reaktion im Volumen  $V$  im Zeitintervall  $(t + \tau, t + \tau + d\tau)$   
passieren wird und vom Reaktionstyp  $R_\mu$  ist.

$$(3.11)$$

Sie wird anstelle der sonst bei stochastischen Beschreibungen üblichen Wahrscheinlichkeitsfunktion  $\mathbb{P}(X_1, \dots, X_N, t)$  verwendet, um die zeitliche Entwicklung des Systems zu simulieren. Um einen analytischen Ausdruck für  $P(\mu, \tau)$  zu erhalten, definiert man zunächst die  $M$  reaktionsspezifischen Zustandsvariablen  $h_1, h_2, \dots, h_M$  als

$$h_\mu \equiv \text{Anzahl verschiedener Reaktanten-Kombinationen der Reaktion } R_\mu \quad (3.12)$$

zur Zeit  $t$  im Volumen  $V$ .

Unter Ausnutzung des Additionstheorems für unabhängige Wahrscheinlichkeiten und der Hypothese 3.9 erhält man:

$$h_\mu c_\mu \delta\tau \equiv \text{Wahrscheinlichkeit, dass eine Reaktion vom Typ } R_\mu \quad (3.13)$$

im Volumen  $V$  im nächsten Zeitintervall  $\delta\tau$  stattfinden wird.

Der Parameter  $h_\mu$  hängt von den aktuellen Teilchenzahlen  $X_i$  der an der Reaktion  $R_\mu$  beteiligten Spezies ab und ergibt sich für die Beispielreaktionen (Gl. 3.5-3.8) zu:

$h_\mu = 1$	für eine Reaktion vom Typ (3.5).
$h_\mu = X_j$	für eine Reaktion vom Typ (3.6).
$h_\mu = X_j \cdot X_k$	für eine Reaktion vom Typ (3.7).
$h_\mu = X_j \cdot (X_j - 1)/2$	für eine Reaktion vom Typ (3.8).

Des Weiteren kann die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion (Gl. 3.10) weiter umgeformt werden, indem man die gerade gewonnene Wahrscheinlichkeit  $h_\mu c_\mu \delta\tau$  mit der Wahrscheinlichkeit  $P_0(\tau)$  multipliziert:

$$P(\mu, \tau)d\tau = P_0(\tau) \cdot h_\mu c_\mu \delta\tau, \quad (3.14)$$

wobei  $P_0(\tau)$  die Wahrscheinlichkeit ist, dass zur Zeit  $t$  keine Reaktion im Zeitintervall  $(t; t + \tau)$  passiert. Nun muss noch ein von den Systemvariablen abhängender Ausdruck für  $P_0(\tau)$  gefunden werden. Dazu unterteilt man das Intervall  $[t, t + \tau]$  in  $K$  Teilintervalle der Länge  $\epsilon = \tau/K$ . Unter Ausnutzung des Multiplikationstheorems für unabhängige Wahrscheinlichkeiten und Gleichung 3.13 lässt sich die Wahrscheinlichkeit dafür, dass im ersten  $\epsilon$ -Intervall  $[t, t + \epsilon]$  keine der  $R_1, R_2, \dots, R_M$  Reaktionen stattfinden als

$$\prod_{\nu=1}^M [1 - h_\nu c_\nu \epsilon + o(\epsilon)] = 1 - \sum_{\nu=1}^M [h_\nu c_\nu \epsilon + o(\epsilon)] \quad (3.15)$$

schreiben. Dies ist aber gleich der Wahrscheinlichkeit, dass im Intervall  $[t + \epsilon, t + 2\epsilon]$  und im Intervall  $[t + 2\epsilon, t + 3\epsilon]$  usw. keine Reaktion stattfindet. Insgesamt gibt es  $K$  solcher Teilintervalle und somit kann  $P_0(\tau)$  umgeschrieben werden zu:

$$\begin{aligned} P_0(\tau) &= \left[ 1 - \sum_{\nu=1}^M [h_\nu c_\nu \epsilon + o(\epsilon)] \right]^K \\ &= \left[ 1 - \sum_{\nu=1}^M [h_\nu c_\nu \tau / K + o(K^{-1})] \right]^K. \end{aligned} \quad (3.16)$$

Bildet man nun den Limes unendlich kleiner Teilintervalle ( $K \rightarrow \infty$ ) und nutzt die Reihendarstellung der Exponentialfunktion aus, so erhält man

$$P_0(\tau) = \exp \left( - \sum_{\nu=1}^M h_\nu c_\nu \tau \right) \quad (3.17)$$

als Ausdruck für  $P_0(\tau)$  und schließlich durch einsetzen von Gl. 3.17 in den Ausdruck 3.14 die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion:

$$P(\tau, \mu) = h_\mu c_\mu \exp \left( - \sum_{\nu=1}^M h_\nu c_\nu \tau \right). \quad (3.18)$$

Mit diesem Ausdruck lässt sich die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion  $P(\mu, \tau)$  für alle Werte  $0 \leq \tau \leq \infty$  und  $1 \leq \mu \leq M$  berechnen. Hierbei ist  $\tau$  kontinuierlich und  $\mu$  nimmt nur ganzzahlige Werte (Integer) an.

Der Algorithmus, mit dessen Hilfe das durch  $P(\tau, \mu)$  beschriebene System simuliert werden kann, lässt sich folgendermaßen zusammenfassen [119]:

- (0) Initialisierung. Setze die Zeit  $t = 0$  und initialisiere alle  $N$  Variablen  $X_i$  mit der Anzahl der jeweiligen Molekülspezies  $S_i$  sowie alle  $M$  Reaktionsparameter  $c_\mu$  der Reaktionen  $R_\mu$ . Lege eine Endzeit  $t_{stop}$  fest.

- (1) **Monte-Carlo Schritt.** Erzeuge ein Paar von Zufallszahlen  $(\mu, \tau)$  die der vorgegebenen Verteilung  $P(\tau, \mu)$  genügen.
- (2) Iteration. Ersetze die Systemzeit  $t$  mit Hilfe der in Schritt 1 generierten Zufallszahl  $\tau$ , durch  $t = t + \tau$  und führe Reaktion  $R_\mu$  aus, indem alle Werte von Molekülen  $X_i$  geändert werden, die an einer Reaktion vom Typ  $\mu$  beteiligt sind. Berechne erneut die Reaktionsparameter  $h_\nu$  für alle Reaktionen  $R_\nu$  an denen Moleküle beteiligt sind, deren Anzahl durch Ausführung der Reaktion  $R_\mu$  verändert wurde.
- (3) Ausgabe der aktuellen Systempopulation  $X_1, X_2, \dots, X_N$ . Falls  $t > t_{stop}$  ist oder keine Reaktanten mehr zur Verfügung stehen (alle  $c_\mu = 0$ ) beende die Berechnung. Andernfalls führe erneut Schritt 1 aus.

Je nach Wahl des **Monte-Carlo Schritts (1)** unterscheidet Gillespie zwei Arten seines Algorithmus: die „Direct Method“ (direkte Methode) und die „First Reaction Method“ (Methode der ersten Reaktion).

### 3.3.1 „Direct Method“

Die erste der beiden von Gillespie vorgeschlagenen Implementierungen des Monte-Carlo Schrittes (1) ist die sogenannte Gillespies „Direct Method“. Bei ihrer Umsetzung werden zwei Fragen an das betrachtete System gestellt. Welcher Reaktionstyp  $\mu$  findet als nächstes statt, und zu welchem Zeitpunkt  $\tau$  läuft diese Reaktion ab? Ausgehend von der Formel für die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion  $P(\tau, \mu)$  aus Gleichung 3.18, die meist noch zu

$$P(\tau, \mu) = a_\mu \exp\left(-\tau \sum_{\nu=1}^M a_\nu\right) \quad \text{mit } a_x = h_x c_x \quad (3.19)$$

umgeschrieben wird, können diese beiden Fragen direkt beantwortet werden. Integriert man  $P(\tau, \mu)$  über alle Zeiten  $\tau$  von 0 bis  $\infty$ , so erhält man die Wahrscheinlichkeit, dass eine Reaktion vom Typ  $\mu$  stattfindet zu:

$$P(\text{Reaktionstyp} = \mu) = a_\mu / \sum_{\nu=1}^M a_\nu, \quad \mu = 1, 2, \dots, M. \quad (3.20)$$

Des Weiteren erhält man die Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Zeiten  $\tau$  aus Summation von  $P(\tau, \mu)$  über alle möglichen  $\mu$  zu:

$$P(\tau)d\tau = \left(\sum_{\nu=1}^M a_\nu\right) \exp\left(-\tau \sum_{\nu=1}^M a_\nu\right) d\tau, \quad 0 \leq \tau < \infty. \quad (3.21)$$

Die Idee der „Direct Method“ ist es nun, ein Tupel  $(\tau, \mu)$  zu konstruieren, welches der Verteilung  $P(\tau, \mu)$  genügt. Zunächst wird ein zufälliger Wert für  $\tau$  generiert, welcher der Verteilung aus Gleichung 3.21 genügt, und danach wird gemäß der Verteilung aus

Gleichung 3.20 ein zufälliger Integer erzeugt. In der Praxis werden hierzu zwei Zufallszahlen  $r_1$  und  $r_2$  erzeugt, die auf dem Intervall  $[0, 1]$  gleichverteilt sind. Mit Hilfe der Inversionsmethode (siehe z.B. [123]), einem Simulationsverfahren, um aus gleichverteilten Zufallszahlen andere Wahrscheinlichkeitsverteilungen zu erzeugen, kann man mittels der beiden Zufallszahlen  $r_1$  und  $r_2$  den Zeitpunkt und den Typ der zuerst ablaufenden Reaktion bestimmen. Es kann gezeigt werden [119], dass man zur Bestimmung von  $\tau$  den Ausdruck

$$\tau = (1/a)\ln(1/r_1) \quad (3.22)$$

erhält und sich der Reaktionstyps  $\mu$  als ganzzahligen Wert (Integer) ergibt, für den gilt:

$$\sum_{\nu=1}^{\mu-1} a_\nu < r_2 a \leq \sum_{\nu=1}^{\mu} a_\nu, \quad (3.23)$$

mit  $a = \sum_{\mu=1}^M h_\mu c_\mu$  und  $a_\nu = h_\nu c_\nu$ .

### 3.3.2 „First Reaction Method“

Eine alternative Umsetzung des Monte-Carlo Schrittes (1) ist die sogenannte „First Reaction Method“. Die Idee der „First Reaction Method“ besteht darin, für alle möglichen Reaktionstypen  $R_\nu$  ( $\nu = 1, 2, \dots, M$ ) eine Probe-Zeit zu bestimmen, nach der sie bei aktuellem Systemzustand eintreten sollten. Dazu generiert man ausgehend von der Wahrscheinlichkeit

$$\begin{aligned} P_\nu(\tau)d\tau &= a_\nu \exp(-a_\nu\tau) d\tau \\ &= \text{Wahrscheinlichkeit zur Zeit } t, \text{ dass im Intervall } [t + \tau, t + \tau + d\tau] \\ &\quad \text{eine } R_\nu \text{ Reaktion abläuft} \end{aligned} \quad (3.24)$$

$M$  auf dem Einheitsintervall gleichverteilte Zufallszahlen  $r_\nu$  und berechnet die verschiedenen Reaktionszeiten gemäß der Formel (Ausnutzen der Inversionsmethode, analog zur Direct Method):

$$\tau = (1/a_\nu)\ln(1/r_\nu), \quad (3.25)$$

mit  $a_\nu = h_\nu c_\nu$ . Aus diesen Probe-Zeiten bestimmt sich nun der Zeitpunkt und der Typ der als nächstes stattfindenden Reaktion. Dazu wird angenommen, dass die Reaktion mit kleinster Probezeit  $\tau_\nu$  als erstes („first“) ablaufen wird, man setzt also:

$$\begin{aligned} \tau &= \text{kleinstes } \tau_\nu \text{ für alle } \nu = 1, 2, \dots, M; \\ \mu &= \nu \text{ für welches } \tau_\nu \text{ am kleinsten ist.} \end{aligned} \quad (3.26)$$

Die bereits ausgewürfelten Probe-Zeiten  $\tau_\nu$  können jedoch nicht dazu benutzt werden nun der Reihe nach die Reaktionen der Größe der Probezeiten nach auszuführen. Also kann nicht als zweites eine Reaktion des Typs  $\mu$  anhand der zweitkleinsten Probezeit  $\tau_\nu$  durchgeführt, dann die Reaktion die zu der drittkleinsten Probezeit  $\tau_\nu$  passt usw. durchgeführt

werden. Denn nach Ausführung der ersten / einer Reaktion werden die Molekülzahlen aller an der Reaktion beteiligten Spezies geändert. Dies hat zur Folge, dass sich die  $h_\nu$  und somit die  $a_\nu$  ändern und deshalb konsequenterweise nach jedem Reaktionsereignis alle Probezeiten  $\tau_\nu$  neu ausgewürfelt werden müssen.

### 3.3.3 Fazit

Ein Vergleich der „Direct Method“ und der „First Reaction Method“ zeigt, dass beide die richtige Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion aus Gleichung 3.11 generieren [119]. Allerdings haben beide Methoden sehr unterschiedliche Intensionen sowie Laufzeiten. Die „Direct Method“ benötigt in jedem Iterationsschritt genau zwei Zufallszahlen, wobei die „First Reaction Method“ jeweils  $M$  (Anzahl an Reaktionen) Zufallszahlen benötigt. Dies bedeutet, dass die „Direct Method“ ohne eine Verbesserung oder Anpassung an das konkrete Problem, für Systeme mit drei oder mehr möglichen Reaktionen immer Performancevorteile gegenüber der „First Reaction Method“ besitzt.

Ein großer Nachteile des von Gillespie vorgeschlagenen Algorithmus ist, dass er nur bei räumlich homogenen Systemen / Mischungen verwendet werden kann. Denn die mathematischen Herleitungen besitzen nur Gültigkeit, wenn man eine homogene Reaktions-Master-Gleichung zugrundelegt. Der Gillespie-Algorithmus kann also ohne Erweiterungen nicht benutzt werden, wenn eine räumliche Auflösung innerhalb der Simulationsgeometrie verlangt ist. Außerdem werden im ursprünglichen Gillespie-Algorithmus keine Diffusionsprozesse betrachtet und die Computerperformance des Algorithmus wird sehr schlecht, wenn große Systeme mit vielen Teilchen und vielen möglichen Reaktionen betrachtet werden.

Da gerade im Falle von biologischen Systemen die räumliche Auflösung der ablaufenden Prozesse sowie die Diffusion der beteiligten Spezies sehr wichtig ist, und die biologischen Reaktions-Diffusion Systeme bezogen auf die auftretenden Teilchenzahlen meist sehr groß sind, müssen Verbesserungen bzw. Erweiterungen des Gillespie-Algorithmus entwickelt werden. Bei diesen Erweiterungen ist es jedoch wichtig, dass die zeitliche Entwicklung des Systems weiterhin durch Markov-Prozesse ausgewürfelt wird, die der Master-Gleichung genügen.

Zunächst entwickelten Gibson und Bruck [121] die „Next Reaction Method“, die sich hauptsächlich durch eine Verkürzung der Computerrechenzeit auszeichnet und sich dadurch zur Simulation größerer Systeme eignet. Darauf aufbauend stellten Elf und Ehrenberg [118] die „Next Subvolume Method“ vor, die neben einer räumliche Auflösung und Integration von Diffusionsprozessen die Anwendung auf dreidimensionale nicht notwendigerweise homogene Gesamtvolumina ermöglicht.

### 3.4 Gibson und Brucks „Next Reaction Method“

Beide von Gillespie entwickelten Methoden [119], sowohl die „First Reaction Method“ als auch die „Direct Method“, benötigen für große Systeme sehr lange Computerrechenzeiten. Deshalb entwickelten Gibson und Bruck [121] auf Basis der „First Reaction Method“ die sogenannte „Next Reaction Method“ (NRM). Hauptintention von Gibson und Bruck bei der Formulierung der NRM war es, einen exakten, stochastischen Algorithmus zu präsentieren, der eine erhebliche Verbesserung der Laufzeit  $\mathbb{L}$  gegenüber dem Gillespie-Algorithmus aufweist. Um dies zu erreichen, mussten die drei in der innersten Iterationsschleife ablaufenden Schritte der „First Reaction Method“ verbessert werden, da diese Rechenzeiten benötigen, welche proportional zu der Anzahl  $M$  an möglichen Reaktionen sind (vgl. Abschnitt 3.3.2):

1. Berechne (update) alle  $a_i$  mit  $i \in [1, \dots, M]$ .
2. Berechne für alle  $M$  Reaktionen die Probezeiten  $\tau_i$ .
3. Identifiziere („suche“) die kleinste Probezeit.

Die Computerrechenzeit dieser drei Iterationsschritte konnte von Gibson und Bruck erheblich reduziert werden. Im Wesentlichen erreichten sie dies durch eine geschickte Wahl von Datentypen und einer zusätzlichen Speicherung von Variablen. Bei der Größe der heutzutage zur Verfügung stehenden Computerspeicher (RAM) ist es absolut sinnvoll einige Variablen ( $\sim 10^3$ – $10^4$  Fließkommazahlen) mehr zu speichern, wenn dadurch ein Performancegewinn bezüglich der Rechenzeit zu erwarten ist. Die beiden Datenstrukturen, die von Gibson und Bruck verwendet wurden um die Laufzeit des Gillespie-Algorithmus zu verbessern, sind zum einen die sogenannte Prioritätsliste (in der Informatik: „indexed priority queue“) und zum anderen der „Dependency Graph“ (Abhängigkeitsgraph). Die beiden Datenstrukturen sind in Abbildung 3.1 dargestellt und sollen im Folgenden kurz erläutert werden. Die Datenstruktur der Prioritätsliste ist ein binärer Baum, in dem die Elemente ihrer Wichtigkeit / Priorität nach eingeordnet sind und ihre Position innerhalb des Binärbaums mit einem Index markiert ist. Im Beispiel der NRM sind die Elemente der Prioritätsliste der Probezeit nach sortiert, wobei die Reaktionen mit kleinster Probezeit ganz oben im Baum stehen. Durch die Verknüpfung mit einem zusätzlichen Index weiß man sogleich, an welcher Position die Probezeiten stehen, die im jeweiligen Iterationsschritt geupdatet werden müssen. Außerdem ist die Neusortierung eines solchen Binärbaums extrem effizient (Laufzeit  $O(\log(n))$ ,  $n$  die Höhe des Baums). In dem Abhängigkeitsgraphen wird für alle  $M$  Reaktionstypen abgespeichert welche Reaktionsparameter  $a_i$  geupdatet werden müssen, falls eine bestimmte Reaktion stattgefunden hat und sich dadurch Molekülzahlen verändert haben. Der Abhängigkeitsgraph dient somit der Neuberechnung der Reaktionsparameter mit minimalem Rechenaufwand. Insgesamt ergeben sich folgende Verbesserung bzw. Veränderungen, die zu einer Laufzeitverkürzung gegenüber der „First Reaction Method“ führen [121]:

- a) Speichere alle  $\tau_i$ , nicht nur  $a_i$ .
- b) Führe nicht generell eine erneute Berechnung der  $a_i$  (und  $\tau_i$ ) durch. Berechne nur die  $a_i$ , die sich durch das Stattfinden einer Reaktion geändert haben. Um diese  $a_i$  schnellstmöglich finden zu können, wird ein „Dependency Graph“ benutzt. In ihm wird gespeichert, welche Reaktion von welchen Reaktanten abhängt, also welche  $a_i$ , geändert werden müssen, falls sich die Anzahl bestimmter Moleküle geändert hat.
- c) Wechsle von relativer Zeit (Zeit zwischen Reaktionen) zu absoluter Zeit.
- d) Benutze zur Speicherung der  $a_i$  und  $\tau_i$  eine Prioritätsliste, in der die Reaktionen mit geringster Probezeit  $\tau_i$  immer an oberster Stelle zu finden ist.

Die Punkte a)-c) dienen der Optimierung der Iterationsschritte 1 und 2. Zu Beginn der Simulation müssen einmalig alle  $M$  Probezeiten berechnet werden, die dann aber in einer zusätzlichen Computervariablen abgespeichert werden. Nach Ausführung einer Reaktion

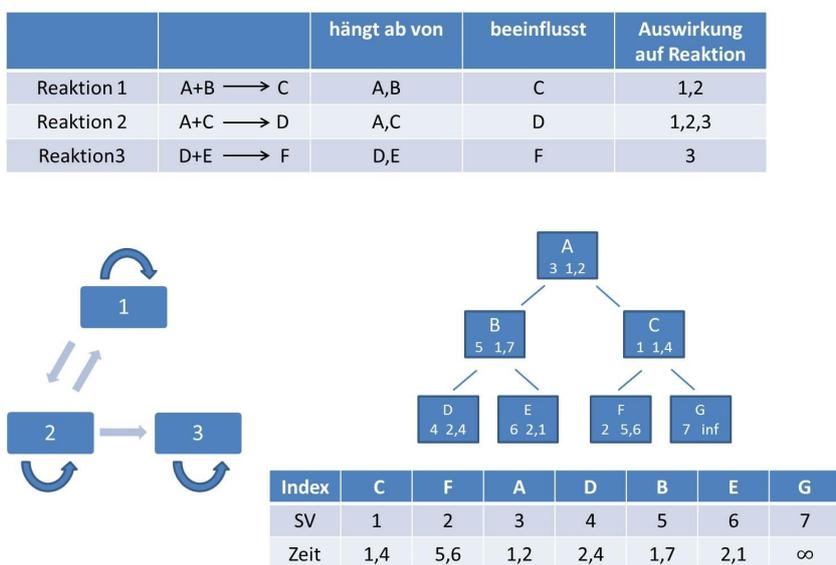


Abbildung 3.1: Datenstruktur der Prioritätsliste und des Abhängigkeitsgraphen. Oben sind Beispiel-Reaktionen aufgeführt, die verdeutlichen sollen, wie der Abhängigkeitsgraph aufgebaut wird. Dieser ist unten links zu sehen. Unten rechts ist ein Binärbaum, die sogenannte Prioritätsliste, dargestellt. Ihre Einträge sind absteigend mit großen Buchstaben A, B, C usw. markiert. Unter den Buchstaben stehen rechts die Probezeiten (nach denen die Warteschlange sortiert ist) und links daneben der mit den Probezeiten verknüpfte Index. Unterhalb des Binärbaums ist noch einmal verdeutlicht, wie man durch Verwendung der Indizes sehr schnell und effizient die Position der mit dem jeweiligen Index verknüpften Probezeit innerhalb des Binärbaums findet.

und der damit verbundenen Änderung von Molekülzahlen werden nun nicht alle  $\tau_i$  und  $a_i$  neu berechnet. Vielmehr wird im Abhängigkeitsgraph überprüft, welche Reaktionen von den Molekülzahlen abhängen, die sich gerade geändert haben, und entsprechend werden nur diese  $a_j$  und die zugeordneten  $\tau_j$  geupdated. Durch den Übergang von relativer zu absoluter Zeit können alle nicht geänderten  $\tau_i$  weiterhin benutzt werden, indem man die neu berechneten  $\tau_j$  zu der aktuellen Systemzeit  $t$  addiert und die so gewonnene Probezeit  $\tau'_j = \tau_j + t$  in die Prioritätsliste einsortiert (für den Beweis, siehe [121]). Berücksichtigt man all diese Optimierungen, so ergibt sich insgesamt folgender Algorithmus für die NRM, eine verbesserte Version von Gillespies „First Reaction“ Method:

Algorithmus („Next Reaction Method“) [121]

### I. Initialisierung

1. Initialisiere die Molekülanzahl für alle Spezies, setze  $t = 0$  und erstelle den Abhängigkeitsgraphen.
2. Berechne alle  $a_i$ .
3. Berechne alle Probezeiten  $\tau_i$ .
4. Speichere alle Probezeiten  $\tau_i$  in einer Index-Warteschlange  $\mathbb{P}$ .

### II. Iteration

5. Wähle  $\mu$  als die Reaktion, für die die Zeit  $\tau_\mu$  als oberstes in  $\mathbb{P}$  steht.
6. Setze  $\tau$  als  $\tau_\mu$ .
7. Ändere die Anzahl der Moleküle, die an der Reaktion  $\mu$  beteiligt sind, und setze  $t = \tau$ .
8. Gehe den Abhängigkeitsgraphen durch und update alle  $a_i$ 's und  $\tau_\mu$  in  $\mathbb{P}$ .
9. Gehe zu Schritt II.

Dieser verbesserte Algorithmus besitzt eine geringere Laufzeit als Gillespies Version, wobei der Performance-Gewinn umso größer ist, je größer das System (bzw. die Anzahl an ablaufenden Reaktionen) ist. Der erste Schritt I dieses Algorithmus wird nur zu Beginn einer Simulation ein einziges Mal durchgeführt. Die Schritte 5-9 werden in jedem Simulations- / Iterationsschritt wiederholt. Allerdings hängen die Punkte 6, 7 und 9 nicht von der Anzahl der Reaktionen  $M$  ab. Auch Schritt 5 wird nur ein einziges Mal pro Iteration ausgeführt, was durch die geschickte Datenstruktur der Prioritätenwarteschlange erreicht wird (in Gillespies ursprünglicher Version war dieser Vorgang von der Ordnung  $O(M)$ ). Schritt 8, in dem die  $a_i$ 's erneuert werden, muss  $k$  mal wiederholt werden, wobei  $k$  die Anzahl der Abhängigkeiten der jeweils ausgeführten Reaktion ist. Dabei ist auch dieser Schritt schon von minimalem Aufwand, da der Abhängigkeitsgraph direkt alle  $k$  Reaktionstypen  $\mu$  liefert, deren Reaktionsparameter neu berechnet werden müssen. Normalerweise ist  $k < M$  oder sogar  $k \ll M$ . Insgesamt kann gezeigt werden, dass dieser Algorithmus bezüglich der Anzahl an Operationen

von der Ordnung  $O(\log(M))$  ist [121].

Die Next Reaction Method lässt durch geschickte Ausnutzung von Informatik-spezifischen Algorithmus-Verbesserungen bereits die Berechnung bzw. Simulation weitaus größerer Systeme zu, als dies mittels des naiven Gillespie-Algorithmus möglich gewesen wäre. Jedoch ist auch die NRM noch nicht dazu geeignet, Systeme zu simulieren, bei denen eine räumliche Auflösung wichtig ist. Außerdem fehlt in Gibson und Brucks NRM eine Implementierung von Diffusionsprozessen, sowie eine Optimierung des Algorithmus auf komplexe und nicht homogene dreidimensionale Reaktions-Diffusions Systeme. Ein Algorithmus, der diese fehlenden Features beinhaltet, ist die sogenannte „Spatial Next Reaction“ oder „Next Subvolume Method“ [118], die im folgenden Abschnitt 3.5 erläutert wird.

### 3.5 Die „Next Subvolume Method“

Die „Next Subvolume Method“ (NSM) [118] ist ein Monte-Carlo Algorithmus, der Trajektorien von Markov-Prozessen der zugehörigen Reaktions-Diffusions Master-Gleichung samplet. Die NSM ist eine numerisch sehr effiziente Methode, die sich aus Kombination von Gillespies „Direct Method“ und der von Gibson und Bruck daraus abgeleiteten „Next Reaction Method“ ergibt. Kernidee dieses Algorithmus ist es, das Simulationsvolumen  $V$  in  $N$  kleine Subvolumina (SV) der Kantenlänge  $l$  und Volumen  $v = l^3$  zu unterteilen. Unabhängig von der Verkürzung der Computerrechenzeit bietet die Unterteilung des Simulationsvolumens weitere Vorteile. Zum einen erhält man durch Aufteilung in Subvolumina eine räumliche Information über das System, und zum anderen lassen sich nun sehr einfach Diffusionsprozesse als Teilchenübergänge zwischen benachbarten Subvolumina integrieren. Die Diffusion mit Diffusionskonstante  $D$  wird als Random Walk beschrieben, bei dem die Reaktanten zwischen benachbarten Subvolumina mit Rate  $D/l^2$  wechseln können. Außerdem ist man durch Aufteilung in Subvolumina in der Lage, Systeme zu simulieren, deren Moleküle nicht vollständig homogen über das gesamte Simulationsvolumen verteilt sind. Es muss lediglich gewährleistet sein, dass die Subvolumina so klein gewählt werden, dass die Verteilung der Moleküle in ihnen als homogen / gleichverteilt angenommen werden kann. Dies wird durch die Bedingung  $l^2 \ll 6D_{min} \cdot \tau_{min}$  gewährleistet [118], wobei  $D_{min}$  die kleinste Diffusionskonstante des betrachteten Systems und  $\tau_{min}$  die kürzeste Lebenszeit aller möglichen Molekül / Spezies-Komplexe darstellt.

Das algorithmische Detail, welches die NSM auszeichnet und eine Simulation großer dreidimensionaler Systeme unter vertretbarem Rechenaufwand gewährleistet, ist die Adaptierung der „Next Reaction Method“ auf die unterschiedlichen Subvolumina, woraus sich auch der Name „Next Subvolume Method“ ergibt. Den Platz der einzelnen Reaktionen, für die bei der NRM (siehe Abschnitt 3.4) die Probezeiten ausgewürfelt und dann der Größe nach in einer Index-Warteschlange sortiert und gespeichert wurden, übernehmen

bei der NSM die Subvolumina. Zu Beginn der Simulation wird einmalig für alle Subvolumina die Probezeit ausgewürfelt nach der eine mögliche Reaktion oder Diffusion in dem jeweiligen Subvolumen stattfindet. Diese Probezeiten der Subvolumina werden genau wie bei der NRM der Größe nach in einer Index-Warteschlange sortiert und abgespeichert. Danach wird das Subvolumen ausgewählt, welches die kleinste Probezeit besitzt. Innerhalb dieses Subvolumens wird dann Gillespies „Direct Method“ angewendet um auszuwürfeln, welche Reaktion oder Diffusion abläuft. Läuft eine Diffusion ab, so wird eine weitere Zufallszahl benötigt, um zu entscheiden in welches Nachbarvolumen die Spezies diffundiert; wobei z.B in 3D die Diffusion in eines der sechs und in 2D in eines der vier Nachbarvolumina als gleich wahrscheinlich angenommen wird. Im Unterschied zur NRM ändert sich bei Ausführung eines Diffusionsprozesses die Teilchenanzahl in zwei benachbarten Subvolumina, wie an folgendem Beispiel illustriert werden soll.

Spezies A diffundiert von Subvolumen  $SV_1$  ins Subvolumen  $SV_2$ :

$$\#(A) \rightarrow \#(A - 1) \quad \text{in } SV_1 \quad (3.27)$$

$$\#(A) \rightarrow \#(A + 1) \quad \text{in } SV_2. \quad (3.28)$$

Als Konsequenz müssen die Reaktions- sowie Diffusionsraten und somit die Probezeiten beider Subvolumina  $SV_1$  und  $SV_2$  neu berechnet und entsprechend in der Index-Warteschlange neu sortiert werden. Alle anderen algorithmusspezifischen Details unterscheiden sich nicht von den Umsetzungen im Gillespie-Algorithmus oder in Gibson und Brucks „Next Reaction Method“. Insgesamt ergibt sich die „Next Subvolume Method“ zu:

Algorithmus („Spatial Next Reaction“ - oder „Next Subvolume Method“ ) [118]

### I. Initialisierung

1. Verteile die verschiedenen Spezies in die Subvolumen und speichere den Zustand in einer Konfigurationsmatrix.
2. Berechne die Summe der Reaktionsraten  $r_k = \sum_{j=1}^M a_{jk}$  und speichere sie in einer Ratenmatrix.  $a_{jk}$  sind hierbei die Intensitäten der Reaktion  $j$  im Subvolumen  $k$ .
3. Berechne die Summe der Diffusionsraten  $s_i = n_i \sum_{j=1}^N d_j X_j^i$ , wobei  $d_j = D_j/l^2$  ist.  $D_j$  ist die Diffusionskonstante der Spezies  $j$  und  $d_j$  die Rate für Sprünge zwischen benachbarten Subvolumina.  $X_j^i$  ist die Anzahl an Molekülen der Spezies  $j$  ( $j = 1, \dots, N$ ) im Subvolumen  $i$  und  $n_i$  ist die Anzahl an Richtungen, in die die Moleküle diffundieren können.
4. Für jedes Subvolumen:
  - a. Berechne die Summe  $r_i + s_i$ .

- b. Erzeuge eine auf dem Einheitsintervall gleichverteilte Zufallszahl  $ran$ .
- c. Berechne die früheste Zeit eines Ereignisses gemäß der Vorschrift:  
$$\tau_i = -\ln(ran)/(r_i + s_i).$$
5. Ordne die Subvolumina in einer Prioritätenwarteschlange so an, dass das Subvolumen mit kleinster Zeit  $\tau_i$  als oberstes steht und alle weiteren Einträge der Liste nach aufsteigenden Werten  $\tau$  geordnet sind.

## II. Iteration

6. Wähle als Subvolumen, in dem das nächste Ereignis stattfinden soll, das Volumen  $\lambda$ , dessen Zeit  $\tau_\lambda$  als oberstes in der Warteschlange steht und setze  $t = \tau_\lambda$ . Erzeuge erneut eine Zufallszahl  $ran_2$  und führe eine Reaktion aus, falls  $ran_2 < r_\lambda/(r_\lambda + s_\lambda)$  ist, andernfalls eine Diffusion.
7. Reaktions-Ereignis:
  - a. Benutze eine Zufallszahl, um nach Gillespies direkter Methode zu bestimmen, welche Reaktion abläuft.
  - b. Erneuere den Zustand des Subvolumens  $\lambda$ , so dass die Ausführung der ausgewählten Reaktion widerspiegelt wird.
  - c. Berechne erneut die Summe  $r_\lambda + s_\lambda$  und erzeuge eine neue Zufallszahl, um die nun vorhandene Zeit des nächsten Ereignisses  $\tau_\lambda = -\ln(ran)/(r_\lambda + s_\lambda) + t$  zu berechnen.
  - d. Füge das abgeänderte  $\tau_\lambda$  in die Warteschlange ein und sortiere diese neu.
8. Diffusions-Ereignis:
  - a. Benutze eine Zufallszahl, um zu bestimmen, welcher Spezies das diffundierende Molekül angehört.
  - b. Wähle zufällig eine mögliche Richtung aus und lasse ein Molekül der zuvor bestimmten Spezies in das dortige Nachbarvolumen diffundieren.
  - c. Erneuere den Zustand des Subvolumens  $\lambda$  und seines Nachbarvolumens  $\gamma$ , so dass die Ausführung der Diffusion widerspiegelt wird.
  - d. Berechne erneut die Summe  $r_\lambda + s_\lambda$  und  $r_\gamma + s_\gamma$ . Berechne wie in 7.c für beide Subvolumina die neuen Zeiten  $\tau$ .
  - e. Füge die abgeänderten  $\tau_\lambda$  und  $\tau_\gamma$  in die Warteschlange ein und sortiere diese neu.
9. Gehe zu 6. zurück bis eine Zeit  $t > t_{ende}$  erreicht ist.

Die Laufzeit der „Next Subvolume Method“ hängt maßgeblich von der Anzahl der Subvolumina ab. Dies ist zum einen darin begründet, dass bei der „Next Subvolume Method“ die „Next Reaction Methode“ auf die Subvolumina angewendet wird. Dadurch werden die Größe und Sortierung der Index-Warteschlange nicht mehr durch die Anzahl der

möglichen Reaktionen, wie dies bei Gibson und Brucks „Next Reaction Method“ war, bestimmt, sondern durch die Anzahl der Subvolumina. Zum anderen bedeuten mehr Subvolumina bei gleich großem Simulationsvolumen  $V$ , dass die einzelnen Subvolumina kleiner sind. Dies wiederum bedeutet, dass innerhalb der Subvolumina häufiger Reaktionen und zwischen den Subvolumina häufiger Diffusionsprozesse stattfinden. Somit müssen das System und die korrelierten Reaktions- und Diffusionsraten häufiger neu berechnet / geupdatet werden. Insgesamt kann gezeigt werden [118, 124], dass die Laufzeit des Algorithmus proportional zum Logarithmus der Subvolumenanzahl  $N$  ist, also  $\mathbb{L} \sim \log(N)$  ist.



# Kapitel 4

## Lokale Membran Translokations-Ereignisse / Proteinkinase C $\alpha$ LTEs

### 4.1 Einleitung

#### 4.1.1 Motivation

Zelluläre Calcium-Signale steuern unterschiedlichste Prozesse von der Zellbefruchtung über das Zellwachstum (Proliferation) bis hin zum programmierten Zelltod (Apoptosis) [1–3]. Die Universalität des „Second Messengers“ Calcium beruht auf der komplexen zeitlichen und räumlichen Kodierung der Calcium-Signale, die als lokale Events, Oszillationen, oder auch Spiral-, intra- und interzelluläre Wellen auftreten können [1–3]. Seit längerem ist bekannt, dass Calmodulin (CaM), ein Calcium-bindendes regulatorisches Protein, bei der Dekodierung der Calcium-Signale eine wichtige Rolle spielt. Daneben gibt es starke Hinweise, dass auch das Protein PKC (Proteinkinase C) als „Read-Out“-Sensor für das zelluläre Calcium-Netzwerk herangezogen werden kann [22]. Reither et al. konnten zum einen zeigen, dass PKC als Sensor für räumlich und zeitlich begrenzte Calcium-Signale verwendet werden kann und zum anderen, dass die von ihnen „Local Translocation Events“ (LTEs) genannten Ereignisse für die an der Zellmembran auftretenden Signale verantwortlich sind. LTEs sind Signale, die an der Zellmembran detektiert werden können und aus PKC-Ca-Komplexbildungen resultieren, welche in einem Abstand kleiner als  $1 \mu\text{m}$  von der Zellmembran stattfinden. Ausserdem fanden Reither et al. zwei verschiedene Populationen dieser LTEs, kurz andauernde ( $0,5 \text{ s} < \text{Lebenszeit} < 1,5 \text{ s}$ ) und lang andauernde LTEs (Lebenszeiten  $> 4 \text{ s}$ ). Es konnte gezeigt werden, dass diese beiden Populationen aus unterschiedlichen PKC-Membran Bindungen resultieren [22]. Eine plausible Erklärung der lang andauernden LTEs, die nicht mit den

bekanntem Lebenszeiten lokaler Calcium-Signale übereinstimmen, konnte im Experiment jedoch nicht gefunden werden, wo mit der theoretischen Untersuchung im Folgenden angeknüpft werden soll.

#### 4.1.2 Zwei Populationen von lokalen Translokations-Ereignissen

Die experimentellen Ergebnisse von Reither et al. [22] hatten das Ziel herauszufinden, ob und in welchem Maße sich lokale PKC Membran-Translokations-Ereignisse - oder LTEs genannt - als Sensor für komplexe intrazelluläre Calcium-Signale eignen. Hierzu haben sie die in Abschnitt 2.2.2 vorgestellte Prozess-Kaskade (siehe Abbildung 2.3) durch die Stimulation mit Adenosintriphosphat (ATP) in HEK<sup>14</sup> und COS1<sup>15</sup> Zellen aktiviert. Mit Hilfe einer Fluoreszenzmarkierung von PKC konnten die Membrantranslokationen des PKC-Calcium Komplexes mittels 2D Echtzeit-Konfokalmikroskopie aufgenommen werden. Die für die vorliegende Dissertation wichtigsten experimentellen Befunde [22] sollen im Folgenden aufgelistet werden:

1. Stimulationen der Zelle mittels ATP führen zu Ca<sup>2+</sup>- und PKC $\alpha$ -Oszillationen. Verbunden mit diesen Oszillationen kommt es zu PKC-Translokationen zur Membran. Abgestufte ATP-Stimulationen ziehen in gleichem Maße abgestufte Ca<sup>2+</sup>- und PKC $\alpha$ -Signale nach sich.
2. Local Translocation Events sind für die detektierbaren Membranereignisse verantwortlich. LTEs sind Translokationen, die aus Komplexbildungen resultieren, die in einem Abstand  $< 1 \mu\text{m}$  zur Membran stattfinden.
3. **Es existieren zwei Populationen von LTEs mit verschiedenen Lebenszeiten  $\tau$ : kurzlebige ( $0,5 \text{ s} < \tau < 2 \text{ s}$ ) und langlebige ( $\tau > 4 \text{ s}$ ). Die lang andauernden LTEs sind durch kleine Amplituden und räumliche Begrenzung charakterisiert.**
4. Die C2-Bindungsdomäne des PKC $\alpha$  ist für die Ca<sup>2+</sup>-Bindung und somit für die LTEs verantwortlich.
5. Es lassen sich zwei Membranablösezeiten messen, die sich zwei verschiedenen Membran-Wechselwirkungen zuordnen lassen:
  - i) lang andauernde Membran-Wechselwirkungen resultieren aus Bindung von DAG an die C1-Domäne;
  - ii) schnelle Ablösezeiten, also kurze Membran-Wechselwirkungen resultieren aus Prozessen, bei denen die C1-Domäne nicht beteiligt ist, sondern bei denen eine reine Ca<sup>2+</sup>-C2-Domänen Bindung vorliegt.

---

<sup>14</sup>Human embryonic kidney=menschliche embryonale Niere

<sup>15</sup>Cercopithecus aethiops=Meerkatze

Fasst man die experimentellen Ergebnisse zusammen, so konnten Reither et al. zeigen, dass PKC-Translokationen dazu geeignet sind,  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale hinreichend genau zu detektieren, da abgestufte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zu abgestuften PKC-Translokationen führen. Des Weiteren fanden Reither et al. das unerwartete und für unsere theoretische Untersuchungen interessante Ergebnis, dass zwei LTE-Populationen mit verschiedenen Lebenszeiten existieren. Die LTEs mit kurzer Membranverweildauer resultieren aus einer reinen  $\text{Ca}^{2+}$ -C2 Bindung getriebenen Wechselwirkung von PKC und Membran, was auch mit den bekannten Lebenszeiten von lokalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen (1-2 Sekunden [3, 18, 21]) übereinstimmt. Den lang andauernden LTEs konnte eine Wechselwirkung zwischen Membran und einem PKC-Ca-PS-DAG Komplex zugewiesen werden. Charakteristisch für die beiden LTE-Populationen ist, dass sie sich sowohl in ihrer maximalen Fluoreszenzamplitude (Signalamplitude) sowie in ihrer Größe bzw. x-y Ausdehnung kaum unterscheiden.

Um die extrem langen Membranverweildauern der LTEs von bis zu 12 Sekunden zu erklären, die mit keinen bekannten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen übereinstimmen, könnte man sich einen „temporal walk“ des Moleküls zwischen dynamischen Binde / Ablöse-Zyklen mit verschiedenen Bindungspartnern vorstellen. Eine vollständige Ablösung von der Membran wäre nur möglich, falls sich PKC von beiden Bindungspartnern gleichzeitig ablöst. Allerdings würde diese Idee noch nicht die starke und für die lang andauernden LTEs charakteristische räumliche Begrenzung erklären. Dazu müsste mindestens einer der Bindungspartner eine stark eingeschränkte laterale Diffusion innerhalb der Membran besitzen. Solch eine eingeschränkte laterale Diffusion könnte z.B durch sogenannte „Lipid Rafts“ hervorgerufen werden. Als Lipid Rafts, deren Existenz in der Literatur umstritten ist, bezeichnet man Mikrodomänen innerhalb der Zellmembran, die sich durch eine Anreicherung gewisser Membranproteine auszeichnen. Die Lipid Rafts schwimmen / bewegen sich wie kleine Inseln in der Zellmembran, und innerhalb der Lipid Rafts ist die zweidimensionale Proteindiffusion stark eingeschränkt [125].

Neben der Möglichkeit des zyklischen Bindens und Ablösens des PKC-Membran-Komplexes oder des Vorkommens von Lipid Rafts wäre aber auch ein weiterer Mechanismus als Ursache der lang andauernden LTEs denkbar. So könnten zum Beispiel analog zur T-Zell Polarisierung (siehe Kapitel 2.4.2) eine Anhäufung von Mitochondrien unterhalb der Plasmamembran eine mögliche Erklärung für die lang andauernden LTEs liefern. Es wäre denkbar, dass die Mitochondrien das Calcium unterhalb der Plasmamembran für mehrere Sekunden puffern und über diese Zeitspanne immer wieder etwas Calcium ins Zytosol freisetzen, welches dann für „neue“ Translokationsereignisse zur Verfügung steht. Zusätzlich dazu würden die Mitochondrien eine räumliche Begrenzung der Diffusion darstellen. Insgesamt ist jedoch immer noch sehr wenig über die PKC-Membran-Wechselwirkung und die Diffusion von Molekülen innerhalb der Membran bekannt und deshalb ist eine numerische Simulation der lokalen Translokationsereignisse wünschenswert. Mit Hilfe eines theoretischen Modells sollen diverse Szenarien und physikalische Prozesse überprüft werden, welche die Aufspaltung der LTEs in zwei Populationen, die kurzen und die lang andauernden LTEs, erklären können.

Im weiteren Verlauf dieses Kapitels wird zunächst das Reaktions-Diffusions-Modell inklusive der Reaktionsprozesse, Gleichungen sowie der Simulationsgeometrie vorgestellt. Das stochastische 3D-Modell dient zur Untersuchung der zwei verschiedenen LTE-Populationen. Darauf folgt eine Präsentation des Computeralgorithmus, der zur numerischen Berechnung des Systemzustands verwendet wird und im Anschluss daran folgt die Vorstellung der Ergebnisse der theoretischen / numerischen Studie. Abgeschlossen wird dieses Kapitel durch eine Präsentation von FRET-Mikroskopie-Experimenten, die am Lehrstuhl von Prof. Peter Lipp in Homburg durchgeführt wurden. Ziel dieser FRET-Messungen war es, die durch die theoretischen Untersuchungen favorisierte Hypothese einer kooperativen Wechselwirkung der via C1-Domäne an DAG gebundenen PKC-Komplexe zu bestätigen.

## 4.2 Das Simulationsmodell

Ein wesentliches Ergebnis der von Reither et al. [22] durchgeführten Experimente (Abschnitt 4.1.2) ist das Auffinden zweier verschiedener Populationen von sogenannten LTEs. Die erste Population, die kurz andauernden LTEs, stehen in keinem Widerspruch zur Theorie der Calciumsignalgebung (siehe Kapitel 2.2), da ihre Lebensdauer mit den bekannten zeitlichen Verläufen von lokalen Calcium-Signalen, den sogenannten „Puffs“, übereinstimmt [3, 18, 21]. Das Auftreten einer zweiten Population, der langandauernden LTEs, lässt sich jedoch nicht ohne weiteres erklären bzw. verstehen. Das Ziel der theoretischen Beschreibung ist es, ein Simulationsmodell zu entwickeln, auf dessen Basis die Existenz der beiden LTE Populationen untersucht und erklärt werden kann. Das Simulationsmodell soll die bekannten biochemischen Reaktions-Diffusions Prozesse der PKC-Aktivierung und PKC-Translokation beschreiben sowie in der Lage sein, zusätzliche im Experiment nicht ohne weiteres zu überprüfende Eigenschaften der Zelle bzw. der Plasmamembran zu realisieren. Mit Hilfe numerischer Simulationen sollen die Auswirkungen verschiedener Szenarien bzw. physikalischer Mechanismen auf das zeitliche und räumliche Verhalten der LTEs untersucht werden.

### 4.2.1 Reaktions-Diffusions-System der PKC-Membrantranslokationen

Die Kaskade von biochemischen Prozessen, die zur Entstehung von lokalen PKC-Translokationsereignissen führt, beginnt mit einem extrazellulären Reiz bzw. äußeren Signal (siehe Abschnitt 2.2.2). Dieses Signal aktiviert die in der Membran sitzende Phospholipase C, welche dann die Hydrolyse von Phosphatidylinositol ( $\text{PIP}_2$ ) katalysiert. Hierbei entstehen die beiden „Second Messenger“ Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG). Das DAG verbleibt in der Membran, wohingegen  $\text{IP}_3$  ins Zytosol diffundiert und dort die  $\text{IP}_3$ -sensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle des endoplasmatischen Retikulums öffnet (siehe Abbildung 4.1a). Dadurch kommt es zu einer Freisetzung des im endoplasmatischen Retikulum gespeicherten  $\text{Ca}^{2+}$  ins Zytosol, wodurch die zytosolische Ruhekonzentration

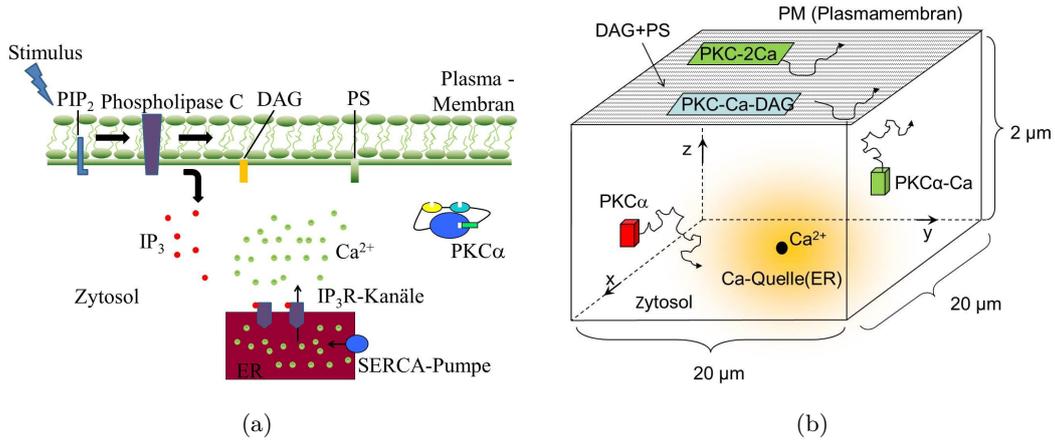
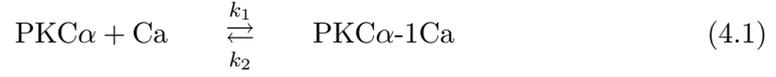


Abbildung 4.1: PKC-Aktivierung und Modellgeometrie. a) Schematische Darstellung des Aktivierungsprozesses, der zu PKC-Membrantranslokationen führt. b) Darstellung der Modellgeometrie. Im Simulationsvolumen  $V = 800 \mu\text{m}^3$  diffundieren ein Calcium-Puffer, PKC, Calcium und der durch die Bindung zweier Calcium-Ionen aktivierte PKC-2Ca-Komplex. Dieser Komplex kann an das in der Zellplasmamembran diffundierende PS und DAG binden.

von ca. 100 nM auf eine Aktivierungskonzentration von ca. 500-1000 nM steigt. Aufgrund der in den Experimenten gemessenen Ausdehnungen der LTEs von ca.  $2 \mu\text{m} \cdot 2 \mu\text{m}$  [22] simuliere ich eine Zellplasmamembran, die eine Fläche von  $20 \mu\text{m} \cdot 20 \mu\text{m}$  besitzt. Die Zell- bzw. Zytosolhöhe, also die  $z$ -Richtung, soll zunächst  $2 \mu\text{m}$  betragen, so dass sich ein Simulationsvolumen  $V$  von  $800 \mu\text{m}^3$  ergibt (siehe Abbildung 4.1b). Der Wert  $z = 2 \mu\text{m}$  trägt dem experimentellen Ergebnis Rechnung, dass detektierbare LTEs aus Komplexbildungen resultieren, die in einem Abstand  $< 1 \mu\text{m}$  von der Membran stattgefunden haben. Das endoplasmatische Retikulum mit seinen  $\text{IP}_3$ -Kanälen wird im Modell idealisiert als eine punktförmige Calcium-Quelle angenommen, die jede Millisekunde für die Dauer des Calcium-Signals eine gewisse Anzahl an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das System abgibt. Die Calcium-Quelle wird in der Mitte der  $x$ - $y$  Ebene und variabler  $z$ -Koordinate platziert. Die Modellierung der PKC-Translokationen startet mit der Freisetzung des intrazellulären Calciums. Das frei diffundierende Calcium kann via C2-Domäne an das im Zytosol homogen verteilte und ebenfalls frei diffundierende PKC zu einem PKC-Ca-Komplex binden. Die freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen können zudem im Zytosol von einem mobilen Calcium-Puffer gepuffert werden. Das durch die Bindung zweier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen „aktivierte“ PKC transloziert als PKC-2Ca-Komplex zur Plasmamembran, wo es durch die verringerte elektrostatische Abstoßung dann zunächst via C2-Domäne an das in der Membran diffundierende Phosphatidylserin (PS) binden kann. Ein durch die C2-Domäne an PS gebundener PKC-2Ca-PS-Komplex dissoziiert nach einer mittleren Lebensdauer von ca. 10 Millisekunden [22] wieder von der Membran. Trifft der PKC-2Ca-PS-Komplex vor der Membranablösung bei seiner zweidimensionalen, lateralen Diffusion in der Membran auf Diacylglycerol kann PKC via C1-Domäne an DAG binden [51]. Dieser PKC-2Ca-

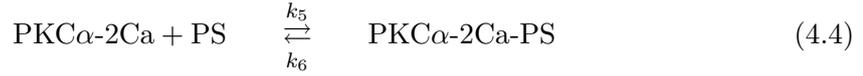
PS-DAG-Komplex, der eine stark erhöhte mittlere Lebensdauer besitzt [22, 52, 53, 55], führt eine Konformationsänderung durch, wodurch das PKC-Pseudosubstrat freigesetzt und das Enzym aktiviert wird [56]. All diese Prozesse, die bei der Entstehung von lokalen Translokationsereignissen beteiligt sind, können zu folgendem Reaktions-Diffusions-Schema zusammengefasst werden:

**Reaktionen** im Zytosol:



**Diffusion** im Zytosol:  $PKC\alpha$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $PKC\alpha-1Ca$ ,  $PKC\alpha-2Ca$ , Puffer.

**Reaktionen** an der Schnittstelle Membran-Zytosol bzw. in der Membran:



**Diffusion** in der Membran:  $PKC\alpha-2Ca$ ,  $PKC\alpha-2Ca-PS$ ,  $PKC\alpha-2Ca-PS-DAG$ , PS, DAG. Insgesamt ergeben sich also folgende Differentialgleichungen, die das betrachtete Reaktions-Diffusions-System vollständig beschreiben:

$$\begin{aligned} \frac{dPKC\alpha}{dt} &= -k_1 \cdot PKC\alpha \cdot Ca + k_2 \cdot PKC\alpha-1Ca \\ &\quad + D_{PKC\alpha} \cdot \nabla^2 PKC\alpha \end{aligned} \quad (4.6)$$

$$\begin{aligned} \frac{dPKC\alpha-1Ca}{dt} &= k_{22} \cdot PKC\alpha-2Ca - k_{11} \cdot PKC\alpha-1Ca \cdot Ca \\ &\quad - k_2 \cdot PKC\alpha-1Ca + k_1 \cdot PKC\alpha-1Ca \cdot Ca \\ &\quad + D_{PKC\alpha-1Ca} \cdot \nabla^2 PKC\alpha-1Ca \end{aligned} \quad (4.7)$$

$$\begin{aligned} \frac{dPKC\alpha-2Ca}{dt} &= -k_{22} \cdot PKC\alpha-2Ca + k_{11} \cdot PKC\alpha \cdot Ca \\ &\quad - k_5 \cdot PKC\alpha-2Ca \cdot PS \\ &\quad + k_6 \cdot PKC\alpha-2Ca-PS \\ &\quad + D_{PKC\alpha-2Ca} \cdot \nabla^2 PKC\alpha-2Ca \end{aligned} \quad (4.8)$$

$$\begin{aligned} \frac{dCa^{2+}}{dt} = & -k_1 \cdot PKC\alpha \cdot Ca + k_2 \cdot PKC\alpha-1Ca \\ & -k_{11} \cdot PKC\alpha-1Ca \cdot Ca + k_{22} \cdot PKC\alpha-2Ca \\ & -k_3 \cdot Puffer \cdot Ca + k_4 \cdot Puffer-Ca \\ & + D_{Ca^{2+}} \cdot \nabla^2 Ca^{2+} \end{aligned} \quad (4.9)$$

$$\begin{aligned} \frac{dPuffer}{dt} = & -k_3 \cdot Puffer \cdot Ca + k_4 \cdot Puffer-Ca \\ & + D_{Puffer} \cdot \nabla^2 Puffer \end{aligned} \quad (4.10)$$

$$\begin{aligned} \frac{dPuffer-Ca}{dt} = & k_3 \cdot Puffer \cdot Ca - k_4 \cdot Puffer-Ca \\ & + D_{Puffer-Ca} \cdot \nabla^2 Puffer-Ca \end{aligned} \quad (4.11)$$

$$\begin{aligned} \frac{dPKC\alpha-2Ca-PS}{dt} = & k_5 \cdot PKC\alpha-2Ca \cdot PS \\ & -k_6 \cdot PKC\alpha-2Ca-PS \\ & -k_7 \cdot PKC\alpha-2Ca-PS \cdot DAG \\ & +k_8 \cdot PKC\alpha-2Ca-PS-DAG \\ & + D \cdot \nabla^2 PKC\alpha-2Ca-PS \end{aligned} \quad (4.12)$$

$$\begin{aligned} \frac{dPKC\alpha-2Ca-PS-DAG}{dt} = & k_7 \cdot PKC\alpha-2Ca-PS \cdot DAG \\ & -k_8 \cdot PKC\alpha-2Ca-PS-DAG \\ & + D \cdot \nabla^2 PKC\alpha-2Ca-PS-DAG \end{aligned} \quad (4.13)$$

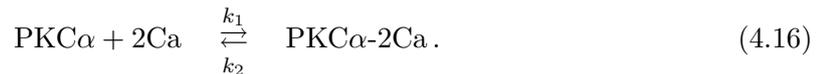
$$\begin{aligned} \frac{dDAG}{dt} = & -k_7 \cdot PKC\alpha-2Ca-PS \cdot DAG \\ & +k_8 \cdot PKC\alpha-2Ca-PS-DAG \\ & + D_{DAG} \cdot \nabla^2 DAG \end{aligned} \quad (4.14)$$

$$\begin{aligned} \frac{dPS}{dt} = & -k_5 \cdot PKC\alpha-2Ca \cdot PS \\ & +k_6 \cdot PKC\alpha-2Ca-PS \\ & + D_{PS} \cdot \nabla^2 PS . \end{aligned} \quad (4.15)$$

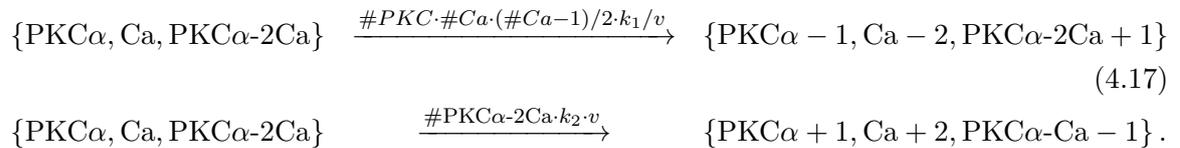
Reaktions-Diffusions-Systeme, die durch Differentialgleichungen der Form 4.6-4.15 gegeben sind, können (siehe Kapitel 3.1.1) entweder deterministisch oder stochastisch beschrieben werden. Zur theoretischen Untersuchung der PKC-Membrantranslokationen habe ich mich für eine an das System angepasste Version der „Next-Subvolume Method“ [118] (NSM, siehe Kapitel 3.5) entschieden. Die Gründe hierfür und der optimierte Algorithmus werden im folgenden Abschnitt 4.2.2 vorgestellt.

### 4.2.2 Monte-Carlo-Algorithmus und Modellannahmen

Zur theoretischen Untersuchung der PKC-Membrantranslokationen habe ich eine auf das betrachtete System optimierte Version der „Next Subvolume Method“ [118] in der Programmiersprache C implementiert. Ich habe mich für eine stochastische Beschreibung des Systems entschieden, da für die Analyse der lokalen Translokationsereignisse an der Plasmamembran eine räumliche und Teilchen basierte Auflösung wünschenswert ist. Mit Hilfe des im Folgenden vorgestellten Algorithmus ist sowohl eine Clusteranalyse als auch eine Modellierung von Nächsten-Nachbar-Wechselwirkungen möglich. Hauptcharakteristikum dieses auf der NSM aufbauenden Gillespie-Algorithmus ist die Unterteilung des Simulationsvolumens  $V$  in kleine Subvolumina mit Volumen  $v = l^3$ , in denen die Anordnung der Moleküle als homogen angenommen werden kann. Im betrachteten System der PKC-Translokationen wird die Modellgeometrie (siehe Abbildung 4.1b) in Subvolumina unterteilt, wobei die oberste Schicht (positive z-Richtung) die zweidimensionale Zellplasmamembran und die restlichen Subvolumina-Schichten das Zytosol darstellen. Die Zellmembran nimmt bei der Algorithmusentwicklung eine besondere Stellung ein, da an der Schnittstelle Zytosol-Membran Reaktionen ablaufen können, die dazu führen, dass Teilchen, die bislang im Zytosol eine dreidimensionale Diffusion durchgeführt haben, in die Zellmembran wechseln und dort in einem hoch aufgelösten zweidimensionalen Gitter eine laterale Diffusion durchführen. Außerdem wird in der Zellmembran eine positionsabhängige Wechselwirkung der Teilchen modelliert, die ebenfalls eine Erweiterung des NSM-Algorithmus notwendig macht, was im Folgenden noch erläutert wird. Bei der stochastischen Beschreibung wird der Systemzustand zu jedem Zeitpunkt durch die Anzahl der Moleküle in den jeweiligen Subvolumina definiert. Die Teilchenanzahl und somit der Systemzustand können sich auf zwei Arten ändern. Entweder findet eine Reaktion vom Typ Gl. 4.1-4.5 statt, was die Teilchenzahl in einem Subvolumen ändert, oder aber es findet eine Diffusion statt, wodurch sich die Teilchenanzahl in zwei benachbarten Subvolumina ändert. Als Beispiel sollen hier die möglichen Zustandsänderungen eines Subvolumens im Zytosol betrachtet werden<sup>16</sup>:



Dies bedeutet, dass ein Zustand  $\{\text{PKC}\alpha, \text{Ca}, \text{PKC}\alpha\text{-}2\text{Ca}\}$  übergehen kann in:




---

<sup>16</sup>Dieses Beispiel beinhaltet zur besseren Übersicht keinen Calcium-Puffer im Zytosol und betrachtet eine direkte Reaktion  $\text{PKC}\alpha + 2\text{Ca} \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} \text{PKC}\alpha\text{-}2\text{Ca}$  anstatt der beiden Gleichungen 4.1 und 4.2.  
# steht für: Anzahl an.

Die Übergangsraten hängen jeweils nur vom aktuellen Systemzustand ab und nehmen die Werte  $\#PKC \cdot \#Ca \cdot (\#Ca - 1)/2 \cdot k_1/v$  bzw.  $\#PKC\alpha-Ca \cdot k_2 \cdot v$  an. Sie sind proportional zum Volumen der Subvolumina  $v$  und hängen von den Reaktionsraten  $k_1$  und  $k_2$  ab, welche die Einheit  $M^{-1}s^{-1}$  und  $Ms^{-1}$  besitzen.

Die Diffusion eines Teilchens  $A \in \{PKC\alpha, Ca, PKC\alpha-Ca\}$  von einem SV  $i$  in ein Subvolumen  $j$  ändert den Systemzustand wie folgt:

$$\{\dots, A_i, \dots, A_j, \dots\} \xrightarrow{\#A_i \cdot d_{ij}^A} \{\dots, A_i - 1, \dots, A_j + 1, \dots\}. \quad (4.18)$$

Die Rate für zufällige Sprünge (Random Walk) zwischen Nachbarvolumina ist  $d_{ij}^A = d_{ji}^A = D/l^2$  und anderenfalls Null, wobei  $D$  die Diffusionskonstante der jeweiligen Spezies und  $l$  die Kantenlänge der Subvolumina sind.

Somit ergibt sich für das PKC-Translokations-System (unter Vernachlässigung eines zytosolischen Calcium-Puffers) folgende „Reaction Diffusion Master Equation“ für die zeitabhängige Wahrscheinlichkeitsverteilung

$P = P(\{A_1, B_1, C_1, D_1, E_1, F_1, G_1, \dots, A_i, \dots, E_i, F_i, G_i, \dots, A_N, B_N, C_N, D_N, E_N, F_N, G_N\}, t)$  für die Anzahl der PKC $\alpha$ =A, Ca=B, PKC $\alpha$ -2Ca=C, PKC $\alpha$ -2Ca-PS=D, PKC $\alpha$ -2Ca-PS-DAG=E, DAG=F, PS=G Moleküle in den jeweiligen SV zu:

$$\begin{aligned} \frac{dP}{dt} = & \sum_i \left[ \frac{k_1}{v} \cdot PKC_i \cdot Ca_i \cdot (\mathbb{E}_i^{-PKC, -2Ca, PKC-2Ca} - 1)P \right. \\ & + v \cdot k_2 \cdot PKC-2Ca_i (\mathbb{E}_i^{PKC, 2Ca, -PKC-2Ca} - 1)P \\ & + \frac{k_5}{v} \cdot PKC-2Ca_i \cdot PS_i (\mathbb{E}_i^{PKC-2Ca, -PKC-2Ca-PS} - 1)P \\ & + v \cdot k_6 \cdot PKC-2Ca-PS_i (\mathbb{E}_i^{-PKC-2Ca, PKC-2Ca-PS} - 1)P \\ & + \frac{k_7}{v} \cdot PKC\alpha-2Ca-PS \cdot DAG_i (\mathbb{E}_i^{-PKC-Ca-PS, -DAG, PKC-Ca-PS-DAG} - 1)P \\ & \left. + k_8 PKC-2Ca-PS-DAG_i (\mathbb{E}_i^{-PKC-2Ca-PS, DAG, PKC-2Ca} - 1)P \right] \\ & + \underbrace{\sum_i \sum_{j \neq i} \sum_{\mathbb{X}} (\mathbb{E}_i^{\mathbb{X}} \mathbb{E}_j^{-\mathbb{X}} - 1) d_{ij}^{\mathbb{X}} \mathbb{X}_j P}_{\text{Diffusion}}, \end{aligned} \quad (4.19)$$

mit  $\mathbb{X} \in \{PKC, Ca, PKC-2Ca, PKC-2Ca-PS, PKC-2Ca-PS-DAG\}$  und dem Operator  $\mathbb{E}$ , der wie folgt definiert ist:  $\mathbb{E}^{i,j} f(A, B) = f(A + i, B + j)$ .

Die realen Reaktionsraten und Diffusionskonstanten müssen für den Algorithmus in Übergangsraten der Einheit  $[s^{-1}]$  umgerechnet werden. Wie bereits bei der Diskussion von Gleichung 4.17 angemerkt, geht in beiden Fällen die Subvolumen-Größe in die Umrechnung ein; einmal in Form des Volumens  $v$  bei Reaktionen und einmal als Fläche  $l^2$  bei Diffusionsprozessen. Die Diffusion der verschiedenen Spezies wird als Random Walk beschrieben, bei dem die Reaktanten zwischen benachbarten Subvolumina mit Rate  $D/l^2$  wechseln können. Die einzelnen Subvolumina mit Volumen  $v = l^3$  müssen so

klein gewählt werden, dass die Verteilung der Moleküle in ihnen als homogen / gleichverteilt angenommen werden kann. Dies wird durch die Bedingung  $l^2 \ll 6D_{min} \cdot \tau_{min}$  [118] gewährleistet, wobei  $D_{min}$  die kleinste Diffusionskonstante und  $\tau_{min}$  die kürzeste Lebenszeit der möglichen Komplexe darstellt. Im betrachteten System der PKC-Membrantranslokationen ergibt sich bei  $\tau_{min} = \tau_{PKC-Ca} = 15$  ms und  $D_{min} = D_{PKC-Ca} = 4,67 \cdot 10^{-7} \frac{cm^2}{s}$  eine obere Schranke für die Kantenlänge  $l \ll 2 \mu m$ . Somit könnte bei Nutzung eines „Sicherheits-Faktors“ von 10 die Kantenlänge zu  $l = 0,2 \mu m$  gewählt werden, was einer Anzahl von  $100 \cdot 100 \cdot 10 = 100.000$  Subvolumina mit Zellvolumen von  $v = 0,008 \mu m^3$  entspricht. Die Zellplasmamembran wird durch die oberste Schicht Subvolumina repräsentiert und umfasst somit  $1 \cdot 100 \cdot 100 = 10.000$  Zellen. Innerhalb der Membran ist aus verschiedenen Gründen eine höhere räumliche Auflösung als die  $l = 0,2 \mu m = 200$  nm wünschenswert, weshalb eine Erweiterung der ursprünglichen NSM Methode erforderlich ist, wie im Folgenden erläutert wird.

#### Modellierung der Plasmamembran

Eine Sonderstellung in dem Modell bzw. dem Monte-Carlo-Algorithmus erfährt die Plasmamembran (oberste Schicht an Subvolumina). Sie wird als ein zweidimensionales Gitter mit variabler Anzahl an Stützstellen pro Subvolumen modelliert. Dadurch erreicht man innerhalb der Membran eine höhere Ortsauflösung und kann den Spezies innerhalb dieses 2D-Gitters über ihre Koordinaten (x,y) eindeutig eine Position zuweisen. Die Ortsinformation der Teilchen kann z.B. dazu genutzt werden, Reaktionen, die in der Membran ablaufen, in Abhängigkeit von besetzten Nachbargitterplätzen zu modellieren oder auch um eine Clusteranalyse der membrangebundenen Spezies durchzuführen. Die Überlagerung der obersten Subvoluminaschicht durch ein 2D-Gitter macht die Erweiterung des in Abschnitt 3.5 beschriebenen NSM-Algorithmus notwendig. Dafür verantwortlich sind verschiedene Mechanismen, die sowohl Diffusionsprozesse als auch Reaktionen betreffen können. Die folgende Auflistung soll die Besonderheiten der Modellierung eines zweidimensionalen Gitters zusammenfassen, welches wiederum in Subvolumen / Subflächen aufgeteilt ist und mit den darunter liegenden dreidimensionalen Subvolumina „kommunizieren“ muss:

- Das Binden eines Teilchens an die Plasmamembran führt dazu, dass das Teilchen in die Programmroutine „Plasmamembran“ übergeht. Dazu muss eine Zufallszahl bestimmt werden mit deren Hilfe dann eine im Subgitter freie Position (x,y) ausgewürfelt wird und das Teilchen (PKC-2Ca-PS-Komplex) dort positioniert wird.
- Teilchen in der Membran besitzen einen zusätzlichen Freiheitsgrad, nämlich die Anzahl an besetzten Nachbargitterplätzen. Dabei muss zwischen PKC-Komplexen auf Nachbargitterplätzen unterschieden werden, die per C1-Domäne an DAG bzw. die via C2-Domäne an PS gebunden sind.
- Es muss eine Liste geben, die alle Positionen ((x,y)-Koordinaten) von PS-gebundenen und DAG-gebundenen Komplexen in Abhängigkeit der besetzten Nächsten-Nachbarn

gespeichert hat.

- Ändert sich der Zustand eines Gitterplatzes, egal ob durch Reaktion oder Diffusion, so müssen alle Nachbargitterplätze dieser sowie der neuen Position durchlaufen und deren Einträge bezüglich der Nächsten-Nachbarn geupdatet werden.
- Diffusion: Eine Diffusion läuft nun nicht zwangsweise zwischen zwei benachbarten Subvolumina, sondern häufig innerhalb des Subgitters eines Subvolumens bzw. einer Subfläche ab. So muss bei der Aktualisierung der Prioritätenliste bei Diffusion nur ein Subvolumen geupdatet werden. Sonderfall ist dabei die Diffusion über Subvolumina-Grenzen hinaus. In diesem Fall müssen wiederum die Nächsten-Nachbar-Informationen sowie die Reaktionsraten in zwei Subvolumina geupdatet werden.
- Reaktionen: Läuft eine Reaktion an einem Gitterpunkt ab, der an der Schnittstelle zwischen zwei Subvolumina liegt oder gibt es Reaktionen, die von der Anzahl an besetzten Nachbarplätzen abhängen, so müssen nun auch bei einer Reaktion zwei Subvolumina geupdatet werden. Zusätzlich kann bei Ablauf einer Reaktion nicht einfach die Teilchenzahl innerhalb des entsprechenden Subvolumens verringert werden, sondern es muss ein „bestimmtes“ Teilchen auf dem Gitter verändert werden. Wurde vom Algorithmus eine Reaktion eines PS- oder DAG-gebundenen Komplexes mit K-Nächsten-Nachbarn ausgewürfelt, so muss eine zusätzliche Zufallszahl erzeugt werden, mit Hilfe derer bestimmt wird, welches Teilchen an welcher Position mit der entsprechenden Anzahl an K-Nächsten-Nachbarn reagiert.

Da die Algorithmus-Abläufe bei Reaktions- und Diffusionsprozessen im Zytosol (naiver NSM-Algorithmus) und in der Plasmamembran stark voneinander abweichen, werden diese von zwei separaten Programm-Modulen verwaltet. Sehr wichtig ist die fehlerfreie Funktion einer Schnittstelle zwischen den beiden Teilen, die gewährleistet, dass die Reaktionsraten in allen Subvolumina zu jedem Zeitpunkt korrekt sind und die Prioritätsliste richtig sortiert vorliegt.

Trotz der oben genannten Algorithmuserweiterungen konnte ein großer Teil des NSM-Algorithmus (siehe Kapitel 3.5) verwendet werden, inklusive der benutzen Datenstrukturen wie z.B. die Index-Warteschlange für die Speicherung der Probezeiten. Da sich im Iterationsteil des Algorithmus mit zweidimensionaler (x,y)-Auflösung der Zellmembran im Vergleich zum naiven NSM-Algorithmus viele Schritte ändern, gebe ich hier im folgenden den von mir entwickelten Algorithmus in Meta-Code an. Die zur NSM-Methode unveränderte System-Initialisierung wird zur Vollständigkeit und besseren Übersicht der benutzen Parameterbezeichnungen ebenfalls angegeben.

NSM basierter Algorithmus inklusive zweidimensionaler (x,y)-Auflösung der Zellmembran

---

**I. Initialisierung** (analog zum NSM-Algorithmus [118])

1. Verteile die verschiedenen Spezies in die Subvolumina und speichere den Zustand in einer Konfigurationsmatrix.
2. Berechne die Summe der Reaktionsraten  $r_k = \sum_{j=1}^M a_{jk}$  und speichere sie in einer Ratenmatrix.  $a_{jk}$  sind hierbei die Intensitäten der Reaktion  $j$  im Subvolumen  $k$ .
3. Berechne die Summe der Diffusionsraten  $s_i = n_i \sum_{j=1}^N d_j X_j^i$ , wobei  $d_j = D_j/l^2$  ist.  $D_j$  ist die Diffusionskonstante der Spezies  $j$  und  $d_j$  die Rate für Sprünge zwischen benachbarten Subvolumina.  $X_j^i$  ist die Anzahl an Molekülen der Spezies  $j$  ( $j = 1, \dots, N$ ) im Subvolumen  $i$  und  $n_i$  ist die Anzahl an Richtungen, in die die Moleküle diffundieren können.
4. Für jedes Subvolumen:
  - a. Berechne die Summe  $r_i + s_i$ .
  - b. Erzeuge eine auf dem Einheitsintervall gleichverteilte Zufallszahl  $ran$ .
  - c. Berechne die früheste Zeit eines Ereignisses gemäß der Vorschrift:  
 $\tau_i = -\ln(ran)/(r_i + s_i)$ .
5. Ordne die Subvolumina in einer Prioritätenwarteschlange so an, dass das Subvolumen mit kleinster Zeit  $\tau_i$  als oberstes steht und alle absteigenden Einträge der Liste nach kleineren Werten  $\tau$  geordnet sind.

**II. Iteration** (an das PKC-System angepasst)

6. Wähle als Subvolumen, in dem das nächste Ereignis stattfinden soll, das Volumen  $\lambda$ , dessen Zeit  $\tau_\lambda$  als oberstes in der Warteschlange steht und setze  $t = \tau_\lambda$ . Erzeuge erneut eine Zufallszahl  $ran_2$  und führe eine Reaktion aus, falls  $ran_2 < r_\lambda/(r_\lambda + s_\lambda)$  ist, andernfalls eine Diffusion. Findet die Reaktion / Diffusion im Zytosol statt?  
Ja  $\rightarrow$  Gehe zum entsprechenden Punkt 7. bzw. 8. des NSM-Algorithmus in Abschnitt 3.5. Ausnahme bildet eine Reaktion, bei der ein PKC-Komplex an die Membran bindet. In diesem Fall muss eine zusätzliche Zufallszahl generiert werden, mittels derer eine freie Position (x,y) im 2D-Membrangitter ausgewürfelt wird.  
Nein  $\rightarrow$  Reaktions / Diffusionsprozesse werden vom „Membranmodul“ durchgeführt; gehe zu Punkt 7.B oder 8.B.

7.B. Reaktions-Ereignis:

- a. Erzeuge eine Zufallszahl, um nach Gillespies direkter Methode zu bestimmen, welche Reaktion abläuft.
- b. Hängt die so bestimmte Reaktion von der Anzahl besetzter Nachbargitterplätze ab, so muss erneut eine Zufallszahl erzeugt werden. Diese Zufallszahl wird dazu verwendet, ein Teilchen zu bestimmen, das die entsprechende Anzahl an besetzten Nachbarn besitzt.
- c. Führe die Routine „Update Nachbarn“ aus. Diese Routine durchläuft die vier Nächsten-Nachbarn und speichert die Anzahl der via PS- und DAG-gebundenen Komplexe dieser Position in einer Variablen ab.
- d. Erneuere den Zustand des Subvolumens  $\lambda$ , so dass die Ausführung der ausgewählten Reaktion widergespiegelt wird. Falls die Reaktion an einem Gitterpunkt stattfindet, der an ein Nachbarvolumen angrenzt, so führe die Routine „Update Nachbarn“ auch in dem Nachbarvolumen  $\gamma$  aus.
- e. Berechne erneut die Summe  $r_\lambda + s_\lambda$  und evtl.  $r_\gamma + s_\gamma$  (da die Reaktionsraten von den besetzten Nachbargitterplätzen abhängen). Erzeuge neue Zufallszahl(en), um die nun geltenden Zeiten der nächsten Ereignisse  $\tau_\lambda = -\ln(\text{ran})/(r_\lambda + s_\lambda) + t$  und evtl.  $\tau_\gamma = -\ln(\text{ran}_2)/(r_\gamma + s_\gamma) + t$  zu berechnen.
- f. Füge das abgeänderte  $\tau_\lambda$  und das evtl. abgeänderte  $\tau_\gamma$  in die Warteschlange ein und sortiere diese neu.

8.B. Diffusions-Ereignis:

- a. Erzeuge eine Zufallszahl, um zu bestimmen, welcher Spezies das diffundierende Molekül angehört.
- b. Erzeuge eine ganzzahlige Zufallszahl  $\in [1, 2, 3, 4]$ . Lasse ein Molekül der zuvor bestimmten Spezies in die durch die Zufallszahl festgelegte Richtung auf den entsprechenden Gitterplatz diffundieren.
- c. Führe die Routine „Update Nachbarn“ aus.
- d. Erneuere den Zustand des Subvolumens  $\lambda$ , so dass die Ausführung der Diffusion widergespiegelt wird. Ein Nachbarvolumen  $\gamma$  muss nur dann geupdated werden, falls bei der Diffusion eine Subvolumen-Grenze überschritten wurde.
- d. Berechne erneut die Summe  $r_\lambda + s_\lambda$  und evtl.  $r_\gamma + s_\gamma$ . Berechne wie in 7.B.e die neue(n) Zeit(en)  $\tau$ .
- e. Füge die abgeänderten  $\tau_\lambda$  und evtl.  $\tau_\gamma$  in die Warteschlange ein und sortiere diese neu.

9. Gehe zu 6. zurück bis eine Zeit  $t > t_{\text{ende}}$  erreicht ist.

### Modell-Annahmen

In Kooperation mit Mike Bonny vom Lehrstuhl Prof. Karsten Kruse wurde im Rahmen des Projektes A5 des Sonderforschungsbereichs 1027 die Idee einer Wechselwirkung zwischen DAG-gebundenen PKC-Membrankomplexen sowie die Vorstellung und Umsetzung eines Lawineneffekts entwickelt.

### Wechselwirkung der DAG-gebundenen PKC $\alpha$ -Komplexe

Als mögliche Erklärung der zwei Populationen von PKC-Membrantranslokationen soll der Mechanismus einer kooperativen Bindung zwischen via C1-Domäne gebundenen PKC-2Ca-Komplexen überprüft werden. Kooperative Bindung bedeutet, dass es eine stabilisierende Wechselwirkung zwischen den DAG-gebundenen PKC gibt, die sich in einem Abstand  $< 15$  nm zueinander befinden. Diese bewirkt, dass die Membranverweildauer der DAG-gebundenen PKC verlängert und somit die Ablöserate verringert wird (siehe Abbildung 4.2). Algorithmisch ist die Wechselwirkung zwischen den membrangebundenen PKC $\alpha$ -Molekülen dadurch realisiert, dass sich die Ablöseraten verringern, falls einer der vier nächsten Nachbarn im Membrangitter ebenfalls mit einem membrangebundenen PKC $\alpha$ -Molekül besetzt ist. Die angenommene Abhängigkeit der Ablöseraten ist in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Spezies	Anzahl Nachbarn	Ablöserate [1/s]	mittlere Verweildauer [s]
PS	0	100	0,01
PS	1	100	0,01
PS	2	100	0,01
PS	3	100	0,01
PS	4	100	0,01
DAG	0	8	0,125
DAG	1	4	0,25
DAG	2	0,8	1,25
DAG	3	0,1	10
DAG	4	0	inf

Tabelle 4.1: Mittlere Lebensdauer und Ablöseraten bei Annahme einer kooperativer Bindung / Wechselwirkung zwischen den via C1-Domäne an DAG-gebundenen PKC-2Ca-Komplexen.

### „Lawineneffekt“

Ein Merkmal der langandauernden LTEs ist eine Plateauphase mit relativ konstanter Fluoreszenzintensität, bevor es dann spontan zu einem lawinenartigen Ablösen der

PKC $\alpha$ -Moleküle von der Membran kommt [22]. Auch die Population der kurz andauernden LTEs, der zwar die Plateauphase fehlt, zeigt einen relativ plötzlichen Einbruch der Fluoreszenzintensität bzw. ein abruptes Ende des Translokationssignals. Ein Mechanismus, der diesen Umstand erklären kann, ist der von mir als „Lawineneffekt“ bezeichnete Prozess. Es ist bekannt, dass die vollständige Bindung von PKC an die Membran (via C1- und C2-Domäne) eine Konformationsänderung bewirkt, wodurch das Pseudosubstrat freigelegt und die Enzymfunktion eingeleitet wird (siehe Abbildung 2.3). Beim „Lawineneffekt“ nehme ich nun an, dass eine zufällige Dissoziation eines der beiden Calcium-Ionen von der C2-Domäne die Membranablösung inklusive einer Umkehr der Konformationsänderung einleitet. Diese Konformationsänderung innerhalb eines bestehenden PKC-Clusters führt dazu, dass ein mechanischer Stress / Druck auf die benachbarten Cluster-Proteine ausgeübt wird, welche ihrerseits in einen von mir als „Instabil“ bezeichneten Zustand übergehen (siehe Abbildung 4.3). Dieser „instabile“ Zustand zeichnet sich dadurch aus, dass die an die C2-Domäne gebundenen Calcium-Ionen dissoziieren und das PKC-Protein dadurch nur noch über eine schwache Membranbindung verfügt, was sich in einer erhöhten Ablöserate (vgl. Tabelle 4.3) widerspiegelt. Bei Annahme des „Lawineneffekts“ wird das in den Gleichungen 4.1-4.5 dargestellte PKC-Translokations-

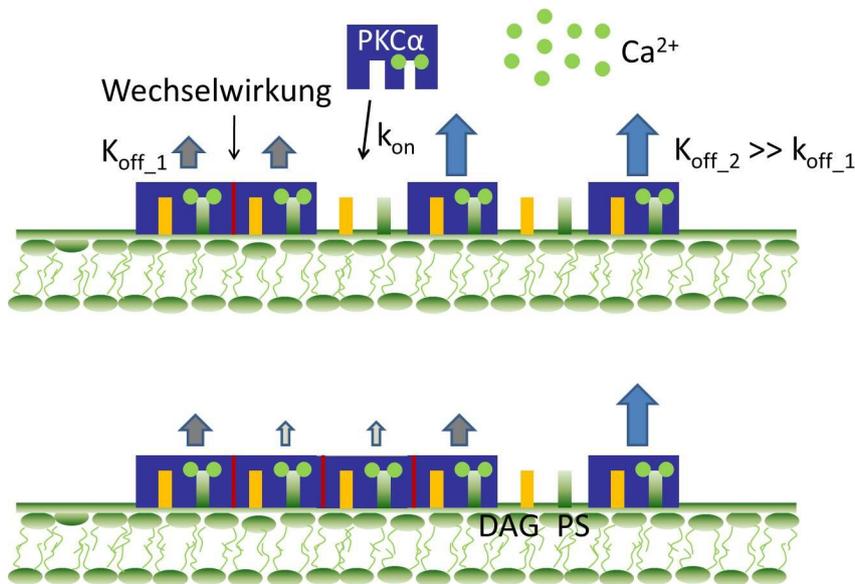
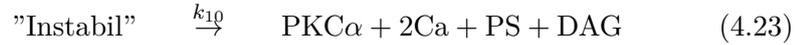


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Wechselwirkung zwischen den DAG-gebundenen PKC-Molekülen. Die Pfeilgröße ist ein Indikator für die Größe der Membranablöserate. Ein Vergleich der oberen und unteren Abbildung verdeutlicht, wie sich die Ablöserate und somit umgekehrt proportional die Membranverweildauer einzelner PKC-Komplexe in Abhängigkeit der Clusterstruktur ändert.

Reaktionsschema wie folgt geändert und ergänzt:



mit "Instabil" =  $\text{PKC}\alpha\text{-1Ca-PS-DAG}$  und  $k_8(NN)$  abhängig von den Nächsten-Nachbar-Gitterplätzen NN. Die zufällige Dissoziation eines Calcium-Ions vom PKC-Komplex geschieht mit Rate  $k_9$ , was zu einer Konfigurationsänderung und schließlich zu einem instabilen Komplex führt. Diese neue Spezies „Instabil“ verfügt nur über eine sehr schwache Membranbindung und löst sich mit einer gegenüber dem Komplex  $\text{PKC}\alpha\text{-2Ca-PS-DAG}$  erhöhten Rate  $k_{10}$  von der Membran ab. Eine Entstehung der Spezies „Instabil“ zieht eine instantane Umwandlung der benachbarten DAG-gebundenen Komplexe im PKC-Cluster in die instabile Konfiguration nach sich, wie das  $\infty$ -Zeichen über dem Reaktionspfeil in Gleichung 4.24 andeuten soll.

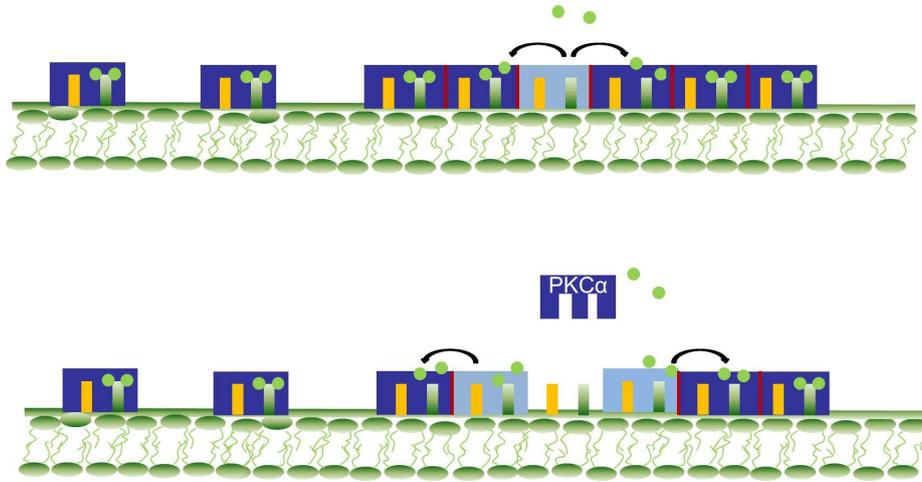


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung eines lawinenartigen Ablösens der membran-gebundenen PKC Cluster von der Membran. Der hellblaue PKC-Komplex zeichnet sich dadurch aus, dass seine beiden  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen dissoziiert sind, und das PKC sich deshalb unter Konformationsänderung wieder von der Membran ablöst. Es ist vorstellbar, dass dadurch ein mechanischer Stress auf die Nächsten-Nachbar-PKC ausgeübt wird und diese als Konsequenz selbst instabil werden (hellblaue PKC in der unteren Abbildung). Dieser Prozess zieht sich durch das gesamte PKC Cluster.

### 4.2.3 „Base-Case“ - oder Standard-Konfiguration

Als Simulationsvolumen wird die in Abbildung 4.1 zu sehende Geometrie gewählt. Das Gesamtvolumen von  $2 \mu\text{m} \cdot 20 \mu\text{m} \cdot 20 \mu\text{m} = 800 \mu\text{m}^3$  wird in Subvolumina der Größe  $(0,2 \mu\text{m})^3 = 0,008 \mu\text{m}^3$ , also insgesamt  $10 \cdot 100 \cdot 100 = 100.000$  Subvolumina unterteilt. Dabei werden zwei Raumbereiche unterschieden, das Zytosol und die Zellmembran. Die Membran wird von der in positiver z-Richtung obersten Schicht der Subvolumina gebildet und nimmt eine besondere Form der Modellierung ein (siehe oben im Text). Den Membransubvolumina wird ein zweidimensionales Gitter eingebettet, welches pro Subvolumen  $12 \cdot 12 = 144$  Gitterplätze umfasst. Dies entspricht einer Gitterkonstante von 16,6 nm, die so groß gewählt wurde, dass als Scheiben angenommene PKC-Moleküle mit einem Stokeschen Radius von ca.  $50 \text{ \AA}$  [40] das Gitter ausfüllen und gleichzeitig eine Wechselwirkung aufeinander ausüben können. Die physikalischen Systemränder für Diffusionsprozesse können entweder durch reflektierende, absorbierende oder periodische Randbedingungen modelliert werden. Standardmässig werden periodische Randbedingungen für alle Raumrichtungen gewählt. Eine Ausnahme bildet hier die positive z-Richtung, in der ich reflektierende Randbedingungen annehme, da dort die

	Volumen [ $\mu\text{m}^3$ ]	Anzahl Subvolumina
Subvolumen	$0,2 \cdot 0,2 \cdot 0,2 \mu\text{m}^3 = 0,008 \mu\text{m}^3$	1
Plasmamembran	80	10.000
Zytosol	720	90.000
Gesamtvolumen	800	100.000
<hr/>		
Spezies	Konzentration [Mol]	Konzentration [Teilchen/SV]
PKC $\alpha$	$0,55 \cdot 10^{-6}$	2,7
Puffer	$4,8 \cdot 10^{-6}$	24
PS (Membran)	$4 \cdot 10^{-6}$	20
DAG (Membran)	$4 \cdot 10^{-6}$	20
<hr/>		
Spezies	Diffusionsgeschwindigkeit 3D (Zytosol) $\frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$	2D (Membran) $\frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$
Calcium	$2,0 \cdot 10^{-6}$ [126]	$1 \cdot 10^{-8}$
PKC $\alpha$	$4,8 \cdot 10^{-7}$ [127]	$5 \cdot 10^{-9}$
PKC $\alpha$ -1Ca	$4,66 \cdot 10^{-7}$ [127]	$5 \cdot 10^{-9}$
PKC $\alpha$ -2Ca	$4,66 \cdot 10^{-7}$ [127]	$5 \cdot 10^{-9}$
Puffer	$2,0 \cdot 10^{-7}$ [128]	0
PS	0	$1 \cdot 10^{-9}$
DAG	0	$1 \cdot 10^{-9}$ [129]

Tabelle 4.2: Parameter des „Base-Case“, Teil I. Spezies-Konzentrationen und Diffusionsraten, die als Standardwerte zur Simulation der PKC-Membrantranslokationen benutzt werden.

Plasmamembran eine „echte“ Systemberandung darstellt. Dadurch wird gewährleistet, dass keine Teilchen das System nach außen verlassen. Die verwendeten Reaktionsraten und Diffusionskonstanten wurden, sofern sie bekannt sind, aus der Literatur entnommen (siehe Tabelle 4.2 und 4.3), und es wird angenommen, dass die zweidimensionale Diffusion in der Membran ca. um einen Faktor 10 kleiner ist, als die freie Diffusion im Zytosol. Bei der Systeminitialisierung werden die unterschiedlichen Spezies auf die verschiedenen Subvolumina und Raumbereiche aufgeteilt. Die Subvolumina der Membran werden mit jeweils einer homogenen Verteilung von sowohl PS- als auch DAG-Moleküle initialisiert. Die übrigen Spezies,  $\text{Ca}^{2+}$ , PKC $\alpha$  und der Calcium-Puffer werden homogen auf die Subvolumina des Zytosols verteilt. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  beginnt die Simulation mit dem lokalen Calcium Signal, das typischerweise eine Dauer von 0,5 s besitzt. Für diese Zeitspanne entstehen in dem Subvolumen, das mit der Calcium-Quelle initialisiert wurde, pro Millisekunde eine gewisse Anzahl an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Mittels des von mir entwickelten Monte-Carlo-Algorithmus wird das System bis zu dem Zeitpunkt  $t_{end}$  in der Zeit entwickelt. Für die Simulation des PKC $\alpha$ -Translokations Reaktions-Diffusions-Systems werden die in Tabelle 4.2 und 4.3 zu sehenden Standard- oder Base-Case-Parameter benutzt.

Reaktionsrate	Wert	Reaktionsrate	Wert
$\text{PKC}\alpha + 1\text{Ca} \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} \text{PKC}\alpha - 2\text{Ca}$			
$k_1$	$4 \cdot 10^8 \frac{1}{Ms} [53]$	$k_2$	$100 \frac{1}{s} [22]$
$k_{11}$	$4 \cdot 10^8 \frac{1}{Ms} [53]$	$k_{22}$	$100 \frac{1}{s} [22]$
$\text{Ca} + \text{Puffer} \xrightleftharpoons[k_4]{k_3} \text{Puffer} - \text{Ca}$			
$k_3$	$6 \cdot 10^6 \frac{1}{Ms}$ , siehe z.B. [12]	$k_4$	$0,0 \frac{1}{s}$
$\text{PKC}\alpha - 2\text{Ca} + \text{PS} \xrightleftharpoons[k_6]{k_5} \text{PKC}\alpha - 2\text{Ca} - \text{PS}$			
$k_5$	$6 \cdot 10^8 \frac{1}{Ms} [53]$	$k_6$	$140 \frac{1}{s} [22]$
$\text{PKC}\alpha - 2\text{Ca} - \text{PS} + \text{DAG} \xrightleftharpoons[k_8]{k_7} \text{PKC}\alpha - 2\text{Ca} - \text{PS} - \text{DAG}$			
$\text{PKC}\alpha - 2\text{Ca} - \text{PS} - \text{DAG} \xrightarrow{k_9} \text{„Instabil“} + \text{Ca}, \quad \text{„Instabil“} \xrightarrow{k_{10}} \text{PKC}\alpha + 2\text{Ca} + \text{PS} + \text{DAG}$			
$k_7$	$2,4 \cdot 10^6 \frac{1}{Ms} [130, 131]$	$k_{10}$	$10,0 \frac{1}{s}$
$k_8(0)$	$4 \frac{1}{s} [22, 52, 53, 55]$	$k_9(0)$	$0,001 \frac{1}{s}$
$k_8(1)$	$0,5 \frac{1}{s}$	$k_9(1)$	$0,001 \frac{1}{s}$
$k_8(2)$	$0,05 \frac{1}{s}$	$k_9(2)$	$0,001 \frac{1}{s}$
$k_8(3)$	$0,005 \frac{1}{s}$	$k_9(3)$	$0,001 \frac{1}{s}$
$k_8(4)$	$0,0 \frac{1}{s}$	$k_9(4)$	$0,001 \frac{1}{s}$

Tabelle 4.3: Parameter des „Base-Case“, Teil II. Reaktionsraten, die als Standardwerte zur Simulation der PKC-Membrantranslokationen benutzt werden.

## 4.3 Ergebnisse

### 4.3.1 Simulations-Ergebnisse

#### PKC-Translokationen des „naiven“ Reaktions-Diffusions Systems

Die numerische Simulation des PKC-Translokations Reaktions-Diffusions Systems wurde mit Hilfe des von mir entwickelten Gillespie-Monte-Carlo-Algorithmus (siehe Abschnitt 4.2.2) durchgeführt. Zunächst stelle ich hier die Ergebnisse einer Modellierung des „naiven“ PKC-Translokations-Systems vor. Mit *naiv* bezeichne ich hier das durch die Gleichungen 4.1-4.5 beschriebene Reaktions-Diffusions System, welches das in Abschnitt 2.2.2 dargestellte PKC-Aktivierungsschema ohne zusätzliche Modellannahmen repräsentieren soll.

Trotz zahlreicher Simulationen des Systems mit unterschiedlichsten Parameterwerten können mit Hilfe des Modells nur die kurz andauernden lokalen Translokationsereignisse (LTEs), also nur eine der beiden von Reither et. al [22] gefundenen LTE-Populationen, beobachtet werden. Wie in Abbildung 4.4 a) zu sehen, spiegeln die Membransignale der Translokationsereignisse jeweils nur die im Zytosol zugrunde liegenden Calcium-Signale wider. Man erkennt wie für die von mir vorgegebene Zeitspanne des Calcium-Signals von 0,5 Sekunden die zytosolische Calciumkonzentration ansteigt und nach Beendigung des Signals durch die mobilen Calcium-Puffer wieder aus dem System entfernt wird. Im Inset dieser Abbildung sind die korrespondierenden zeitlichen Verläufe der Membransignale dargestellt. Die durch Bindung zweier Calcium-Ionen aktivierten PKC-Komplexe translozieren an die Membran und binden dort via C1- und C2-Domäne an DAG bzw. PS. Die Membransignale erreichen kurz nach Ende des Calcium-Signals ihren Maximalwert und klingen dann recht schnell nach Ende des lokalen Calcium-Events wieder ab. Selbst für sehr starke Calcium-Signale von  $600 \text{ Ca}^{2+}/\text{ms}$  dauern die LTEs nicht länger als zwei Sekunden, wobei ich in Anlehnung an die experimentellen Ergebnisse von Reither et. al [22] immer die Zeit, nach der das Signal auf die Hälfte der Maximalstärke abgefallen ist als Signaldauer bezeichne. In den Teilen b)-d) der Abbildung ist die explizite Zeitentwicklung der in Teil a) gezeigten LTE-Signale an der Plasmamembran für die verschieden starke Calcium-Signale zu sehen. Aufgetragen ist dort die radiale Dichte der Summe aus via C1- und C2-Domäne membrangebundenen PKC-Proteine als Funktion der Zeit  $t$  und des Abstandes  $r$  von der Membranposition mit der kürzesten Distanz zur Calcium-Quelle. Man kann erkennen, dass sich das qualitative Aussehen der LTEs für die verschiedenen Calcium-Signalstärken nicht ändert. Das in Teil d) dieser Abbildung gezeigte Membransignal ist als Beispiel für einen typischen Vertreter der beobachteten LTEs für vier verschiedene Zeitpunkte nochmals explizit in Abbildung 4.5 dargestellt. Schon sehr früh nach Beginn der Calcium-Freisetzung kann zum Zeitpunkt  $t = 0,1 \text{ s}$  ein LTE-Signal an der Plasmamembran beobachtet werden, welches dann weiter ansteigt und kurz nach Ende des Calcium-Signals ( $0,5 \text{ s} < t < 0,8 \text{ s}$ ) seine maximale Signalstärke erreicht. Danach nimmt das Membransignal langsam wieder ab, und nach ca. zwei Sekunden ist die Signalstärke auf die Hälfte der Maximalstärke

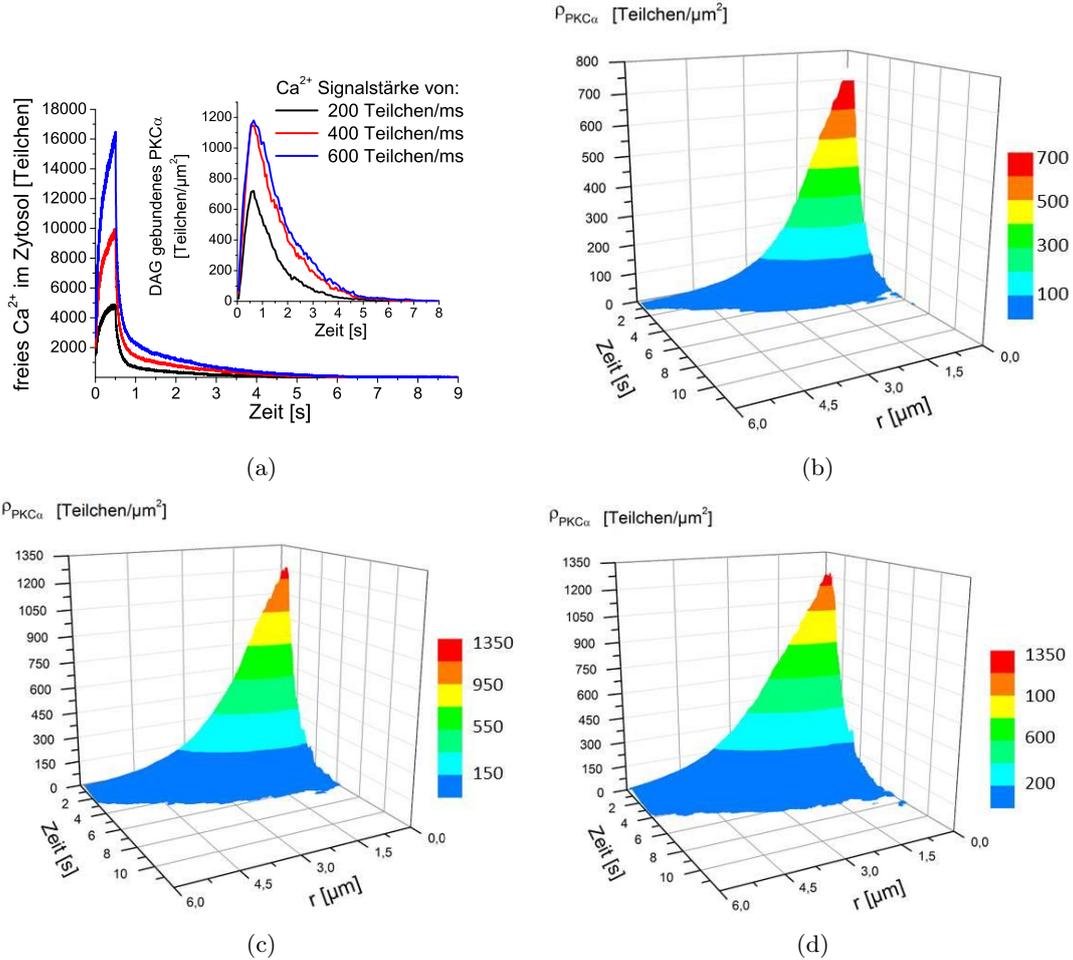


Abbildung 4.4: PKC-Membrantranslokationen ohne Annahme einer kooperativen Membranbindung. a) Zeitliche Entwicklung des freien zytosolischen Calciums für verschiedene Calcium-Signalstärken. Innere Abbildung: korrespondierende Verläufe des membrangebundenen PKC. b)-d) Radiale Dichte  $\rho_{PKC}(r, t)$  der via PS-DAG membrangebundenen PKC $\alpha$ -Proteine als Funktion der Zeit und des radialen Abstandes  $r$  von der Membranposition mit dem kürzesten Abstand zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Quelle. Für verschiedene Calcium-Signalstärken: b)  $200 \frac{\text{Ca}^{2+}}{\text{ms}}$  c)  $400 \frac{\text{Ca}^{2+}}{\text{ms}}$  d)  $600 \frac{\text{Ca}^{2+}}{\text{ms}}$ .

abgefallen. Nach ca. 2,5 Sekunden sind nur noch vereinzelte PKC-Proteine an der Plasmamembran zu detektieren, und die Signalstärke ist so klein, dass sie im Experiment wohl nicht nachgewiesen würde (vgl. mit der in Abbildung 4.4 d) dargestellten Teilchendichte). Somit sind die LTEs auch für starke Calcium-Signale von z.B. 600  $\text{Ca}^{2+}/\text{ms}$  nach spätestens zwei bis drei Sekunden beendet. Unabhängig von der Signalstärke, aber auch anderen System / Parameteränderungen kann nur die Population der „normalen“ oder

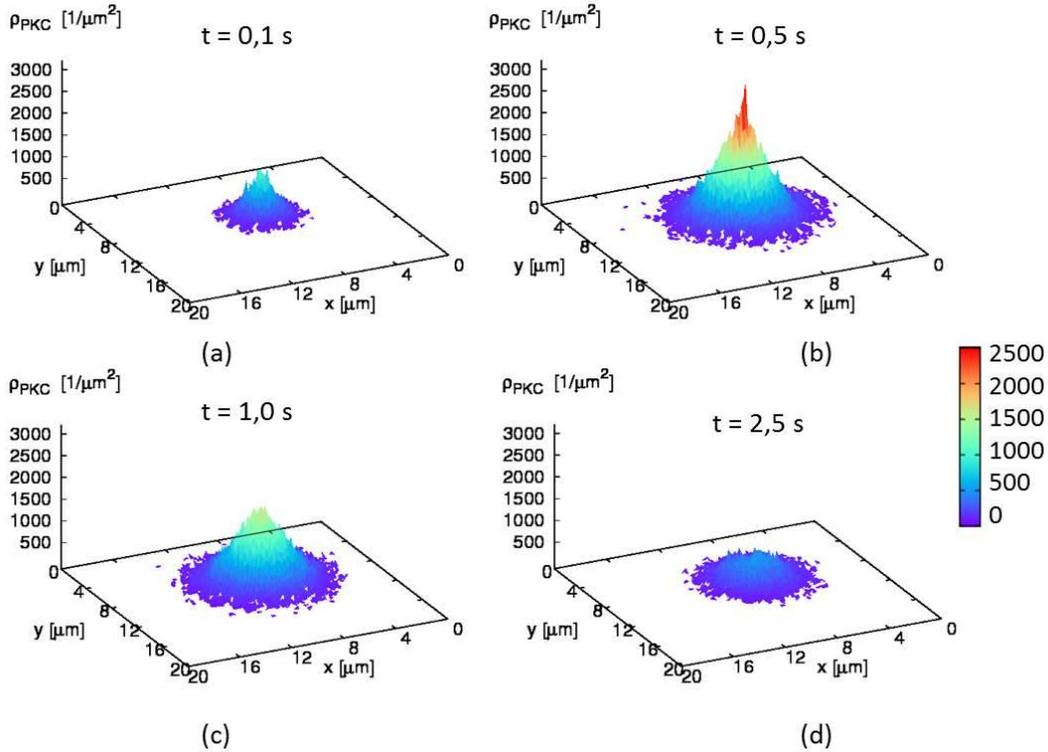


Abbildung 4.5: Zeitlicher Verlauf der LTE-Signale in der Plasmamembran zu verschiedenen Zeitpunkten für ein starkes zytosolisches Calcium-Signal von  $600 \frac{Ca^{2+}}{ms}$  (vgl. Abbildung 4.4). a) Die aktivierten PKC binden an die Membran,  $t = 0,1$  s. b) Die maximale Signalstärke ist nach  $t = 0,5$  s fast erreicht. c) Da das Calcium-Signal im Zytosol beendet ist, nimmt die Signalstärke ab,  $t = 1$  s. d) Das PKC-Signal an der Membran ist nach ca.  $t = 2,5$  s beendet.

kurz andauernden LTEs mit Hilfe des „naiven“ Modells gemessen werden. Es wurden Modellsimulationen mit i) erhöhten und erniedrigten Membranbinde- und Ablöseraten, ii) verschiedenen Positionen der Calcium-Quelle (Variation des z-Abstandes zur Membran, bis hin zu Abständen  $< 200$  nm), iii) veränderten Pufferkonzentrationen sowie iv) erhöhten / erniedrigten Diffusionskonstanten und v) erhöhten / erniedrigten Konzentrationen von PKC, PS und DAG durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Alle Simulationen, die diese Veränderungen berücksichtigen, zeigen qualitativ die gleichen Ergebnisse der LTE-Translokationsereignisse wie die in Abbildung 4.5 gezeigten Signalverläufe der Standard- oder Base-Case-Systemkonfiguration.

PKC-Translokationen unter Annahme einer kooperativen PKC-Membranbindung

Im Folgenden werden die Ergebnisse diskutiert, die mein Modell unter Annahme einer kooperativen Wechselwirkung der membrangebundenen PKC-Proteine sowie eines lawinenartigen Ablösens der via C1- und C2-Domäne gebundenen PKC-Komplexe voraussagt. Wie in Abbildung 4.6 a) zu sehen ist, können diese beiden in Kapitel 4.2.2 vorgestellten Modellerweiterungen die beiden unterschiedlichen von Reither et. al [22] beobachteten LTE-Populationen reproduzieren und - wie im folgenden erläutert wird - auch erklären.

Im Gegensatz zum „naiven“ System bilden sich durch die Wechselwirkung der via C1- und C2-Domäne gebundenen PKC-Proteine sehr große Cluster aus (siehe Abbildung 4.7). Die maximale Größe der PKC-Cluster ohne eine Wechselwirkung der PKC-Komplexe liegt im Bereich von ca. 100 Proteinen, wohingegen im Falle einer Wechselwirkung die Größe der Cluster im Bereich von ca. 1000-8000 Proteinen liegt. Die Größe der Cluster ist dabei von der Stärke des zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Signals abhängig und steigt linear mit ihr an. Die Umwandlung eines der PKC-Komplexe innerhalb eines Clusters wird durch Konformationsänderung verursacht und ist ein stochastischer Prozess (siehe Gleichung 4.22). Die Wahrscheinlichkeit für das Umwandeln eines beliebigen PKC-Komplexes innerhalb eines Clusters ist proportional zur Clustergröße und somit auch die Wahrscheinlichkeit für das anschließende lawinenartige Ablösen des Clusters von der Membran (siehe Gleichung 4.23-4.24).

Als Folge davon werden nun Membransignale / LTEs beobachtet wie sie als Beispiele in Abbildung 4.6 a) zu sehen sind. Je stärker das Calcium-Signal ist, desto mehr via C1- und C2-Domäne an PS und DAG gebundene PKC-Komplexe entstehen an der Membran, und desto größere Cluster bilden sich. Durch die kooperative Wechselwirkung der PKC-Proteine bildet sich eine Plateauphase im Membransignal aus, wie sie auch in den Experimenten von Reither et al. [22] sowohl für die Population der kurz als auch der lang andauernden LTEs gemessen wird. Diese Plateauphase endet mit dem abrupten Einbruch des Signals, der durch die in Gleichung 4.22-4.24 beschriebenen Prozesse aus einem lawinenartigen Ablösen der Proteine von der Membran resultiert. Aufgrund der stochastischen Natur der Prozesse kann es vorkommen, dass sich ein Cluster nach zwei Sekunden oder aber erst nach sechs Sekunden von der Membran ablöst, wie dies im Beispiel der LTE-Verläufe in Abbildung 4.6 a) zu sehen ist. Unter diesen Modellannahmen können die LTEs / Membransignale die Dauer der zytosolischen Calcium-Signale um mehr als das Zehnfache übersteigen. In den Teilen b)-d) der Abbildung ist die explizite Zeitentwicklung der in Teil a) gezeigten LTE-Signale an der Plasmamembran für verschieden starke Calcium-Signale zu sehen. Aufgetragen ist dort die radiale Dichte der Summe aus via C1- und C2-Domäne membrangebundenen PKC-Proteinen als Funktion der Zeit  $t$  und des Abstandes  $r$  von der Membranposition mit der kürzesten Distanz zur Calcium-Quelle.

Man kann erkennen, dass sich das Aussehen der LTEs nun im Gegensatz zu den Ergebnissen ohne Annahme einer Wechselwirkung ändert, und dass sich die drei in b)-d) gezeigten Signalverläufe stark voneinander unterscheiden. Die beiden in c) und d) dar-

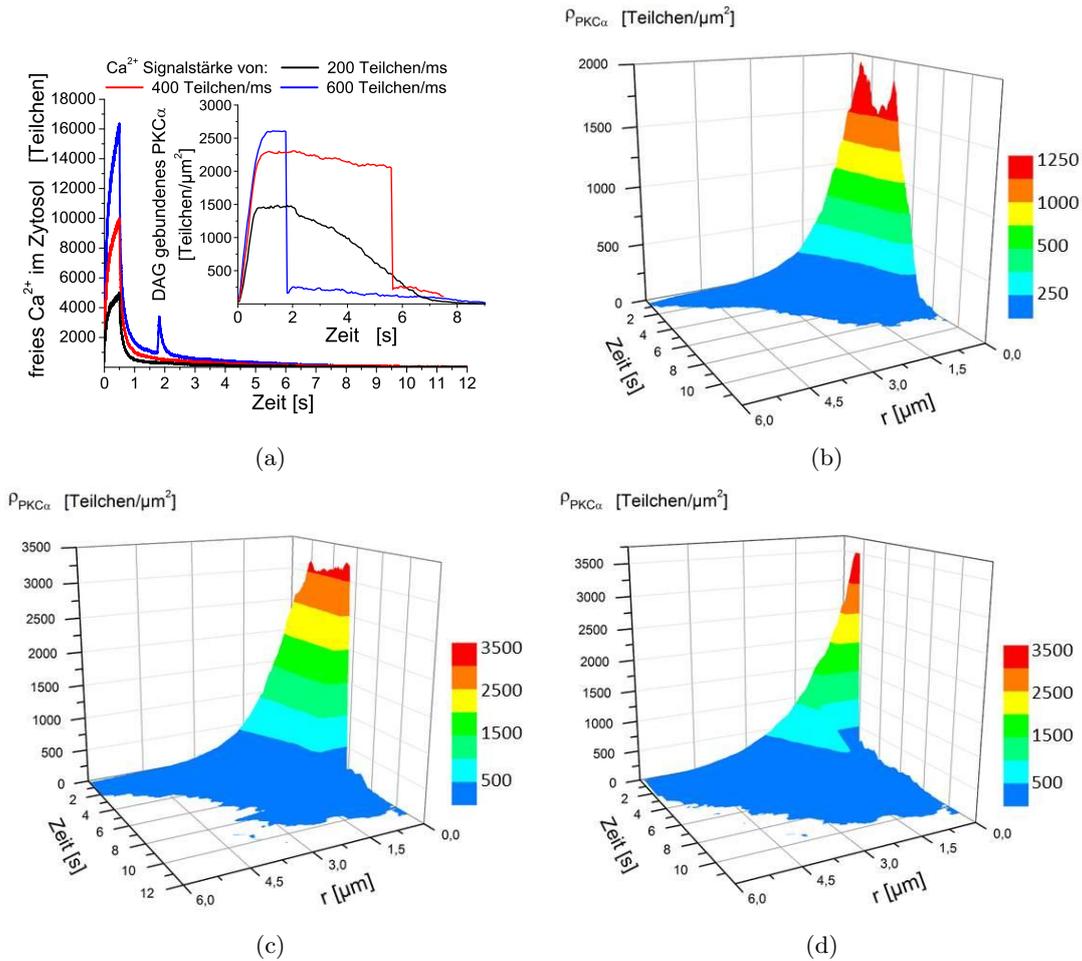


Abbildung 4.6: PKC-Membrantranslokationen unter Annahme einer kooperativen Membranbindung. a) Zeitliche Entwicklung des freien zytosolischen Calciums für verschiedene Calcium-Signalstärken. Innere Abbildung: korrespondierende Verläufe des membrangebundenen PKC. b)-d) Radiale Dichte  $\rho_{PKC}(r,t)$  der via PS-DAG membrangebundenen PKC $\alpha$ -Proteine als Funktion der Zeit und des radialen Abstandes  $r$  von der Membranposition mit dem kürzesten Abstand zur Ca $^{2+}$ -Quelle. Für verschiedene Calcium-Signalstärken: b)  $200 \frac{Ca^{2+}}{ms}$  c)  $400 \frac{Ca^{2+}}{ms}$  d)  $600 \frac{Ca^{2+}}{ms}$ .

gestellten Signale enden abrupt, das in b) gezeigte Membransignal „klingt langsam ab“. Die in b) und d) gezeigten Membransignale enden nach ca. zwei Sekunden und werden deshalb zur Population der kurz andauernden LTEs gezählt, wohingegen das in c) gezeigte Membransignal erst nach ca. sechs Sekunden endet und deshalb zu der Population der lang andauernden LTEs gehört. Man kann also schlussfolgern, dass starke Calcium-Signale und daraus resultierende große PKC-Membrancluster in Verbindung mit dem von uns als „Lawineneffekt“ bezeichneten Mechanismus sowohl kurze als auch lang an-

dauernde LTE-Ereignisse verursachen.

Beispiele für jeweils eine der beiden resultierenden LTE-Populationen sind in Abbildung 4.8 und 4.10 zu sehen. Den zwei unterschiedlichen LTE-Signalverläufen liegen jedoch die gleichen Systemparameter und die gleiche initiale Systemkonfiguration zugrunde. Die Stärke des Calcium-Signals beträgt in beiden Fällen  $600 \text{ Ca}^{2+}/\text{ms}$ . Die zwei Simulationen unterscheiden sich lediglich in der Wahl des sogenannten Anfangs-Seeds, also der Auswahl an Zufallszahlen innerhalb des Computeralgorithmus. Beide LTE-Populationen bilden zunächst ein großes und stabiles PKC-Cluster aus, das auch noch lange nach Ende des elementaren Calcium-Signals ( $t=0,5 \text{ s}$ ) vorhanden ist. Im ersten Fall (Abbildung 4.8) kommt es aufgrund der stochastischen / zufälligen Natur der Membranablösung von DAG-gebundenen PKC-Proteinen und der damit einhergehenden übergreifenden Ablösung nächster Nachbarn im PKC-Membrancluster bereits nach ca. 2,5 Sekunden zum Ende des Membransignals. Im Gegensatz dazu dauert das in Abbildung 4.10 dargestellte Membransignal ungefähr elf Sekunden; dies ist ein gutes Beispiel für ein lang andauerndes LTE-Ereignis. Auffällig ist, dass die räumliche Ausdehnung beider Membransignale im Laufe der Zeit nicht weiter zunimmt, sondern relativ konstant bleibt bzw. sogar ein wenig abnimmt. Dieses Ergebnis sowie die in Abbildung 4.9 gezeigte Verteilung der Signaldauer als Funktion der Signalstärke stimmen sehr gut mit den experimentellen Resultaten [22] überein.

Wie in Abbildung 4.9 zu sehen, sagt das Modell voraus, dass eine kooperative Wechselwirkung der PKC-Proteine innerhalb der Membran existieren muss, um die beiden LTE-Populationen erklären zu können. Nur in diesen Fällen stimmt die per Simulation bestimmte Verteilung der LTE-Signaldauern mit der im Experiment gefundenen Verteilung überein (siehe Abbildung 4.9). Man erkennt hier, dass für kleine, aus schwa-

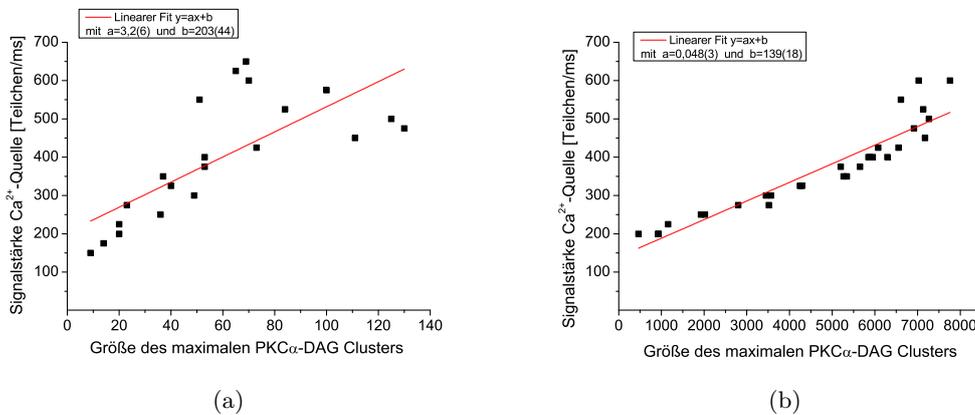


Abbildung 4.7: Entwicklung der maximalen PKC-Clustergröße als Funktion der zugrunde liegenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Quellstärke. a) Simulationen ohne Annahme einer Wechselwirkung zwischen membrangebundenen Proteinen. b) Clustergrößen unter Annahmen einer kooperativen Wechselwirkung der PS-DAG gebundenen PKC-Proteine.

chen zytosolischen Calcium-Signalen resultierenden Membransignalstärken nur kurz andauernde LTEs gemessen werden können. Für starke Membransignalstärken können jedoch sowohl kurz andauernde als auch lang andauernde LTEs beobachtet werden. Auch unter Annahme der kooperativen Wechselwirkung sind die Resultate gegenüber Parameter- und Systemkonfigurationsänderungen sehr stabil. Es wurden Modellsimulationen mit i) erhöhten und erniedrigten Membranbinde- und Ablöseraten, ii) verschiedenen Positionen der Calcium-Quelle (Variation des z-Abstandes zur Membran, bis hin zu Abständen  $< 200$  nm), iii) veränderten Pufferkonzentrationen sowie iv) erhöhten / erniedrigten Diffusionskonstanten und v) erhöhten / erniedrigten Konzentrationen von PKC, PS und DAG durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Alle Simulationen, die die

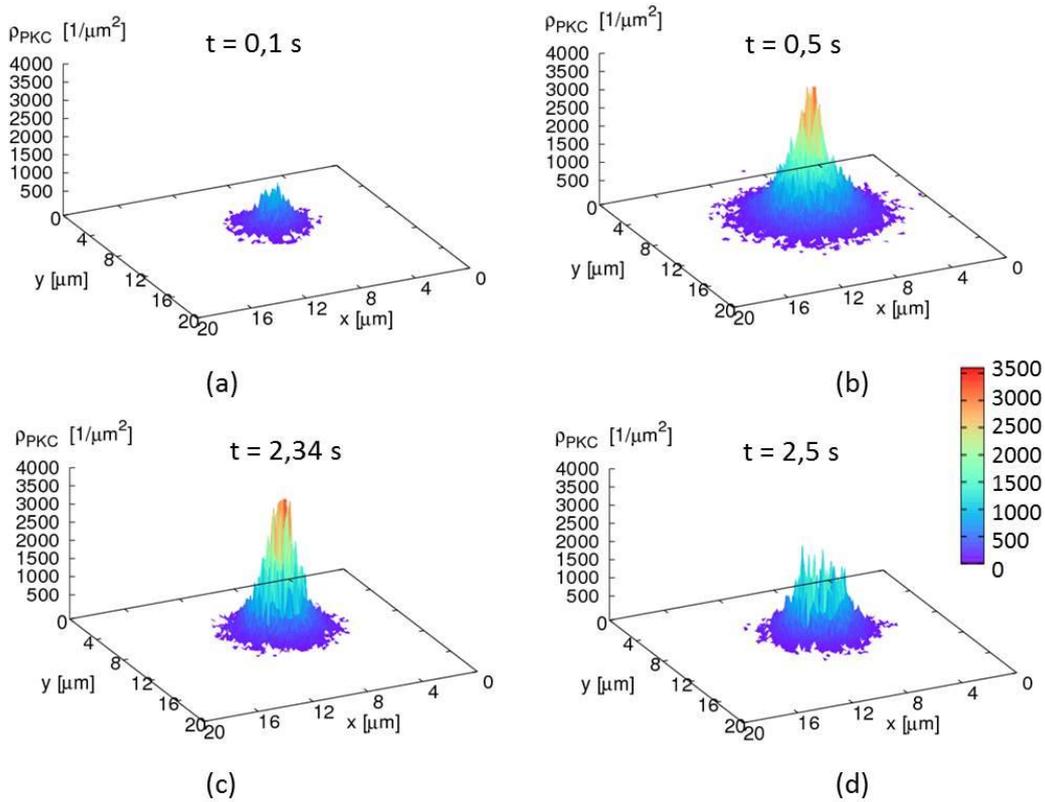


Abbildung 4.8: Zeitlicher Verlauf eines kurz andauernden LTE-Signals. Ein zur Population der kurz andauernden LTEs gehöriges Membransignal für verschiedene Zeiten. Bis zum Zeitpunkt  $t = 0,5$  s ist ein starkes zytosolisches Calcium-Signal von  $600 \frac{Ca^{2+}}{ms}$  vorhanden (vgl. Abbildung 4.6). a) Die aktivierten PKC binden an die Membran,  $t = 0,1$  s. b) Die maximale Signalstärke ist nach  $t = 0,5$  s fast erreicht. c) Das Calcium-Signal im Zytosol ist beendet, der PKC-Cluster ist jedoch aufgrund der kooperativen Bindung weiterhin stabil,  $t = 2,34$  s. d) Nach ca.  $t = 2,5$  s setzt die lawinenartige Membranablösung der PKC ein.

se Veränderungen berücksichtigen, zeigen qualitativ die gleichen Ergebnisse der LTE-Translokationsereignisse wie die in Abbildung 4.6 gezeigten LTEs oder Signalverläufe.

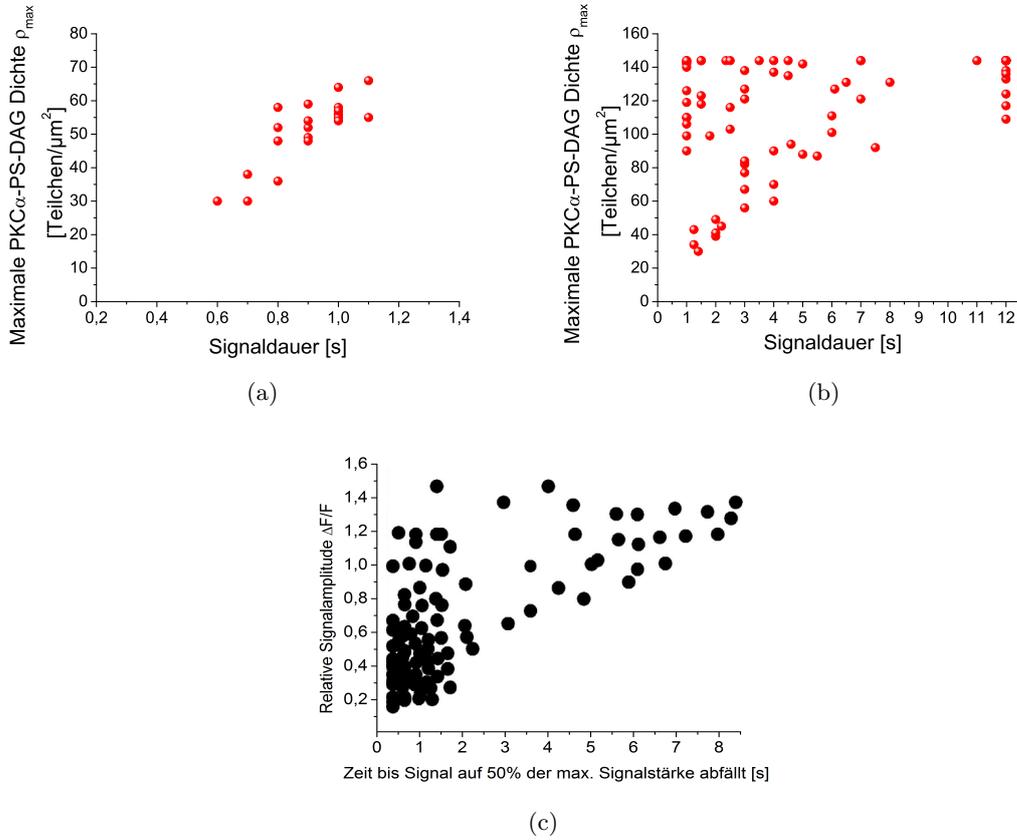


Abbildung 4.9: Verteilung der Membran-Signaldauer. a) Signaldauer der lokalen Translokationsevents (LTEs) in Abhängigkeit der maximalen Teilchenanzahl pro Membran-Subvolumen (Größe von  $l^2 = 0,04 \mu m^2$ ) für Simulationen des „naiven“ Reaktionsschemas ohne Wechselwirkung. b) Signaldauer der LTEs für Simulationen unter Annahme einer kooperativen Wechselwirkung der PKC-Proteine innerhalb der Membran. c) Zum Vergleich der Simulationsergebnisse sind hier die experimentellen Ergebnisse gezeigt (Daten entnommen aus [22]).

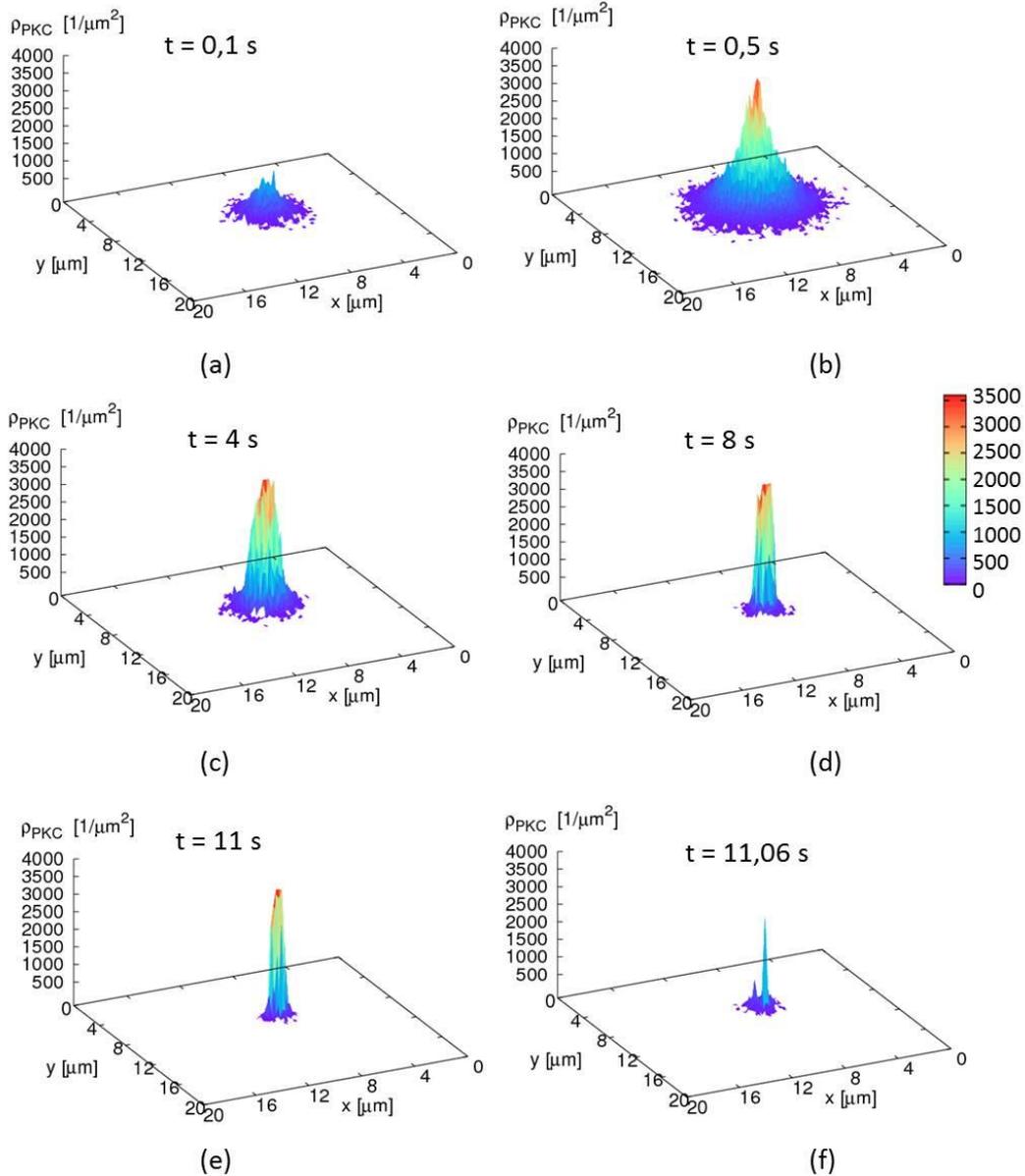


Abbildung 4.10: Zeitlicher Verlauf eines lang andauernden LTE-Signals. Ein zur Population der lang andauernden LTEs gehöriges Membransignal für verschiedene Zeiten. Bis zum Zeitpunkt  $t = 0,5$  s ist ein starkes zytosolisches Calcium-Signal von  $600 \frac{Ca^{2+}}{m.s}$  vorhanden (vgl. Abbildung 4.6). a) Die aktivierten PKC binden an die Membran,  $t = 0,1$  s. b) Die maximale Signalstärke ist nach  $t = 0,5$  s fast erreicht. c)+d) Das Calcium-Signal im Zytosol ist beendet, der PKC-Cluster ist jedoch aufgrund der kooperativen Bindung weiterhin stabil,  $t = 4$  s bzw  $t = 8$  s. e) Noch kurz vor Ende des Membransignals ist der PKC-Cluster stabil. f) Nach ca.  $t = 11,06$  s setzt die lawinenartige Membranablösung der PKC ein.

#### 4.3.2 Experimenteller Nachweis einer möglichen Wechselwirkung der membrangebundenen PKC $\alpha$ -Proteine

Die theoretischen Ergebnisse des vorigen Abschnitts 4.3.1 geben unter Annahme einer kooperativen Bindung der PKC-Proteine sowohl die experimentell beobachteten LTE-Populationen als auch die Verteilung der Signaldauer in Abhängigkeit der relativen Signalamplitude richtig wieder. Um einen Hinweis einer möglichen Interaktion der membrangebundenen PKC $\alpha$ -Komplexe zu finden, habe ich in Kooperation mit Mike Bonny am Lehrstuhl von Prof. Peter Lipp an der Universitätsklinik Homburg FRET-Messungen (siehe Anhang A.1) mit Zellen durchgeführt, die sowohl YFP<sup>17</sup>-markiertes PKC als auch CFP<sup>18</sup>-markiertes PKC exprimieren.

Die Messungen wurden analog zu dem für die Referenzmessungen im Anhang beschriebenen Ablauf vorgenommen und ausgewertet. Der Probe mit Zellkultur wird 1  $\mu$ M PMA<sup>19</sup> hinzugegeben. Um sicherzustellen, dass das zytosolische PKC aktiviert wurde und zur Zellplasmamembran transloziert ist, muss eine Wartezeit von 15 – 30 min eingehalten werden. Im Anschluss daran wird zum Zeitpunkt  $t = 0$  eine erste Aufnahme der YFP-Intensität (200 ms Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 510 nm) und CFP-Intensität (250 ms Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 417 nm) aufgenommen. Darauf folgt das Photobleichen des Akzeptors YFP durch eine 60 Sekunden lange Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 519 nm. Auch hier wechseln sich noch 15 mal die Bildaufnahme und das Photobleichen ab. Die Auswertung der Daten erfolgt mit Hilfe der Software ImageJ [132]. Das Photobleichen des Akzeptors YFP führt dazu, dass der YFP-Farbstoff seine Fähigkeit zur Fluoreszenz verliert, weniger stark leuchtet, und somit der Energietransfer von CFP auf YFP nicht mehr erfolgen kann. Haben sich die beiden Fluophore YFP und CFP zuvor in einem Abstand  $< 10$  nm befunden (Hinweis auf eine Interaktion), so wird der Förster-Resonanzenergietransfer unterdrückt, und dies wiederum geht einher mit der Zunahme der Strahlungsintensität des Donors CFP. Eine zeitliche Abfolge von Bildern der Strahlungsintensität des Akzeptors YFP ist in Abbildung 4.11 bzw. des Donors CFP in Abbildung 4.12 zu sehen. Zur besseren Visualisierung wurden die Zellen künstlich cyan bzw. gelb eingefärbt. Wie man deutlich erkennen kann, nimmt die Intensität des Akzeptors YFP aufgrund des Bleichens mit der Zeit stark ab (siehe Abbildung 4.11 und 4.13(c)). Im Gegensatz dazu nimmt die Intensität des Donors mit der Zeit zu, was auf das Vorhandensein eines FRET-Signals und somit eine Wechselwirkung der membrangebundenen PKC-Proteine hindeutet (siehe Abbildung 4.12 und 4.13(c)).

Da solch eindeutige Messresultate, wie in Abbildung 4.11-4.13, nur in ca. 50% der Messungen zustande kamen, und in den restlichen 50% der Messungen keine zuverlässige Aussage getroffen werden konnte, können diese Experimente lediglich als ein **Hinweis** für eine Wechselwirkung der membrangebundenen PKC-Moleküle angesehen werden. Einen wirklichen Beweis für eine Wechselwirkung der membrangebundenen PKC-Moleküle, die

---

<sup>17</sup>Yellow Fluorescent Protein = gelb fluoreszierendes Protein

<sup>18</sup>Cyan Fluorescent Protein = cyan/grün fluoreszierendes Protein

<sup>19</sup>Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) ist ein Phorbolster der die PKC Membrantranslokation aktiviert und in Experimenten DAG ersetzt.

im Simulationsmodell das Auftreten der beiden LTE-Populationen erklärt, liefern diese FRET-Messungen leider nicht.

## 4.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wird ein Modell präsentiert, das sich zur Studie der lokalen Translokationsereignisse (LTEs) von Proteinkinase C eignet. Zur Simulation dieser durch elementare Calcium-Signale hervorgerufenen LTEs wird ein von mir entwickelter Monte-Carlo Algorithmus in 3D verwendet. Der Algorithmus ist eine Erweiterung der „Next Subvolume Method“ [118] und eignet sich ausgezeichnet um Reaktion-Diffusions Systeme in großen Geometrien und gleichzeitigem Vorhandensein einer Nächsten-Nachbar-Wechselwirkung zu untersuchen.

Um die zwei unterschiedlichen LTE-Populationen zu erklären, die von von Reither et al. [22] experimentell beobachtet wurden, sagt das Modell eine kooperative Wechselwirkung der PKC-Proteine voraus. Dieser kooperative Effekt zwischen den an der Plasmamembran via C1- und C2-Domäne gebunden PKC führt zu einer Herabsetzung der Membranablösezeiten und somit zu einer Stabilisierung der PKC-Membrankomplexe. Es kommt zur Ausbildung von PKC-Clustern an der Membran, die auch noch lange nach Ende der elementaren, zytosolischen Calcium-Signale existieren können. Eine weitere Modellannahme, die benötigt wird um die beiden LTE-Populationen erklären zu können, ist der als „Lawineneffekt“ bezeichnete Mechanismus. Dies ist ein stochastischer Prozess, der das zufällige Ablösen eines Calcium-Ions von einem PKC-Membrankomplex und den dadurch ausgeübten mechanischen Stress bezeichnet, der durch eine Konformationsänderung hervorgerufen wird. Lawinenartig breitet sich dieser mechanische Stress auf benachbarte PKC-Komplexe aus und lässt diese in einen sehr instabilen Zustand mit kurzen Membranlebenszeiten übergehen.

Die gleichzeitige Annahme einer kooperativen Wechselwirkung und des als „Lawineneffekt“ bezeichneten Mechanismus gibt alle im Experiment [22] gefundenen LTE-Charakteristika richtig wieder. Dazu zählen z.B die Plateauphase des Membransignals für Zeiten, die die Lebensdauer der zugrunde liegenden Calcium-Signale übersteigen ( $t > 1$  Sekunde), die begrenzte räumliche Ausdehnung der beiden LTE-Populationen sowie die Verteilung der Signaldauer als Funktion der Signalstärke.

Um die Modellvorhersage einer kooperativen Wechselwirkung der PKC-Proteine innerhalb der Membran zu bestätigen, wurden von mir in Kooperation mit Mike Bonny am Lehrstuhl von Prof. Peter Lipp in Homburg sogenannte FRET-Messungen durchgeführt. Diese Fluoreszenzmikroskopie-Experimente liefern zwar Hinweise darauf, dass die Hypothese einer Wechselwirkung richtig ist, sind aber statistisch nicht aussagekräftig genug, um sie als Beweis für eine solche Wechselwirkung verwenden zu können.

---

<sup>20</sup>Region of Interest, englisch für: Zielbereich oder interessierende Region.

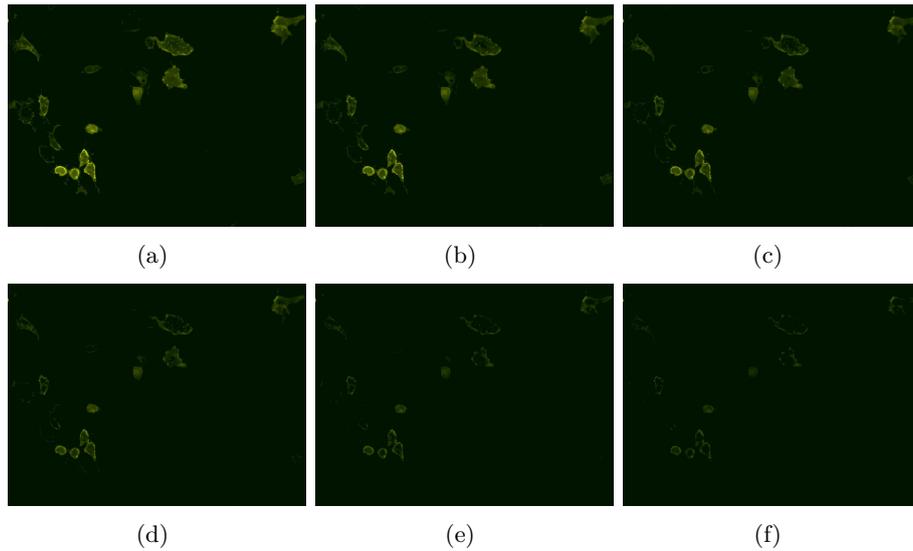


Abbildung 4.11: Zeitliche Entwicklung der Strahlungsintensität des Akzeptors YFP. Die Zellen werden dazu jeweils 60 Sekunden lang photogeblichen, bevor zu folgenden Zeiten eine Aufnahme der YFP-Strahlungsintensität erfolgt:

a) 0 min b) 3 min c) 5 min d) 8 min e) 12 min und f) 15 min.

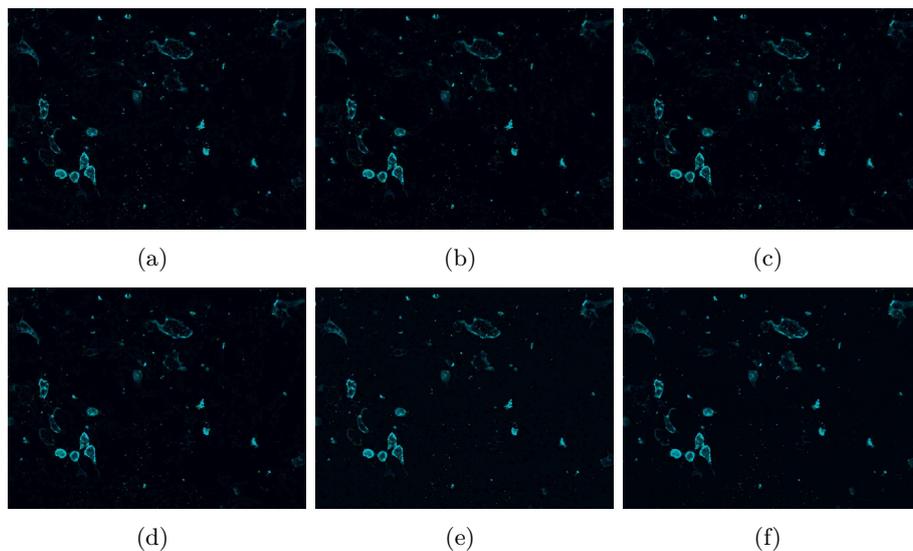


Abbildung 4.12: Zeitliche Entwicklung der Strahlungsintensität des Donors CFP. Die Zellen werden dazu jeweils 60 Sekunden lang photogeblichen, bevor zu folgenden Zeiten eine Aufnahme der CFP-Strahlungsintensität erfolgt:

a) 0 min b) 3 min c) 5 min d) 8 min e) 12 min und f) 15 min.

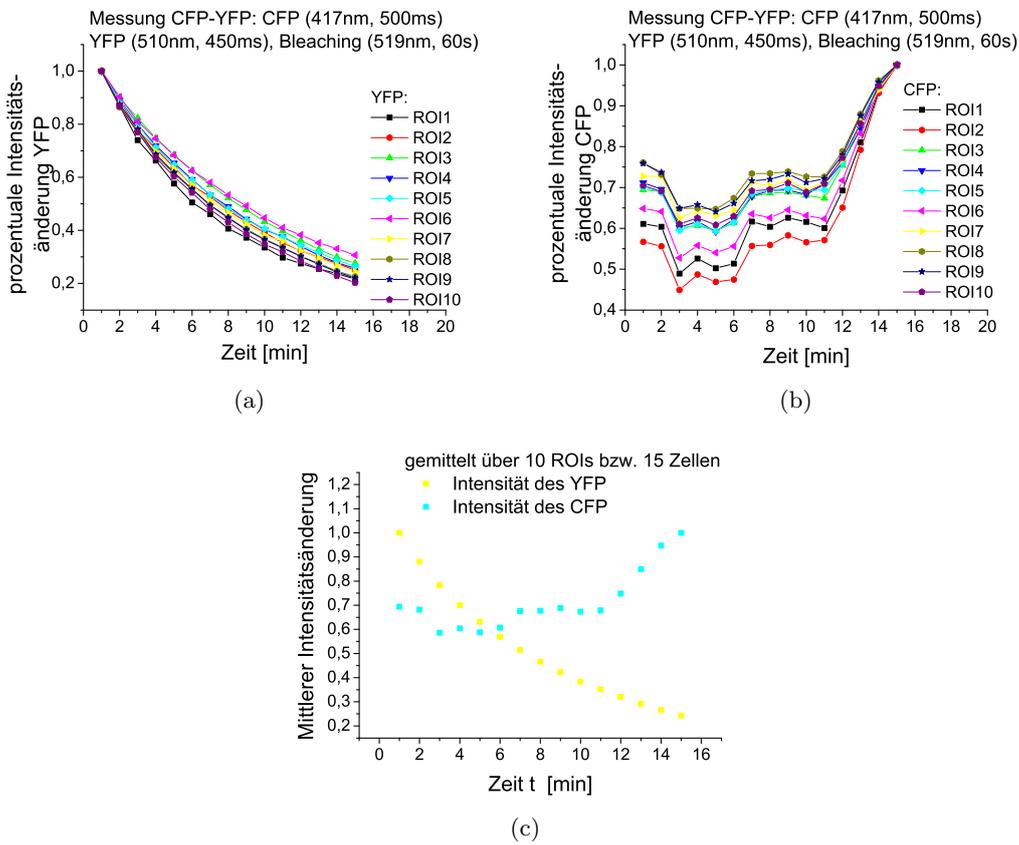


Abbildung 4.13: Dargestellt ist die zeitliche Veränderung der Strahlungsintensität. a) Strahlungsintensität des YFP-Farbstoffes für verschiedene ROIs<sup>20</sup>(siehe Anhang A.1). b) Strahlungsintensität des CFP-Farbstoffes für verschiedene ROIs. c) Zeitlicher Verlauf der Strahlungsintensität der YFP- und CFP-Fluophore, jeweils gemittelt über die unterschiedlichen Raumbereiche aus a) und b).



# Kapitel 5

## Formation des CRAC-Kanals

### 5.1 Einleitung und Motivation

Der Orai1- oder CRAC- (Calcium release-activated Calcium<sup>21</sup>) Kanal ist einer der wichtigsten Vertreter der speichergesteuerten Calcium-Kanäle. Seine Aktivierung beruht auf der Entleerung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und führt zu einem starken extrazellulären Calcium-Einstrom in das Zellinnere. Die Zusammenhänge zwischen Calcium-Signalgebung und der CRAC-Kanal-Bildung werden in Kapitel 2 ausführlich am Beispiel der T-Zell-Aktivierung erläutert. Gerade bei T-Zellen, die für die Ausübung ihrer Aufgaben bei der menschlichen Immunabwehr ein starkes und robustes Calciumsignal benötigen, ist der CRAC-Kanal die Haupteinstromquelle für extrazelluläres Calcium ins Zytosol [92, 93]. Der nach der Entleerung des ER einsetzende  $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  Strom  $I_{\text{CRAC}}$  kontrolliert verschiedene Zellfunktionen wie Proliferation oder Apoptosis [133]. Darüber hinaus steuert er beispielsweise im Falle der T-Zellen die kontrollierte Tötung antigenpräsentierender Zellen [134]. Die Bedeutung des CRAC-Stroms  $I_{\text{CRAC}}$  für die Immunabwehr wird im Fall von solchen Immunkrankheiten ganz deutlich, bei denen die Betroffenen an einer Störung des speichergesteuerten Calcium-Einstroms leiden [24].

Der CRAC-Kanal, der für diesen Strom  $I_{\text{CRAC}}$  verantwortlich ist, wird durch die beiden Proteine STIM1 und Orai1 gebildet [89–91]. Die genaue Abläufe und Prozesse, die mit Entleerung des ER beginnen und die die Bildung und Öffnung des Orai1 / STIM1-Kanals als Resultat haben, werden in Abschnitt 2.4.1 ausführlich dargestellt. Aufgrund der immens wichtigen Funktion des CRAC-Kanals für die Immunabwehr habe ich ein stochastisches Modell entwickelt, das zur Untersuchung der CRAC-Kanal-Cluster

---

<sup>21</sup>Calcium release-activated Calcium ist englisch für: Calcium Freisetzung aktiviert Calcium.

Bildung und dem daraus resultierenden Calcium-Strom  $I_{\text{CRAC}}$  dient. Die für die Modellbildung maßgeblichen Schritte der STIM1-Orai1 Interaktion werden im folgenden Abschnitt 5.2 noch einmal wiederholt. Sie wurden bereits ausführlich in Abschnitt 2.4 dargestellt.

Das von mir entwickelte Modell wird zum einen dazu verwendet, um physikalische Aspekte zu studieren bzw. zu erklären. Dazu zählen zum Beispiel die Fragen: i) wie sieht ein mögliches Reaktions-Schema aus, das die experimentell gemessenen CRAC-Ströme  $I_{\text{CRAC}}$  erklärt? ii) gibt es eine Kooperativität der STIM1/Orai1-Wechselwirkung? iii) gibt es Parameterwerte, die zu Oszillationen im Strom führen? oder aber iv) welche Auswirkungen hat eine Annahme von in der Zellmembran diffundierenden Orai1-Tetrameren bzw. Orai1-Hexameren auf den gemessenen Strom? Zum anderen kann das Modell dazu verwendet werden, um das Verhalten einer STIM1-Mutante zu erklären, die von Kilch et al. [26] als DQ-Mutante bezeichnet wird, und die den CRAC-Strom  $I_{\text{CRAC}}$  in Zellen maßgeblich verändert. Die DQ-Mutante zeichnet sich dadurch aus, dass sie es schafft, das STIM1/Orai1 Verhältnis hin zum optimalen Wert von 8:1 zu verschieben und gleichzeitig sehr hohe Ströme  $I_{\text{CRAC}}$  hervorzurufen. Daneben findet man für die DQ-Mutante im Experiment aber auch bei einem suboptimalen STIM1/Orai1 Verhältnis sehr hohe Ströme  $I_{\text{CRAC}}$ , wie sie für den STIM1-Wildtypen<sup>22</sup> bei äquivalentem Verhältnis an STIM1/Orai1 nicht zu beobachten sind.

In den folgenden Abschnitten dieses Kapitels wird zunächst das 2D-Modell erläutert, welches im Prinzip auf der im vorigen Kapitel 3 beschriebenen NSM-Methode basiert. Es wird eine Standardkonfiguration bzw. Base-Case Szenario definiert, mit dessen Hilfe die CRAC-Kanal-Formation und die resultierenden Ströme  $I_{\text{CRAC}}$  studiert werden. Im Anschluss daran werden zwei Erweiterungen des Modells vorgestellt, um die Auswirkungen möglicher Abweichungen der Reaktionsabläufe vom Base-Case Szenario zu untersuchen. Im letzten Abschnitt dieses Kapitels werden schließlich die Ergebnisse des Modells für die verschiedenen Bedingungen und Annahmen präsentiert. Große Teile der hier vorgestellten Ergebnisse wurden bereits in zwei Peer-Review Artikeln veröffentlicht [26, 31].

## 5.2 Stochastisches Reaktions-Diffusions Modell

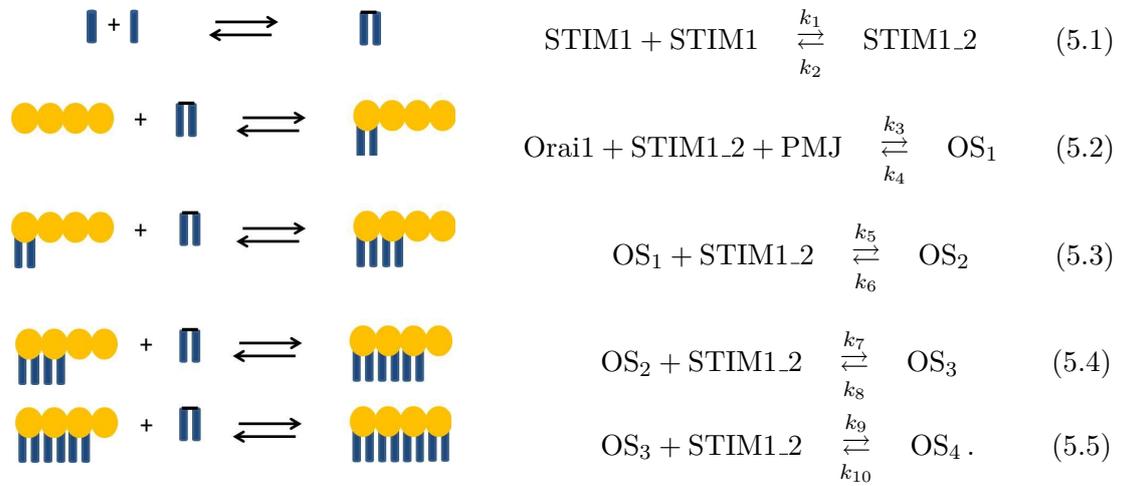
Der speichergesteuerte CRAC-Kanal wird durch die Wechselwirkung der beiden Proteine STIM1 und Orai1 gebildet. Wie gezeigt wurde genügt eine direkte Wechselwirkung der beiden Proteine, um den Orai1-Kanal zu öffnen [89–91]. Der Signalweg des STIM1-Proteins von der ER-Membran hin zur Zellmembran, der für lokale Calcium-Signale und einen hohen zytosolischen Calcium-Gradienten verantwortlich ist, kann in vier Schritte unterteilt werden [102] (siehe Abschnitt 2.4.1 und Abbildung 2.8). STIM1 befindet sich in der ER-Membran und beginnt nach der Calcium-induzierten Calcium-Freisetzung und Entleerung des ER zu dimerisieren bzw. zu oligomerisieren [99]. Der

---

<sup>22</sup>Als Wildtyp wird in der Genetik ein Lebewesen bezeichnet, dessen Genom in einem Zustand vorliegt, wie er natürlicherweise durch die Evolution entstanden ist.

Oligomerisations-Prozess dauert ca. fünf Sekunden [102] und wird von einer Diffusion der STIM1-Dimere / STIM1-Oligomere zur Plasmamembran (PM) gefolgt. An den Plasmamembran-Junctions, das sind Stellen, an denen der Abstand zwischen ER und Zellmembran kleiner als ca. 20 Nanometer ist [101], fangen STIM1-Dimere die in der Zellmembran diffundierenden Orai1-Proteine ein, die in diesem Stadium als Tetramere in der Zellmembran vorherrschen [135]. Diese Wechselwirkung führt zu der Bildung des Orai1-Kanals, der dann einen direkten Calcium-Einstrom aus dem extrazellulären Raum in das Zellinnere einleitet.

Um die Bildung der Orai1 / CRAC-Kanal Cluster und den daraus resultierenden Calcium-Strom zu untersuchen, habe ich ein stochastisches 2D-Modell entwickelt. Bei meiner Modellierung nehme ich einen bereits entleerten Calciumspeicher (ER) an und beschreibe die Schritte zwei bis vier des STIM1 ER-zur-PM Signalwegs (siehe Abschnitt 2.4.1 und Abbildung 2.8) durch das folgende Reaktions-Schema:



Die Gleichung 5.1 repräsentiert hierbei die STIM1-Dimerisation, wobei die STIM1-Dimere durch die Bezeichnung STIM1<sub>2</sub> charakterisiert werden. Gleichung 5.2 repräsentiert das Einfangen und Binden eines STIM1-Dimers an einen Orai1-Tetramer, woraus ein erster offener CRAC-Kanal-Zustand OS<sub>1</sub> resultiert. Das Binden eines STIM1-Dimers an einen Orai1-Tetramer ist genauso wie die in Gleichungen 5.3-5.5 gezeigten Prozesse nur an der Plasmamembran-Junction (PMJ) möglich. Durch weitere STIM1-Rekrutierung an einen bereits existierenden CRAC-Kanal-Zustand OS<sub>n</sub> entsteht ein Kanal-Zustand OS<sub>n+1</sub> ( $n = 1, 2, 3$ ), der sich durch eine höhere Kapazität auszeichnet. Da es in Abhängigkeit von der Anzahl an STIM1-Dimeren, die an die Orai1-Tetramere gebunden sind, zu abgestuften Kanal-Strömen [25, 104] kommt, tragen in meinem Modell die vier Kanal-Zustände in folgender Weise zum Gesamtstrom I<sub>CRAC</sub> bei:

$$I_{\text{CRAC}} = 0,001 \cdot \text{OS}_1 + 0,025 \cdot \text{OS}_2 + 0,275 \cdot \text{OS}_3 + 1,0 \cdot \text{OS}_4. \quad (5.6)$$

Bei den Reaktionsraten sind weder die On-Raten (Bindungsraten)  $k_3$ ,  $k_5$ ,  $k_7$ , und  $k_9$ , noch die Off-Raten (Ablöseraten)  $k_4$ ,  $k_6$ ,  $k_8$ , und  $k_{10}$  unabhängig voneinander gewählt. Vielmehr nehmen ich in dem Base-Case Szenario eine negative Kooperativität der On-

und Off-Raten an. Für die On-Raten bedeutet dies, dass eine STIM1-Dimer an Orai1-Tetramer Bindung umso weniger wahrscheinlich ist, je mehr STIM1-Dimere bereits an den Orai1-Tetramer gebunden sind. Für die Off-Raten hat die negative Kooperativität zur Folge, dass die Kanal-Zustände umso stabiler sind, je mehr STIM1-Dimere bereits an der Kanalbildung beteiligt sind. Die Annahme der Kooperativität wird durch die Kooperativitäts-Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$

$$k_{2n+3} = \alpha^n \cdot k_3, \quad k_{2n+4} = \beta^n \cdot k_4 \quad \text{für } n \in \{0, 1, 2, 3\} \quad (5.7)$$

widergespiegelt, wobei negative Kooperativität bedeutet, dass  $0 < \alpha, \beta < 1$  ist. Die STIM1-Monomere und STIM1-Dimere diffundieren auf der ER-Membran-Oberfläche, die Orai1-Tetramere in der Plasmamembran und die CRAC-Kanäle OS<sub>1</sub> - OS<sub>4</sub> sowie die PMJ werden als immobil angenommen. Die Diffusion der drei Spezies STIM1, STIM1.2 und Orai1 bildet zusammen mit den Reaktionen aus den Gleichungen 5.1-5.5 ein Reaktions-Diffusions System, das mit Hilfe einer zweidimensionalen Version des in Abschnitt 4.2.2 vorgestellten Monte-Carlo-Algorithmus modelliert wird. Innerhalb dieses stochastischen Algorithmus wird die Diffusion als Random Walk beschrieben, und Diffusionsprozesse werden als Reaktionen mit Reaktionsraten  $d_i = D_i/\Delta x$  aufgefasst, wobei  $i \in \{\text{STIM1}, \text{STIM1.2}, \text{Orai1}\}$  ist.

#### „Base-Case“ - oder Standard-Konfiguration

Die Bildung des CRAC-Kanals bzw. der CRAC-Kanal Cluster kann als ein lokaler Prozess bezeichnet werden, da die Rekrutierungslänge von STIM1-Oligomeren an spezielle Plasmamembran-Junctions, sehr gering ist [102]. Mit Kenntnis der Diffusionskonstanten  $D_{STIM1} = 0,05 - 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$  von STIM1 bzw. STIM1.2 sowie der Zeitspanne bis die STIM1-Oligomere die PMJ erreichen ( $t \approx 40$  s) lässt sich die mittlere Rekrutierungslänge der STIM1-Oligomere zu  $\langle x_{recruit} \rangle = (4Dt/\pi)^{1/2} = 1,6 - 2,3 \mu\text{m}$  abschätzen [103]. Aus diesem Grund modelliere ich eine Fläche von  $15 \cdot 15$  Gitterplätzen, wobei jede dieser Gitterzellen eine Fläche von  $(\Delta x)^2 = (0,2 \mu\text{m})^2$  besitzt. Diese  $9 \mu\text{m}^2$  große Fläche präsentiert gleichzeitig die ER-Membran-Oberfläche auf der die STIM1-Proteine diffundieren sowie die Zellplasmamembran in der die Orai1-Tetramere diffundieren.

Die Gitterzelle genau in der Mitte dieser Geometrie stellt die Plasmamembran-Junction (PMJ) dar (siehe Abbildung 5.1). Ich nehme periodische Randbedingungen für die Diffusion der STIM1, STIM1.2 und Orai1 an und beschränke die STIM1-Orai1 Interaktion (Reaktionen / Gleichungen 5.2-5.5) auf die PMJ-Gitterzelle. An der PMJ können die STIM1-Dimere die diffundierenden Orai1-Tetramere einfangen und so die verschiedenen CRAC-Kanal-Zustände OS<sub>1</sub>, OS<sub>2</sub>, OS<sub>3</sub> und OS<sub>4</sub> ( $D_{OS_i} = 0 \mu\text{m}^2/\text{s}, i = 1, 2, 3, 4$ ) formieren. Diese Zustände bestehen aus einem Orai1-Tetramer und aus einem bis hin zu vier STIM1-Dimeren. Die Summe aller CRAC-Kanäle führt zum CRAC-Strom  $I_{CRAC}$ , wie er in Gleichung 5.6 angegeben ist.

Ich analysiere dieses zweidimensionale Reaktions-Diffusions System per Computer-Simulationen, die wie bereits erwähnt, auf dem in Abschnitt 4.2.2 beschriebenen Algorithmus beruhen. Dieser Algorithmus besteht im Wesentlichen aus einer Erweiterung des

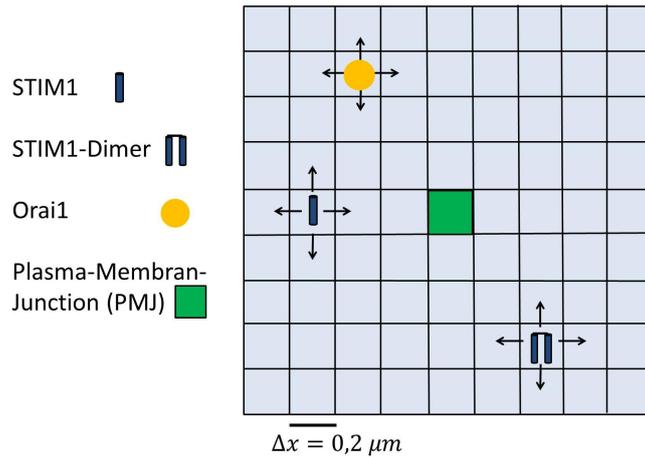


Abbildung 5.1: Modellgeometrie des zweidimensionalen Reaktions-Diffusions Modells zur Simulation der stochastischen CRAC-Kanal Bildung durch STIM1-Orai1 Wechselwirkung. Das Rechteckgitter präsentiert gleichzeitig die Zellplasmamembran und die Membran des Endoplasmatischen Retikulums. In der Zellmembran diffundieren die STIM1-Monomere und STIM1-Dimere, in der ER-Membran diffundieren die Orai1-Tetramere. Nur an der immobilen Plasmamembran-Junction können Orai1-Tetramere von STIM1-Dimeren eingefangen werden und die CRAC-Kanäle bilden.

Gillespie-Algorithmus [119], der durch Nutzung effizienter Datenstrukturen und Aufteilung der Simulationsgeometrie in Subvolumina / Gitterzellen ([118, 121], siehe Kapitel 3) auch für die Untersuchung räumlich aufgelöster Systeme in angemessener Computerrechenzeit verwendet werden kann. Zu Beginn der Simulation werden zur Zeit  $t = 0$  alle Orai1 sowie STIM1-Teilchen homogen über das gesamte Gitter verteilt. Die Parameter, die Reaktionsraten und Diffusionskonstanten, die ich als Base-Case oder Standardkonfiguration verwende, sind in Tabelle 5.1 dargestellt. Es wird darauf hingewiesen, falls diese im Ergebnisteil abweichen.

#### Modell-Erweiterungen: STIM1-Dimer Hopping und Annahme von Orai1-Hexameren

Hier möchte ich zwei Erweiterungen des 2D-Modells zur CRAC-Kanal Bildung vorstellen. Die erste der beiden Erweiterungen bezeichne ich mit dem Begriff „Hopping<sup>23</sup>“. Aus Experimenten ist nicht zu 100% bekannt, welche Reaktionen (Binde- und Dissoziationsprozesse) an der Plasmamembran zwischen STIM1-Dimeren und Orai1-Tetrameren ablaufen, und ob die Gleichungen 5.2-5.5 wirklich die Realität beschreiben. Experimentell wurde von Hoover et al. [25] nachgewiesen, dass der CRAC-Strom  $I_{CRAC}$  bei gleichbleibender Anzahl an STIM1-Proteinen und Erhöhung der Orai1-Proteinanzahl abnimmt.

<sup>23</sup>Hopping vom englischen to hop = hüpfen.

Spezies	D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	Reaktionsrate	
STIM1	0,1 [102]	$k_3$	$k_{on}$
STIM1_2	0,05 [102]	$k_5$	$k_{on} \cdot \alpha$
Orai1	0,07 [91]	$k_7$	$k_{on} \cdot \alpha^2$
OS <sub>1</sub> ,OS <sub>2</sub> ,OS <sub>3</sub> ,OS <sub>4</sub>	0	$k_9$	$k_{on} \cdot \alpha^3$
Anzahl STIM1 Monomere	6000		
Reaktionsrate		Reaktionsrate	
$k_{on}$	$1,5 \cdot 10^8 [1/MS]$	$k_4$	$k_{off}$
$k_{off}$	0,8 [1/s]	$k_6$	$k_{off} \cdot \beta$
$k_1$	$10^8 [1/MS]$	$k_8$	$k_{off} \cdot \beta^2$
$k_2$	0,05 [1/s]	$k_{10}$	$k_{off} \cdot \beta^3$

Tabelle 5.1: Reaktions- und Diffusionsraten sowie STIM1-Monomeranzahl, die als Base-Case- oder Standard-Parameter des 2D-Modells benutzt werden.

Eine sehr starke Orai1-Überexpression bewirkt sogar ein Abfallen des Stroms auf den Wert Null. Aus diesem Grund wurde von mir ein mögliches Szenario entwickelt, das die Abhängigkeit des CRAC-Stroms  $I_{CRAC}$  von der Orai1-Proteinanzahl richtig widerspiegeln soll.

Dazu habe ich das als Standardkonfiguration benutzte Reaktionsschema (Gleichungen 5.2-5.5) um den von mir als STIM1-Dimer Hopping bezeichneten Prozess erweitert. STIM1-Dimer Hopping bedeutet, dass STIM1-Dimere, die sich von bereits gebildeten CRAC-Kanälen ablösen, an freie Orai1-Tetramere binden bzw. an freie Orai1-Tetramere übergehen können. Analog wäre auch vorstellbar, dass sich die ablösenden STIM1-Dimere an andere bereits bestehende CRAC-Kanäle anlagern. Dieser Fall soll hier aber nicht betrachtet werden. Somit erweitert sich das Base-Case Reaktionsschema bestehend aus den Gleichungen 5.2-5.5 um folgende Reaktionen:



In Gleichung 5.8 löst sich ein STIM1-Dimer von einem CRAC-Kanal-Zustand OS<sub>2</sub> ab und bindet an einen freien Orai1-Tetramer. Dadurch entstehen zwei CRAC-Kanal-Zustände OS<sub>1</sub>. Im Gegensatz dazu entsteht im Base-Case Fall aus einem OS<sub>2</sub>-Zustand bei STIM1-Dimer Dissoziation immer ein OS<sub>1</sub>-Zustand und ein freier STIM1-Dimer. Die beiden Gleichungen 5.9 und 5.10 beschreiben analog die Übergänge der Zustände OS<sub>3</sub> bzw. OS<sub>4</sub> in zwei neue Zustände OS<sub>2</sub> + OS<sub>1</sub> bzw. OS<sub>3</sub> + OS<sub>1</sub>. Die Erweiterung des Modells um das STIM1-Dimer Hopping soll dazu dienen, herauszufinden, ob auch ohne eine

Annahme von kooperativem Binden und Ablösen der STIM1-Dimere, die von Hoover et al. gemessene Abhängigkeit des CRAC Stroms  $I_{CRAC}$  von der Orai1-Proteinanzahl richtig widerspiegelt wird. Die Idee des Hopping-Prozesses besteht darin, dass es zu umso mehr Hopping-Vorgängen kommt, je mehr Orai1-Tetramere im System vorhanden sind. Somit sollte es für eine Orai1-Überexpression zu einem Abbau der hohen CRAC-Kanal Zustände  $OS_3$  bzw.  $OS_4$  kommen und gleichzeitig zu einer Dominanz der Zustände  $OS_1$  bzw.  $OS_2$ . Da hauptsächlich die beiden Zustände  $OS_3$  bzw.  $OS_4$  einen Beitrag zum CRAC-Strom  $I_{CRAC}$  liefern (siehe Gleichung 5.6), sollte der Strom  $I_{CRAC}$  für große Orai1-Tetramer Zahlen aufgrund der Hopping-Prozesse abfallen.

Die zweite Modellerweiterung besteht aus der Annahme, dass die Orai1-Proteine Hexamere statt Tetramere bilden und somit Orai1-Hexamere in der Zellplasmamembran diffundieren. Diese Hexamere werden dann von STIM1-Dimeren eingefangen und bilden genau wie im Base-Case die vier Kanal-Zustände  $OS_1 - OS_4$ . Zusätzlich zu diesen vier Kanal-Zuständen sind im Falle von Orai1-Hexameren jedoch auch noch zwei weitere Kanal-Zustände  $OS_5$  und  $OS_6$  denkbar. Inspiriert ist diese Modellerweiterung durch die kürzlich experimentell gemachte Beobachtung, dass Orai1 in seiner kristallinen Struktur als Hexamer vorliegt [136]. Als Konsequenz muss das Base-Case Reaktionsschema wie folgt erweitert werden:



Es bleibt natürlich die Frage bestehen, in welchem Maß die beiden zusätzlichen Kanal-Zustände  $OS_5$  und  $OS_6$  zum Gesamtstrom  $I_{CRAC}$  beitragen. Insgesamt ergibt sich der CRAC-Strom  $I_{CRAC}$  nun aus folgender Gleichung

$$I_{CRAC} = 0,001 \cdot OS_1 + 0,025 \cdot OS_2 + 0,275 \cdot OS_3 + 1,0 \cdot OS_4 + r_1 \cdot OS_5 + r_2 \cdot OS_6, \quad (5.13)$$

wobei die Werte der beiden Parameter  $r_1$  und  $r_2$  unbekannt sind, und die Ergebnisse in Abhängigkeit dieser beiden Parameter analysiert werden müssen. Es ist denkbar, dass die beiden Kanal-Zustände  $OS_5$  und  $OS_6$  sowohl stärker zum Gesamtstrom beitragen als der Zustand  $OS_4$  als auch, dass ihr Beitrag im Vergleich zum Beitrag des Zustandes  $OS_4$  weniger oder gleich stark ausfällt. Die resultierenden Stromverläufe in Abhängigkeit der Orai1-Anzahl werden im Ergebnis-Teil für alle drei Möglichkeiten bzw. für verschiedene Werte der Parameter  $r_1$  und  $r_2$  diskutiert.

### 5.3 Ergebnisse

In Abbildung 5.2 a) wird die zeitliche Entwicklung des CRAC-Stroms  $I_{CRAC}$  unter Annahme der Base-Case Parameter gezeigt. Dieser Kanal-Strom entsteht aus der Bildung von Orai1-Kanälen bzw. eines Orai1/CRAC-Kanal Clusters an der Plasmamembran-Junction (PMJ).

Interessanterweise sagt das Modell Oszillationen des CRAC-Stroms  $I_{CRAC}$  voraus, die möglicherweise die Effizienz der Calcium-Signale in T-Zellen verstärken können. Diese Oszillationen werden jedoch nur dann gemessen, wenn die folgenden drei Bedingungen gleichzeitig erfüllt sind: i) eine langsamere Orai1-Diffusion, wobei die Diffusionskonstante  $D_{Orai}$  die Oszillationsperiode festlegt, ii) eine negative Kooperativität der On- und Off-Raten ( $\alpha < 1 \wedge \beta < 1$ ), iii) ein leicht geändertes Reaktionsschema, bei dem die Reaktionen aus den Gleichungen 5.3-5.5 nicht mehr symmetrisch ablaufen. Die Bedingung iii) hat zur Folge, dass zwar weiterhin ein STIM1-Dimer an die Orai1-Tetramere bindet, sich nun jedoch bei den Rückreaktionen zwei einzelne STIM1-Monomere statt eines STIM1-Dimers ablösen. Für diese drei Bedingungen und ansonsten unveränderter Base-Case Systemkonfiguration dominiert der  $OS_4$ -Zustand den Gesamtstrom  $I_{CRAC}$ , so dass bei Dissoziationsprozessen zwei STIM1-Monomere an der PMJ erzeugt werden. Die auf diese Weise entstehenden Monomere müssen zunächst wieder Dimerisieren und evtl. wieder zur PMJ zurück diffundieren, bevor sie erneut Orai1-Tetramere einfangen oder am Aufbau bereits bestehender CRAC-Kanäle teilnehmen können. Nach der ersten Oszillationsperiode ist die Orai1-Dichte in der Nähe der PMJ aufgrund der verlangsamten Orai1-Diffusion noch erhöht, und die erneute CRAC-Kanal Bildung startet wieder.

Erhöht man die STIM1-Oligomerisation (höhere Reaktionsrate  $k_1$ , Daten nicht gezeigt) unter ansonsten gleichbleibenden Bedingungen, können keine Oszillationen beobachtet werden. Für eine höhere Reaktionsrate  $k_1$  ist die STIM1-Dimer-Bildung wahrscheinlicher als ein Diffusionsprozess der STIM1-Monomere aus der PMJ-Zone heraus. Somit stehen die STIM1-Dimere wieder vermehrt zur Kanal-Bildung an der PMJ zur Verfügung. Daher unterscheiden sich die Resultate der gemessenen Ströme  $I_{CRAC}$  bei erhöhter Oligomerisation auch bei Annahme einer negativen Kooperativität und einer verlangsamten Orai1-Diffusion qualitativ nicht von denen des Base-Case Szenarios (STIM1-Dimer-Dissoziation).

Ein weiteres Ergebnis meines Modells ist die Vorhersage, dass die negative Kooperativität der Binde- und Ablöseprozesse unter Base-Case Bedingungen essentiell für die CRAC-Kanal-Bildung ist. Die Annahme einer negativen Kooperativität des STIM1 an Orai1 Bindungs-Mechanismus ( $\alpha < 1$ ) sowie der STIM1-Dissoziation ( $\beta < 1$ ) ist notwendig um die experimentell beobachteten CRAC-Ströme  $I_{CRAC}$  richtig wiederzugeben. Speziell die experimentell gemessene Abhängigkeit des Stroms  $I_{CRAC}$  als Funktion der Orai1-Proteinanzahl [25] kann mit Hilfe des Modells nicht ohne Kooperativität ( $\alpha = \beta = 1$ ) erklärt werden.

Für eine feste Anzahl an STIM1-Proteinen steigt die Stromstärke zunächst mit der Anzahl an Orai1-Tetrameren bis hin zu einem optimalen STIM1:Orai1 Verhältnis an.

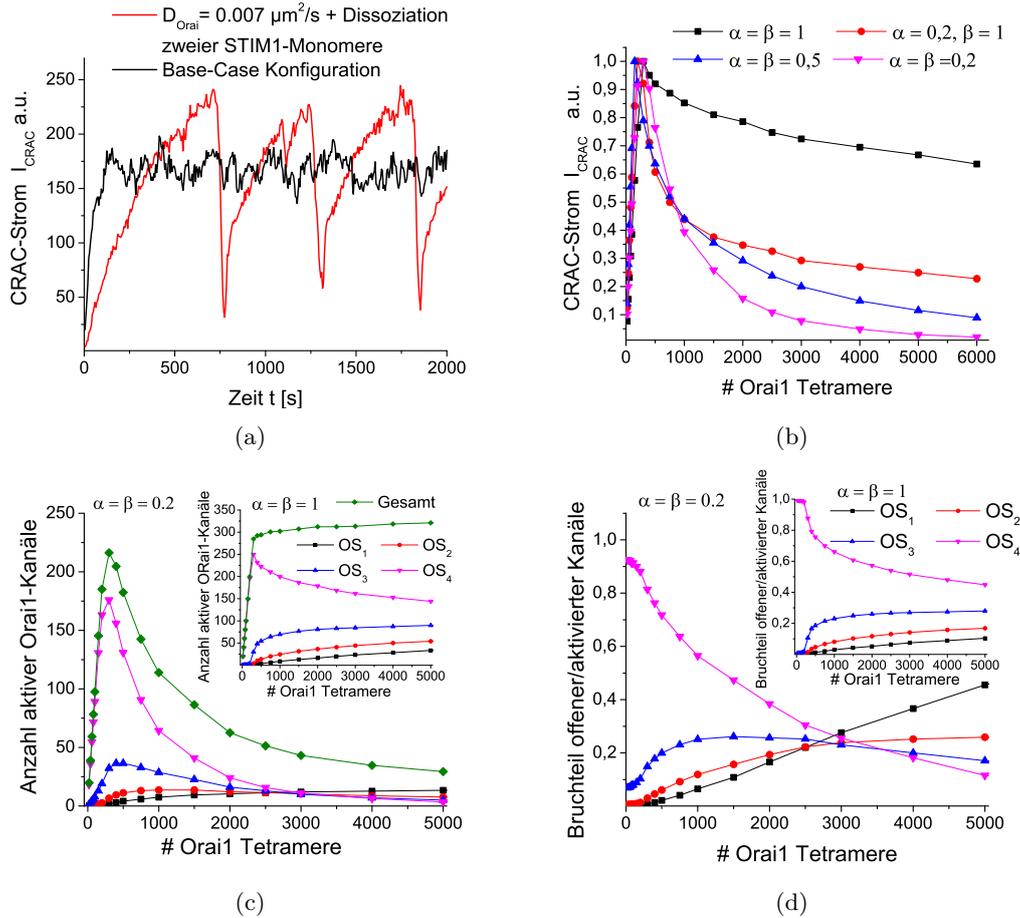


Abbildung 5.2: Stochastisches 2D-Modell zur STIM1/Orai1-Kanalbildung. a) Zeitliche Entwicklung des CRAC-Stroms. Die schwarze Kurve präsentiert die Base-Case Parameter. Die oszillierende rote Kurve wurde unter Annahme einer langsameren Orai1-Diffusion sowie der Dissoziation von zwei STIM1-Monomeren statt eines STIM1-Dimers simuliert. b) Auf eins normierte, stationäre CRAC-Stromstärken als Funktion der Orai1-Expression für verschiedene Werte der Kooperativitäts-Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$ . c) Anzahl aktiver STIM1/Orai1-Kanäle als Funktion der Orai1-Expression. d) Zusammensetzung der Kanal-Besetzung als Funktion der Orai1-Expression. Daten entnommen aus [31].

Nach Erreichen dieses optimalen STIM1:Orai1 Verhältnisses, das sich bei meinem Modell bei einem Wert von STIM1/Orai1=7,5 einstellt, fällt der CRAC-Strom bei weiterer Erhöhung der Orai1-Proteinanzahl wieder ab. Bei starker Orai1-Überexpression wird experimentell gemessen, dass der CRAC-Strom fast wieder bis auf Null zurückgeht [25]. Dieses Verhalten des Stroms in Abhängigkeit des STIM1:Orai1 Verhältnisses, speziell der nahezu verschwindende Strom für starke Orai1 Überexpression, lässt sich in meinem Modell nur bei gleichzeitiger negativer Kooperativität der On- und Off-Raten

( $\alpha < 1 \wedge \beta < 1$ ) erklären (siehe Abbildung 5.2 b)). Die Auswirkung der negativen Kooperativität auf den entstehenden CRAC-Strom wird in den Abbildungen 5.2 c) und 5.2 d) veranschaulicht. Dort ist die Anzahl aktiver Orai1-Kanäle bzw. der Bruchteil der verschiedenen Kanal-Zustände  $OS_1$ - $OS_4$  als Funktion der Orai1-Expression abgebildet. Für eine kleine Anzahl an Orai1-Tetrameren schafft es die große Anzahl an STIM1-Proteinen (6000 STIM1-Monomere im Base-Case) die negative Kooperativität des STIM1 an Orai1 Binde-Mechanismus zu überwinden. Dadurch gehen fast alle der wenigen zur Verfügung stehenden Orai1-Kanäle in den Zustand  $OS_4$  über. Aber für eine größere Anzahl an Orai1-Proteinen, also ein größeres Orai1:STIM1 Verhältnis und einen Wert  $\alpha < 1$ , beginnen die STIM1-Dimere gleichmäßiger an die Orai1-Tetramere zu binden. Zunächst für wenige Orai1 dominiert der Kanal-Zustand  $OS_4$ , der prozentual den weitaus größten Teil am Gesamtstrom  $I_{CRAC}$  (siehe Gleichung 5.6) ausmacht. Bei einer Anzahl von ca. 3000 Orai1-Proteinen existiert eine Schnittstelle / „Crossover“, ab der der Zustand  $OS_1$  beginnt, den CRAC-Strom anteilig zu dominieren (siehe Abbildung 5.2 d)); gefolgt von den Zuständen  $OS_2$  und  $OS_3$ . Die entsprechenden Verläufe der Stromstärke  $I_{CRAC}$  unter Annahme eines nicht kooperativen STIM1 Binde- und Ablösemechanismus ( $\alpha = \beta = 1$ ) sind in den Insets der Abbildung 5.2 c)-d) gezeigt. Bei Fehlen einer negativen Kooperativität dominiert der Kanal-Zustand  $OS_4$  immer und unabhängig vom Orai1-Expressionslevel den CRAC-Strom. Da der  $OS_4$ -Zustand den stärksten Anteil zum Gesamtstrom  $I_{CRAC}$  liefert, wird die negative Kooperativität benötigt, um die schwachen, fast auf Null abfallenden Ströme bei hohen Orai1-Expressionen zu erklären bzw. den experimentell gemessenen Stromverläufen [25] Rechnung zu tragen.

Des Weiteren habe ich mit Hilfe meines Modells die Auswirkungen eines STIM1-Dimer Hoppings sowie die Auswirkungen von in der Zellmembran diffundierenden Orai1-Hexameren statt Orai1-Tetrameren untersucht. Die Ergebnisse dieser in Abschnitt 5.2 vorgestellten Modellerweiterungen sind in Abbildung 5.3 zu sehen.

Im ersten der beiden Fälle, nämlich dem STIM1-Dimer Hopping, liefert mein Modell eine sehr interessante Voraussage. Durch die Einführung von Hopping-Prozessen lassen sich nun die von Hoover et al. [25] gemessenen Verläufe der Stromstärke  $I_{CRAC}$  auch ohne die ansonsten unbedingt notwendige Annahme einer negativen Kooperativität des STIM1 Binde- und Ablösemechanismus beobachten. Dieses Resultat ist in Abbildung 5.3 a) gezeigt. Selbst für eine vergleichsweise kleine Hopping-Rate  $k_{hopp}$  von  $10^6$  [ $M^{-1}s^{-1}$ ] fällt der CRAC-Strom  $I_{CRAC}$  bei hoher Orai1-Expression auf einen Wert von nahezu Null ab. Im Inset ist der entsprechende Stromverlauf bei zusätzlicher Annahme einer negativen Kooperativität des STIM1 Binde- und Ablösemechanismus gezeigt. In diesem Fall, der eher dem Base-Case Szenario entspricht, muss die Hopping-Rate  $k_{hopp}$  stärker gewählt werden ( $10^7$  [ $M^{-1}s^{-1}$ ]), um den „Nullstrom“ für hohe Orai1-Expression zu erreichen. Jedoch ist der Wert von  $k_{hopp} = 10^7$  [ $M^{-1}s^{-1}$ ] immer noch ca. eine Größenordnung kleiner als die STIM1-Dimer Bindung an die Kanalzustände  $OS_1$ - $OS_4$ . Somit ist der „normale“ Kanalaufbau für diesen Parameterwert immer noch wahrscheinlicher als ein STIM1-Dimer Hopping Prozess. Die Zusammensetzung des CRAC-Stroms  $I_{CRAC} = 0,001 \cdot OS_1 + 0,025 \cdot OS_2 + 0,275 \cdot OS_3 + 1,0 \cdot OS_4$  ist in Teil b) der Abbildung zu sehen. Dort sind die relativen Besetzungen der Zustände  $OS_1$ - $OS_4$  für die

in a) gezeigten Ergebnisse und eine Hopping-Rate  $k_{hopp} = 10^6 \text{ [M}^{-1}\text{s}^{-1}]$  dargestellt. Man erkennt, dass es bei Vorhandensein eines STIM1-Dimer Hoppings weitaus früher (vgl.

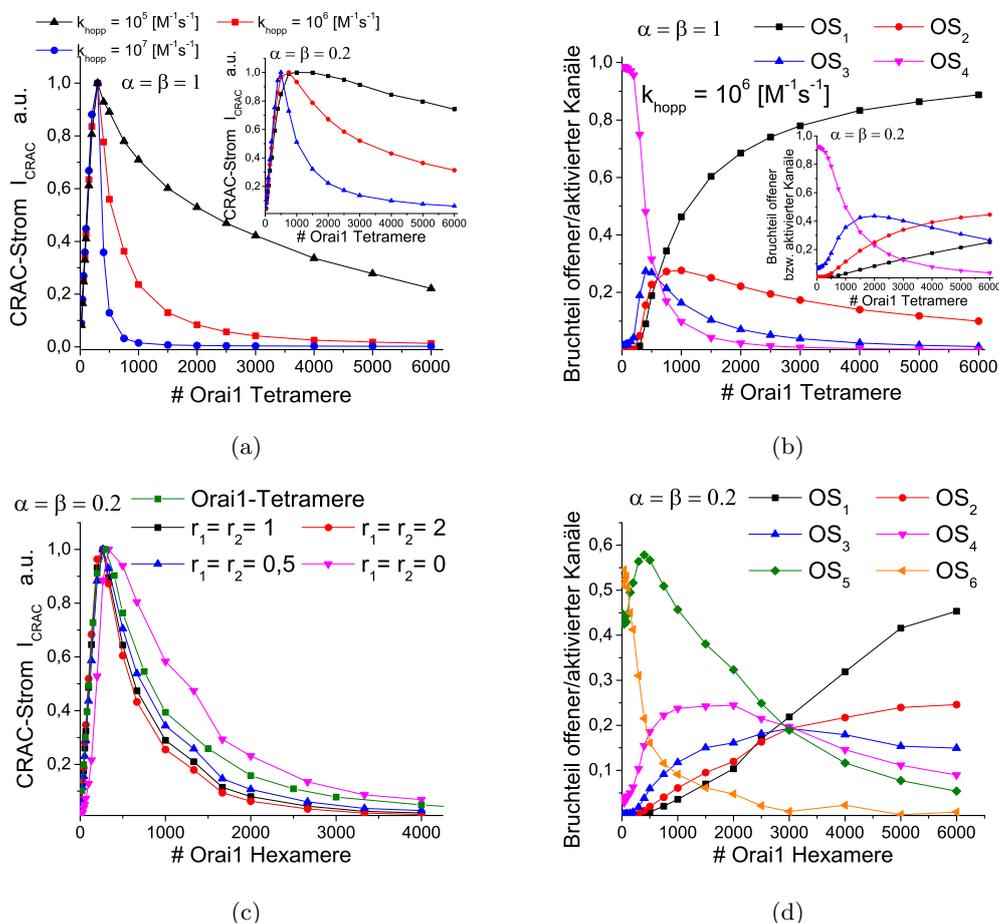


Abbildung 5.3: Ergebnisse des 2D-Modells bei Annahme von STIM1-Hopping bzw. Orai1-Hexameren. a) Auf eins normierte, stationäre CRAC-Stromstärken als Funktion der Orai1-Expression für verschiedene Werte der Hopping-Rate  $k_{hopp}$  und Vernachlässigung einer Kooperativität ( $\alpha = \beta = 1$ ). Inset: Hopping unter Verwendung der Base-Case Parameter inklusive neg. Kooperativität ( $\alpha = \beta = 0,2$ ) der STIM1-Dimer Bindung und Dissoziation. b) Anzahl der STIM1/Orai1-Kanäle in den verschiedenen Kanalzuständen OS<sub>1</sub>-OS<sub>4</sub> als Funktion der Orai1-Expression und eine Hopping-Rate  $k_{hopp} = 10^6 \text{ [M}^{-1}\text{s}^{-1}]$  (entspricht der roten Kurve aus Teil a)). c) + d) Annahme von Orai1-Hexameren in der Zellmembran. c) Auf eins normierte, stationäre CRAC-Stromstärken als Funktion der Orai1-Expression für verschiedene Werte der Parameter  $r_1$  und  $r_2$ . d) Anzahl der STIM1/Orai1-Kanäle in den verschiedenen Kanalzuständen OS<sub>1</sub>-OS<sub>4</sub> als Funktion der Orai1-Expression.

Abbildung 5.2 d)) zum Crossover kommt, ab dem der stark zum Gesamtstrom beitragende Kanalzustand  $OS_4$  vom Zustand  $OS_1$  als zahlenmäßig stärkster Zustand abgelöst wird. Zusammenfassend kann man sagen, dass auch ein STIM1-Dimer Hopping, also der Übergang oder Wechsel von STIM1-Dimeren bereits bestehender CRAC-Kanalzustände zu freien Orai1-Tetrameren, den experimentell beobachteten Verlauf der Stromstärke  $I_{CRAC}$  als Funktion der Orai1-Expression richtig erklären kann. Im Gegensatz dazu ist dies in meinem Base-Case Szenario (ohne das STIM1-Dimer Hopping) nur durch die Annahme einer negativen Kooperativität des STIM1 Binde- und Ablösemechanismus zu erreichen.

Wie in Abschnitt 5.2 bereits erwähnt, gibt es seit kurzem das experimentelle Ergebnis, dass der Orai1-Kanal im kristallinen Zustand als Hexamer vorliegt [136]. Aus diesem Grund setzte ich in einer zweiten Modellerweiterung voraus, dass die Orai1-Proteine in der Zellmembran Hexamere statt Tetramere bilden und somit Orai1-Hexamere in der Membran diffundieren, die dann von den STIM1-Dimeren eingefangen werden können. Durch diese Modellannahme ergibt sich die Möglichkeit, zwei weitere STIM1-Dimere an den nun aus sechs Orai1-Proteinen bestehenden Orai1-Kanal binden zu lassen. Als Konsequenz sind zwei weitere Kanalzustände  $OS_5$  und  $OS_6$  möglich (siehe Abschnitt 5.2). Die Resultate des Modells sind für verschiedene Werte der Parameter  $r_1$  und  $r_2$  in Abbildung 5.3 c) zu sehen. Die beiden Parameter  $r_1$  und  $r_2$  bestimmen, welchen Beitrag die Zustände  $OS_5$  bzw.  $OS_6$  zum Gesamtstrom  $I_{CRAC}$  leisten. Bei Annahme einer negativen Kooperativität des STIM1 Binde- und Ablösemechanismus unterscheiden sich die Ergebnisse qualitativ nicht von den Resultaten der ursprünglichen Standardkonfiguration, bei der Orai1-Tetramere in der Zellmembran vorliegen. Dieses Ergebnis ist unabhängig von der Wahl der Parameterwerte  $r_1$  und  $r_2$ ; es ist also ohne Bedeutung, ob die Kanalzustände  $OS_5$  und  $OS_6$  stark, schwach oder gar nicht zum Gesamtstrom  $I_{CRAC}$  beitragen.

Das relative Vorkommen der verschiedenen Kanalzustände  $OS_1$  bis  $OS_6$  ist in Abbildung 5.3 d) zu sehen. Genau wie im Base-Case Szenario unter Annahme von Orai1-Tetrameren dominieren für schwache Orai1-Expression die „hohen“ Kanalzustände; hier die Zustände  $OS_5$  und  $OS_6$ , im Base-Case die Zustände  $OS_3$  und  $OS_4$ . Diese verlieren zunehmend an Bedeutung je mehr Orai1-Hexamere im System vorhanden sind. Analog zu den in Abbildung 5.2 d) gezeigten Resultaten für das Base-Case Szenario kommt es bei einer Anzahl von ca. 3000 Orai1-Hexameren zu einem Crossover, ab dem dann der kaum zum Gesamtstrom  $I_{CRAC}$  beitragende Zustand  $OS_1$  dominiert. Da sich die Stromverläufe in Teil c) der Abbildung im Prinzip nur durch Aufsummieren der jeweils vorliegenden Kanalzustände  $OS_1$  bis  $OS_6$  ergeben und lediglich die Gewichtung der Einzelzustände entscheidend ist, ändert die Annahme von Orai1-Hexameren nichts an den Modellresultaten gegenüber der Simulation von Orai1-Tetrameren. Entscheidend ist die Tatsache, dass ich weiterhin angenommen habe, dass der für hohe Orai1-Expressionen bestimmende  $OS_1$ -Zustand einen verschwindend geringen Beitrag zum Gesamtstrom  $I_{CRAC}$  liefert.

Zusätzlich zu der Untersuchung der physikalischen Eigenschaften der STIM1/Orai1-Kanalbildung können mit Hilfe des Modells auch die experimentellen Resultate von Kilch

et al. [26] erklärt werden. Wie bereits in Abschnitt 5.1 erläutert, findet man bei einer

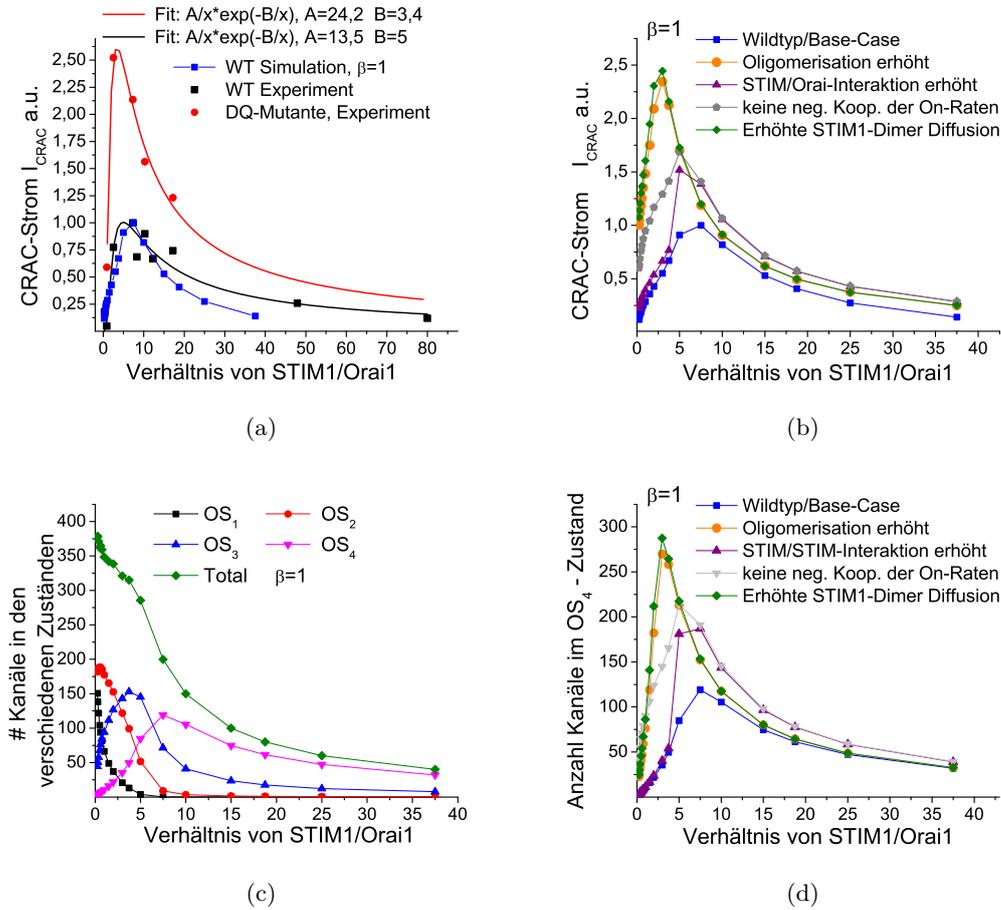


Abbildung 5.4: Stochastisches 2D-Modell zur STIM1/Orai1-Kanalbildung. a) Stationäre CRAC-Stromstärken als Funktion des STIM1/Orai1 Verhältnisses für den experimentell gemessenen STIM1-Wildtypen (schwarze Quadrate), den modellierten STIM1-Wildtypen (blaue Quadrate) und die experimentell gemessene STIM1-DQ-Mutante (rote Kreise). Die Kurven wurden auf das Maximum des Wildtypen normiert. b) Normierte CRAC-Ströme als Funktion des STIM1/Orai1 Verhältnisses für die im Text beschriebenen Modell-Mutanten A, B, C und D sowie den Modell-Wildtypen. Die Kurven wurden auf das Maximum des Wildtypen (blaue Kurve) normiert. c) Anzahl der STIM1/Orai1-Kanäle in den verschiedenen Kanalzuständen  $OS_1$ - $OS_4$  als Funktion des STIM1/Orai1 Verhältnisses. d) Anzahl der Kanäle im Zustand  $OS_4$  als Funktion des STIM1/Orai1 Verhältnisses für den Wildtypen sowie die Modell-Mutanten. Die Abbildung / Farben korrespondieren zu b). Daten entnommen aus [26].

Mutation von STIM1, der sogenannten „DQ“-Mutante, einen erhöhten CRAC-Strom bei gleichzeitig fast unveränderter Gesamtanzahl aktiver STIM1/Orai1-Kanäle. Neben der

Base-Case Konfiguration, die den STIM1 Wildtypen (Ausnahme  $\beta = 1$ ) darstellt, sollen durch Änderung der Modell / Systemparameter mögliche Auswirkungen der STIM1-DQ Mutation getestet werden. Da die Experimente von Kilch et al. darauf hindeuten, dass sich die STIM1-DQ Mutante durch eine verstärkte Oligomerisation oder eine schnellere STIM1-Dimer-Diffusion auszeichnet, unterscheidet sich die vier „Modell-Mutanten“ A, B, C und D.

Mutante A zeichnet sich durch eine verstärkte Oligomerisation der STIM1-Monomere aus ( $10 \cdot k_1(\text{WT}) = k_1(\text{A})$ ), Mutante B repräsentiert eine stärkere STIM1 an Orai1 Bindung ( $10 \cdot k_i(\text{WT}) = k_i(\text{B}), i \in \{3, 5, 7, 9\}$ ), Mutante C zeichnet sich durch eine Erniedrigung der negativen Kooperativität der On-Raten aus ( $\alpha(\text{C}) = 0,66 \neq \alpha(\text{WT}) = 0,2$ ) und Mutante D repräsentiert den Fall einer schnelleren STIM1-Dimer-Diffusion ( $10 \cdot D_{2\text{STIM1}}(\text{WT}) = D_{2\text{STIM1}}(\text{D})$ ). In Abbildung 5.4 a) ist zu erkennen, dass das Modell für die Base-Case Parameter (Ausnahme  $\beta = 1$ ) den für verschiedene DNA-Transfektionsverhältnisse von STIM1:Orai1 gemessenen STIM1-Wildtypen sehr gut beschreibt. Der stationäre CRAC-Strom  $I_{\text{CRAC}}$  erreicht seinen maximalen Wert bei einem Verhältnis von 7,5 STIM1 : Orai1 und fällt für hohe Orai1-Konzentrationen (kleine STIM1/Orai1 Verhältnisse) auf Null ab. Der experimentell bestimmte Kurvenverlauf der DQ-Mutanten (rote Kurve), der auf den Maximalwert des Wildtypen normiert ist, zeigt hingegen einen viel höheren Maximalwert des CRAC-Stroms, der auch leicht zu einem kleineren STIM1:Orai1-Verhältnis verschoben ist. Außerdem fallen die Werte von  $I_{\text{CRAC}}$  abhängig vom STIM1:Orai1-Verhältnis viel stärker ab. Die zu Abbildung 5.4 a) korrespondierenden Stromverläufe für die mit Hilfe des Modells simulierte STIM1-Mutanten sind im Teil b) der Abbildung zu sehen und dort mit dem Stromverlauf des Wildtypen verglichen. Man erkennt, dass eine Erhöhung der STIM1-Orai1 Wechselwirkung (Mutante B) und eine Abschwächung der negativen Kooperativität (Mutante C) die DQ-Mutante nicht erklären können. Hingegen stimmen die Stromverläufe unter Annahme einer erhöhten STIM1-Dimerisation (Mutante A) oder einer schnelleren STIM1-Dimer-Diffusion (Mutante D) recht gut mit denen der DQ-Mutante überein.

Sowohl für die erhöhten STIM1-Dimerisation als auch für die schnellere STIM1-Dimer-Diffusion erreicht die Stromstärke ein ca. 2,5-mal höheres Maximum, das zu kleineren STIM1/Orai1-Verhältnissen verschoben ist. Um zu verstehen, wieso diese beiden Parameteränderungen die so charakterisierten Stromverläufe widerspiegeln, ist in Abbildung 5.4 c) die Zusammensetzung des gesamten CRAC-Kanal-Clusters als Funktion des STIM1/Orai1 Verhältnisses dargestellt. Hier wird ersichtlich, dass für kleine STIM1/Orai1 Verhältnisse die wenig Strom beitragenden Zustände (vgl. Gleichung 5.6)  $\text{OS}_1$  und  $\text{OS}_2$  dominieren, bevor dann allmählich die Anzahl der  $\text{OS}_3$  und  $\text{OS}_4$  Zustände zunimmt, bis schließlich der  $\text{OS}_4$ -Zustand ab einem STIM1/Orai1 Verhältnis von ca. 7 immer dominiert. Somit lässt sich erklären, wie die Stromstärke bei gleicher Anzahl STIM1- und Orai1-Proteine erhöht werden kann. Falls eine Mutante / Parameteränderungen dazu führt / führen, dass der prozentuale Anteil der  $\text{OS}_4$  Zustände für ein festes STIM1/Orai1 Verhältnis ansteigt, steigt auch der CRAC-Strom  $I_{\text{CRAC}}$  bei gleicher Proteinanzahl an. Dies ist für die vier Modell-Mutanten und den Wildtyp in Abbildung 5.4 d) gezeigt.

Eine verlangsamte Diffusion der STIM1-Dimere konnte mittels FRAP-Experimenten [26]

ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund erlaubt mein Modell die Schlussfolgerung, dass eine erhöhte Oligomerisation der STIM1-Proteine (erhöhte Rate  $k_1$ : Mutante A; vergleiche Abbildung 5.4 b) und d)) am wahrscheinlichsten ist, um den experimentell gemessenen Phänotyp der DQ-Mutante zu erklären.

## 5.4 Zusammenfassung

Mit Hilfe des stochastischen 2D-Modells zur Bildung der Orai1/STIM1-Kanäle und des dazu von mir verwendeten Reaktionsschemas können die von Hoover et al. [25] gemessenen CRAC-Ströme  $I_{CRAC}$  richtig wiedergegeben werden. Die auf Null abfallenden Ströme bei sehr hoher Orai1-Expression lassen sich für das von mir als Base-Case Szenario vorgestellte Reaktions-Diffusions System jedoch nur unter Annahme einer negativen Kooperativität des STIM1-Dimer Binde- und Ablösemechanismus realisieren. Grund hierfür sind die unterschiedlichen Beiträge der Kanalzustände  $OS_1$ - $OS_4$  [25, 104] zum Gesamtstrom und die Ablösung der  $OS_4$ -Dominanz bei kleiner Orai1-Expression durch eine Dominanz des  $OS_1$ -Zustandes bei Orai1-Überexpression. Außerdem sagt mein Modell bei verlangsamter Orai1-Diffusion das Vorkommen von Oszillationen im CRAC-Strom voraus, welche zu einer erhöhten Effizienz der T-Zell Aktivierung beitragen könnten.

Des Weiteren schlage ich hier einen Mechanismus vor, der die von Hoover et al. [25] gemessenen CRAC-Ströme  $I_{CRAC}$  auch ohne die Annahme einer negativen Kooperativität des STIM1-Dimer Binde- und Ablösemechanismus richtig widerspiegeln kann. Bei diesem von mir als „Hopping“ bezeichneten Prozess können bereits an ein Orai1-Tetramer gebundene STIM1-Dimere per „Hopping“ auf frei diffundierende Orai1-Tetramere übergehen. Als Konsequenz kommt es selbst bei kleinen Hopping-Raten (im Vergleich zur STIM1-Dimer Bindung) bei Orai1-Überexpression zum Abbau der Kanalzustände  $OS_3$  und  $OS_4$  und einer Verschiebung hin zu den Kanalzuständen  $OS_1$  und  $OS_2$ . Das „Hopping“ führt also genau wie die negative Kooperativität des STIM1-Dimer Binde- und Ablösemechanismus dazu, dass die weniger zum Gesamtstrom beitragenden Zustände für Systeme mit großer Anzahl an Orai1-Proteinen dominieren und somit der resultierende Gesamtstrom  $I_{CRAC}$  kleine Werte annimmt.

Des Weiteren habe ich überprüft, welche Auswirkungen das experimentelle Ergebnis, dass Orai1 in kristallinem Zustand als Hexamer vorliegt [136], auf die Modellergebnisse hat. Es hat sich gezeigt, dass es für die wesentlichen Aussagen des Modells keinen Unterschied ausmacht, ob in der Zellmembran diffundierende Orai1-Tetramere oder Orai1-Hexamere angenommen werden. Nicht zuletzt wurde mit Hilfe des Modells das Verhalten der von Kilch et al. [26] als DQ bezeichneten STIM-Mutante untersucht. Als Ergebnis konnten die experimentell beobachteten DQ-Mutanten-Ströme qualitativ richtig reproduziert werden und eine im Gegensatz zum Wildtypen verstärkte STIM1-Oligomerisation als dafür verantwortlicher Prozess benannt werden.



# Kapitel 6

## Calcium-Signale während der T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Polarisierung

### 6.1 Einleitung und Motivation

T-Lymphozyten oder kurz T-Zellen haben einen großen Anteil an der erfolgreichen Immunabwehr, indem sie abnormale Zellen wie z.B. Tumorzellen auffinden und unschädlich machen. Nachdem die T-Zelle eine antigenpräsentierende Zelle ausfindig gemacht hat, bildet sie mit ihr eine Kontaktfläche aus, die sogenannte Immunologische Synapse (IS) [57, 58] (siehe Abbildung 2.4). Mit der Ausbildung der IS beginnt auch die Polarisierung der T-Zelle (siehe Abschnitt 2.4). Wie in Abbildung 2.9 dargestellt, bezeichnet man im Wesentlichen die räumliche Umordnung bzw. Neuordnung von Zellorganellen, Calcium-Kanälen und Pumpen als Zell-Polarisierung. Diese räumliche Umstrukturierung ist essentiell für die T-Zell-Aktivierung, ein Prozess der oft mit der Zerstörung der abnormalen / antigenpräsentierenden Zelle endet. Eine vollständige Aktivierung der T-Zelle benötigt ein langanhaltendes, robustes und hohes Calcium-Signal, das von einigen Minuten bis hin zu Stunden dauern kann [86]. Wie in Kapitel 2 erläutert, ist ein lange währender (mehrere Minuten) hoher zytosolischer Calciumpegel toxisch für die Zelle. Deshalb gibt es meist mehrere Calcium-Feedback-Mechanismen, die dafür sorgen, dass das Calcium-Signal recht schnell wieder endet und das Calcium dann aus dem Zytosol gepuffert bzw. herausgepumpt wird. Es gibt starke Hinweise darauf, dass Mitochondrien bei der T-Zell-Aktivierung eine wichtige Rolle spielen und mit daran beteiligt sind, dass das für die Aktivierung benötigte spezielle Calcium-Signal aufrechterhalten werden kann [13, 23, 71, 73]. Mitochondrien sind starke Calcium-Puffer und deshalb würde man erwarten, dass eine Blockade ihrer Calciumaufnahme die zytosolische Calciumkonzentration erhöht. Aber überraschenderweise wurde genau das Gegenteil experimentell in

T-Zellen nachgewiesen [71]. Des Weiteren translozieren Mitochondrien aktiv zur Immunologischen Synapse [13, 73], wo sie sich in der Nähe der Calcium-Hauptstromquelle, den CRAC-Kanälen, positionieren. Dadurch nehmen sie das einströmende Calcium auf, verringern so die um den Kanal entstehende Calcium-Mikrodomäne und verhindern somit die Calcium-abhängige Inhibierung des CRAC-Kanals. Neben der Translokation der Mitochondrien wurde experimentell auch eine Umverteilung und Akkumulation von PMCA-Pumpen im Zuge der T-Zell-Polarisierung gefunden [13]. Nach Bildung der IS kommt es zu einer Anhäufung der PMCA-Pumpen in der Nähe der IS und somit in der Nähe der Mitochondrien. Auf diese Weise entsteht eine Art Wettbewerb zwischen Mitochondrien und PMCA-Pumpen um das an der IS einströmende Calcium. Gewinnen die PMCA-Pumpen diesen Wettbewerb, so wird das Calcium hauptsächlich wieder nach außen transportiert, gewinnen die Mitochondrien, so wird das Calcium überwiegend ins Zellinnere umverteilt.

Auf Basis dieser experimentellen Befunde erachte ich den Abstand zwischen Mitochondrien und der IS als physikalisch dominanten Faktor für die bei der T-Zell-Aktivierung entstehenden Calcium-Signale. Deshalb habe ich Modelle entwickelt, mit deren Hilfe die Fragen beantwortet werden sollen, ob der Abstand Mitochondrien zur IS gleichzeitig die lokalen und globalen Calcium-Signale steuern kann, ob die Umordnung der PMCA-Pumpen ein notwendiger Effekt für die T-Zell-Aktivierung ist und welchen Einfluss die Struktur des Mitochondriennetzwerkes auf die entstehenden Calcium-Signale hat. Da in Experimenten das Studium von Calcium-Signalen bei aktiven SERCA-Pumpen nahezu unmöglich ist, soll auch die Auswirkung von aktiven SERCA-Pumpen und der damit verbundenen Wiederauffüllung des Endoplasmatischen Retikulum ebenso wie die Form und Position des Endoplasmatischen Retikulum auf die sich ausbildenden Calcium-Signale untersucht werden. Einige der in diesem Kapitel präsentierten Resultate wurden bereits in einem von mir veröffentlichten Peer-Review-Artikel vorgestellt und diskutiert [31].

Zunächst wird in diesem Kapitel ein stark vereinfachtes eindimensionales Diffusions-Modell vorgestellt, mit dessen Hilfe bereits die Abhängigkeit des globalen Calcium-Signals vom Abstand zwischen Mitochondrien und der IS demonstriert werden kann. Im Anschluss daran werde ich mit Hilfe eines äquivalenten Random Walk Modells den physikalischen Effekt erläutern, der dazu führt, dass die globale Calciumkonzentration in meinem Modell von der Mitochondrienposition relativ zur IS abhängt. Darauf folgt die Präsentation eines realistischeren / „physiologischeren“ dreidimensionalen Zellmodells. Mit Hilfe dieses Modells simuliere ich das zugrunde liegende Reaktions-Diffusions Szenario unter Benutzung einer Finite-Elemente Software. Dadurch kann der Einfluss des Abstands Mitochondrien-IS, der PMCA-Pumpen Verteilung und der ER / SERCA-Pumpenposition auf die entstehenden Calcium-Signale untersucht werden. Im letzten Teil dieses Kapitels stelle ich ein zweidimensionales Modell vor, das ich in Ergänzung zum 3D-Modell nutze, um die Calcium-Signale in Abhängigkeit der Struktur des Mitochondriennetzwerkes zu analysieren.

## 6.2 Eindimensionales T-Zell Modell. Auswirkung der Mitochondrienposition auf die entstehenden Calcium-Signale

Dieser Abschnitt soll dabei helfen, die physikalischen Effekte zu verstehen, die dazu führen, dass die Bewegung der Mitochondrien hin zur Immunologischen Synapse Auswirkung auf die resultierenden Calcium-Signale hat. Dazu werden mit Hilfe eindimensionaler Modelle die auftretenden Calcium-Signale in Abhängigkeit der Mitochondrienposition untersucht, bevor dann im nächsten Abschnitt ein realistischeres dreidimensionales T-Zell Modell vorgestellt wird und dessen Resultate diskutiert werden. Ein ähnliches 1D-Modell wurde bereits in Quintana et al. [13] vorgestellt. Das Szenario, das hier betrachtet wird, geht von bereits gebildeten und dauerhaft aktivierten CRAC-Kanälen (siehe Kapitel 5 und 2.4) aus. Dies bedeutet, dass ein vollständig entleertes und entleert bleibendes Endoplasmatisches Retikulum angenommen wird. Experimentell wird dazu die Droge Thapsigargin verwendet, die eine Blockade der SERCA-Pumpen verursacht. Diese Annahmen vereinfachen das Modell zu einem konstanten Calcium-Einstrom in die Zelle durch den CRAC-Kanal sowie zu einem linear von der Calciumkonzentration abhängigem Abpumpen von  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle durch die PMCA-Pumpen. Es bleibt allerdings die Frage offen, ob die Mitochondrienposition innerhalb des Zytoplasmas und deren Lage relativ zum Calcium-Einstrom einen Einfluss auf die entstehenden lokalen und globalen Calcium-Signale ausüben.

Um erste Erkenntnisse zu erlangen, reduziere ich das System auf eine Raumdimension (hier die  $x$ -Richtung). Somit bleibt, eine einzige Variable  $x$  übrig, die von  $x = 0$  (Position der IS inklusive des CRAC-Kanal Clusters) bis  $x = L$  (zur IS entgegengesetztes Zellende, Position der PMCA-Pumpen) variiert. Die Position der Mitochondrien innerhalb des Zytoplasmas wird durch die beiden Parameter  $x_{\text{in}}$  und  $x_{\text{out}}$  gekennzeichnet. Zur Vereinfachung nehme ich in einem ersten Schritt an, dass sich die komplette Aufnahme von Calcium an der der IS zugewandten Mitochondrien-Spitze  $x_{\text{in}}$  abspielt. Des Weiteren wird die gesamte Menge an Calcium, die an der Mitochondrien-Spitze aufgenommen wird, quasi instantan an der Position  $x_{\text{out}}$  wieder in das Zytoplasma abgegeben. Eine schematische Darstellung des Modells inklusive der zu erwartenden räumlichen Verteilung der Calciumkonzentration ist in Abbildung 6.1 zu sehen. Des Weiteren wird angenommen, dass Calcium im Zytoplasma frei diffundiert und dass Calcium durch Quellen und Senken wie oben beschrieben im Zytoplasma entsteht bzw. aus der Zelle heraus transportiert wird. Mathematisch wird dieses Problem durch die eindimensionale Reaktions-Diffusions Gleichung

$$\frac{\partial c(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c(x, t)}{\partial x^2} - k_{\text{in}} c(x_{\text{in}}, t) \delta(x - x_{\text{in}}) + k_{\text{in}} c(x_{\text{in}}, t) \delta(x - x_{\text{out}}), \quad (6.1)$$

beschrieben. Im stationären Fall ( $\frac{\partial c_s(x)}{\partial t} = 0$ ) vereinfacht sich diese Gleichung zu

$$D \frac{\partial^2 c(x)}{\partial x^2} = +k_{\text{in}} c(x_{\text{in}}, t) \delta(x - x_{\text{in}}) - k_{\text{in}} c(x_{\text{in}}, t) \delta(x - x_{\text{out}}), \quad (6.2)$$

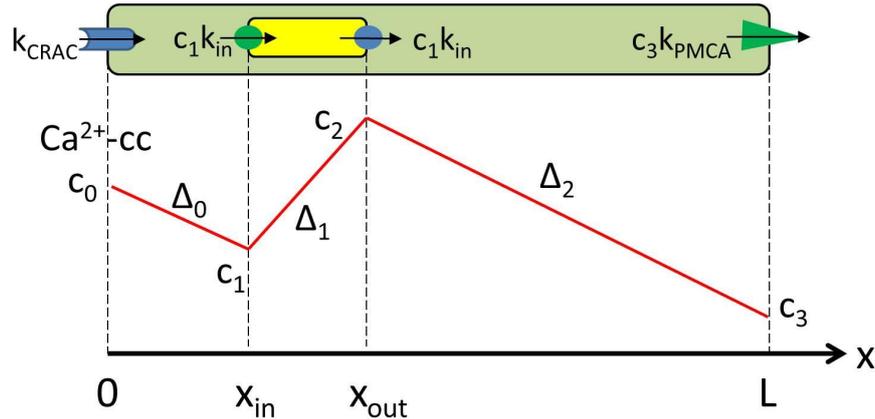


Abbildung 6.1: **Oben:** Skizze des eindimensionalen Modells: das Zytosol ist hell-grün, die Mitochondrien sind gelb,  $\text{Ca}^{2+}$ -Quellen (CRAC und Mitochondrien) sind blau,  $\text{Ca}^{2+}$ -Senken (Mitochondrien und PMCA-Pumpen) sind grün. **Unten:** Erwartete Ortsabhängigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.  $c_0$  ist die lokale Konzentration an der Position der CRAC-Kanäle ( $x = 0$ ),  $c_1$  an den vorderen Enden der Mitochondrien ( $x = x_{\text{in}}$ ),  $c_2$  an den hinteren Enden ( $x = x_{\text{out}}$ ) und  $c_3$  an der Position der PMCA-Pumpen ( $x = L$ ). Die Steigungen der linearen Abschnitte sind durch  $\Delta_0$ ,  $\Delta_1$ , und  $\Delta_2$  gekennzeichnet (siehe Text).

wobei dann folgende Randbedingungen gelten:

$$Dc'_s(x=0) = D \left. \frac{dc_s}{dx} \right|_{x=0} = -k_{\text{CRAC}} \quad (6.3)$$

$$Dc'_s(x=L) = D \left. \frac{dc_s}{dx} \right|_{x=L} = +k_{\text{PMCA}} c_s(x=L).$$

$k_{\text{CRAC}}$  und  $k_{\text{PMCA}}$  sind die Stärken des CRAC Kanals sowie der PMCA-Pumpen und  $k_{\text{in}}$  die Stärke der mitochondrialen Calcium-Aufnahme (die gleichzeitig auch die Calcium-Freisetzung am anderen Mitochondrien-Ende bestimmt  $k_{\text{out}} = k_{\text{in}} c_s(x = x_{\text{in}})$ ).

### 6.2.1 Stationäres $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprofil

Zur Untersuchung der in den T-Zellen entstehenden Calcium-Signale interessiere ich mich hier für die stationäre Lösung der Differentialgleichung  $c_s(x) = \lim_{t \rightarrow \infty} c(x, t)$ , welche aufgrund der schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Diffusion nach kurzer Zeit erreicht ist. In diesem Fall gilt  $c''_s(x) = 0$  für  $x \neq x_{\text{in}}, x_{\text{out}}$ , was bedeutet, dass die Funktion  $c_s(x)$  stückweise linear ist (wie in Abbildung 6.1 bereits angedeutet) und außerdem stetig. An den Punkten

$x = x_{\text{in}}$  und  $x = x_{\text{out}}$  besitzt die zweite Ableitung von  $c_s(x)$  einen Delta-Funktions-Anteil

$$Dc_s''(x) = +k_{\text{in}}c_s(x_{\text{in}})\delta(x - x_{\text{in}}) - k_{\text{in}}c_s(x_{\text{in}})\delta(x - x_{\text{out}}), \quad (6.4)$$

was bedeutet, dass die erste Ableitung einen Sprung an folgenden Stellen besitzt

$$\Delta c_s'(x_{\text{in},\text{out}}) = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \int_{x_{\text{in},\text{out}} - \epsilon}^{x_{\text{in},\text{out}} + \epsilon} dx c_s''(x) = \begin{cases} c_s(x_{\text{in}}) k_{\text{in}}/D & \text{for } x = x_{\text{in}} \\ -c_s(x_{\text{in}}) k_{\text{in}}/D & \text{for } x = x_{\text{out}}. \end{cases} \quad (6.5)$$

Wie in Abbildung 6.1 angedeutet gelten folgende Bezeichnungen  $c_0 = c_s(x = 0)$ ,  $c_1 = c_s(x = x_{\text{in}})$ ,  $c_2 = c_s(x = x_{\text{out}})$  und  $c_3 = c_s(x = L)$ . Außerdem definiere ich  $l = x_{\text{out}} - x_{\text{in}}$  als Länge der Mitochondrien und die Steigungen als  $\Delta_0 = (c_0 - c_1)/x_{\text{in}}$ ,  $\Delta_1 = (c_2 - c_1)/l$  und als  $\Delta_2 = (c_2 - c_3)/(L - x_{\text{out}})$ . Daraus folgt, dass

$$\begin{aligned} c_1 &= c_0 - \Delta_0 x_{\text{in}} \\ c_2 &= c_1 + \Delta_1 l \\ c_3 &= c_2 - \Delta_2 (L - x_{\text{out}}) \end{aligned} \quad (6.6)$$

gilt. Zusätzlich erhält man aus den Randbedingungen (Gleichung 6.3)

$$\begin{aligned} \Delta_0 &= k_{\text{CRAC}}/D \\ \Delta_2 &= k_{\text{PMCA}}c_3/D, \end{aligned} \quad (6.7)$$

und den Sprung-Bedingungen (Gleichung 6.5)

$$\begin{aligned} D\Delta_0 + D\Delta_1 &= c_1 k_{\text{in}} \\ D\Delta_1 + D\Delta_2 &= c_1 k_{\text{in}}, \end{aligned} \quad (6.8)$$

direkt das Resultat  $\Delta_2 = \Delta_0$ , was ebenfalls bereits in Abbildung 6.1 angedeutet ist. Wenige Schritte Lineare Algebra lösen das erhaltene Gleichungssystem und führen zu der Lösung

$$\begin{aligned} c_3 &= k_{\text{CRAC}}/k_{\text{PMCA}} \\ c_2 &= k_{\text{CRAC}}/k_{\text{PMCA}} + k_{\text{CRAC}}(L - l - x_{\text{in}})/D \\ c_1 &= c_2 (1 - (k_{\text{in}} - k_{\text{CRAC}})l/D)^{-1} \\ c_0 &= \frac{k_{\text{CRAC}}/D}{1 + k_{\text{in}}l/D} (L + D/k_{\text{PMCA}} + x_{\text{in}}k_{\text{in}}l/D). \end{aligned} \quad (6.9)$$

Diese Lösung wird im Abschnitt 6.2.3, in dem die Modell-Resultate vorgestellt werden, noch ausführlich diskutiert.

## 6.2.2 Wahl der Parameter

Um einen physiologisch angemessenen Parameterbereich abzuschätzen, muss man bedenken, dass hier ein eindimensionales Modell betrachtet wird. Somit müssen die physiologisch relevanten Konzentrationen und Reaktionsraten umgerechnet werden. Konzentrationen werden in einer Dimension (1D) in der Einheit Calcium-Teilchen pro Mikrometer gemessen, was dem inversen mittleren Abstand zwischen den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen entspricht. In drei Raumdimension (3D) werden Calciumkonzentrationen typischerweise in der Einheit Nano- oder Mikromol, also der Anzahl an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen pro Volumen, angegeben. Bei Anwendung der dritten Wurzel auf eine in 3D gemessene Konzentration ergibt sich gerade der inverse mittlere Abstand der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. So erhält man zum Beispiel für eine typische Ruhekonzentration von 100 nM, was in 3D einer Anzahl von 60  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen pro Kubikmikrometer entspricht, einen mittleren Abstand von  $1/4$  Mikrometer zwischen zwei Calcium-Ionen. Dadurch ergibt sich für das 1D-Modell eine Konzentration von  $4 \mu\text{m}^{-1}$ , die zu einer Ruhekonzentration von 100 nM in 3D äquivalent ist. Somit kann man Calciumkonzentrationen in 1D ( $c_{1D}$ ) in Konzentrationen für den dreidimensionalen Fall ( $c_{3D}$ ) mit Hilfe der folgenden Formel umrechnen

$$c_{3D} [nM] = 1,66 \cdot (c_{1D} \cdot \mu\text{m})^3. \quad (6.10)$$

Daneben sind inverse  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, die zur Beschreibung von Calcium-Pumpen verwendet werden, über die Formel  $c_{3D}^{-1} [nM^{-1}] = 0,6 \cdot (c_{1D}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-1})^3$  miteinander verknüpft. Die zytosolische Calciumkonzentration soll nach Modell-Vorgabe bei  $x = L$  (dem von der IS am weitesten entfernten Punkt) der typischen Ruhekonzentration in Zellen entsprechen, wodurch sich  $c_3 = c_{\text{rest}} = 4 \mu\text{m}^{-1}$  ergibt. Ein vollständig aktivierter CRAC-Kanal befördert ca.  $10^4$   $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen pro Sekunde [137] ins Zytosol, was in 3D zu einer Rate eines einzelnen CRAC-Kanals von  $k_{\text{CRAC},3D} = 10^4 \text{ s}^{-1}$  führt. In dem Modell nehme ich einen CRAC-Kanal Cluster an, der aus 50 Kanälen besteht, woraus sich als Parameter für den CRAC-Einstrom in 1D die Rate  $k_{\text{CRAC},1D} \approx 100 \text{ s}^{-1}$  ergibt. Da an der Koordinate  $x = L$  Ruhekonzentration vorherrschen soll, und sich die dortige Konzentration zu  $c_3 = k_{\text{CRAC}}/k_{\text{PMCA}}$  ergibt, wobei  $c_3$  und  $k$  bereits durch obige Annahmen festgelegt sind, erhält man direkt die PMCA-Pumpen Rate zu  $k_{\text{PMCA}} = 25 \mu\text{m} \text{ s}^{-1}$ . Die Diffusionskonstante für Calcium ist nach Albritton et al. [126] zu einen Wert von  $D_{\text{cyt}} = D_M = 220 [\mu\text{m}^2/\text{s}]$  bestimmt. Da in meinem 1D-Modell keine Calcium-Puffer vorkommen, verwende ich hier eine leicht verminderte, effektive Diffusionskonstante für das „freie“ Calcium von  $D = 100 \mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Die Zellgröße ist auf  $L = 10 \mu\text{m}$  festgelegt und die Mitochondrienlänge nehme ich als  $l = 1 \mu\text{m}$  an. Ergebnisse für den hier beschriebenen Base-Case Parametersatz unter alleiniger Änderung der Mitochondrienlänge  $l$  sind im Anhang A.2 für die beiden Parameter  $l = 2 \mu\text{m}$  und  $l = 3 \mu\text{m}$  zu sehen. Die Standard- oder Base-Case-Parameter sind in Tabelle 6.1 noch einmal zusammengefasst.

	1D-Modell	3D-Äquivalent
$c_{\text{rest}}$	$4 \mu\text{m}^{-1}$	$0,1 \mu\text{M}$
$k_{\text{CRAC}}$	$100 \text{ s}^{-1}$	$5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$
$k_{\text{PMCA}}$	$25 \mu\text{m s}^{-1}$	$3,84 \cdot 10^5 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$k_{\text{in}}$	$25 \mu\text{m s}^{-1}$	$3,84 \cdot 10^5 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$L$	$10 \mu\text{m}$	
$l = x_{\text{out}} - x_{\text{in}}$	$1 \mu\text{m}$	
$x_{\text{in}}$	$0,1 - 5 \mu\text{m}$	

Tabelle 6.1: Base-Case Parameter des 1D-Modells.

### 6.2.3 Ergebnisse

Betrachtet man die stationäre Lösung (6.9) der Modellgleichung, so erkennt man sofort zwei Dinge. Zum einen, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an der IS (sehr nahe an  $x = 0$ ) unabhängig von der Wahl der Parameter mit wachsendem Abstand der Mitochondrien zur IS (größere Werte von  $x_{\text{in}}$ ) ansteigt. Zum anderen sieht man, dass gleichzeitig die globale zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $c_2$  bzw. der Mittelwert  $(c_2 + c_3)/2$ ) mit wachsendem Abstand  $x_{\text{in}}$  abnimmt. Somit sagt das Modell voraus, dass die Mitochondrienbewegung hin zur IS hinreichend ist, um bei extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch aktivierte CRAC-Kanäle die globalen Calcium-Signale zu erhöhen. Gleichzeitig wird die lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an der IS reduziert, falls sich die Mitochondrien den CRAC-Kanälen annähern.

In Abbildung 6.2 sind die Ergebnisse des Modells für verschiedene Werte des Parameters  $k_{\text{in}}$  zu sehen. Die ansonsten verwendeten Parameter entsprechen den im vorigen Abschnitt diskutierten Base-Case Werten und die Ergebnisse wurden unter Verwendung der Gleichungen 6.9 berechnet. In Abbildung 6.2 a)-b) ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als Funktion des Ortes  $x$  für verschiedene Mitochondrienpositionen  $x_{\text{in}}$  und verschiedene Werte des Parameters  $k_{\text{in}}$  dargestellt. Wie erwartet ist die Calciumkonzentration an der IS umso geringer, je kleiner der Abstand der Mitochondrien zur IS ist. Gleichzeitig steigt jedoch die Calciumkonzentration im Inneren der Zelle mit kleiner werdendem Abstand der Mitochondrien zur IS an. Beide Effekte werden durch eine Erhöhung der Calcium-Aufnahmeraten der Mitochondrien  $k_{\text{in}}$  weiter verstärkt, was ein Vergleich der Teilabbildungen a) und b) direkt zeigt. In Abbildung 6.2 c)-d) ist ein Vergleich der lokalen Calciumkonzentration an der IS  $c_{\text{IS}} = c_0$  und der globalen / zytosolischen Calciumkonzentration  $c_{\text{global}}$  zu sehen, wobei  $c_{\text{global}}$  wie folgt definiert ist

$$\begin{aligned}
 c_{\text{global}} &= L^{-1} \int_0^L dx c_s(x) \\
 &= L^{-1} [x_{\text{in}}(c_0 + c_1)/2 + l(c_1 + c_2)/2 + (L - l - x_{\text{in}})(c_2 + c_3)/2] .
 \end{aligned} \tag{6.11}$$

Zusätzlich zu dem generellen Trend, dass lokale und globale Calciumkonzentrationen gegensätzliche Verhalten zeigen, wenn die Mitochondrienposition  $x_{\text{in}}$  verändert wird, kann

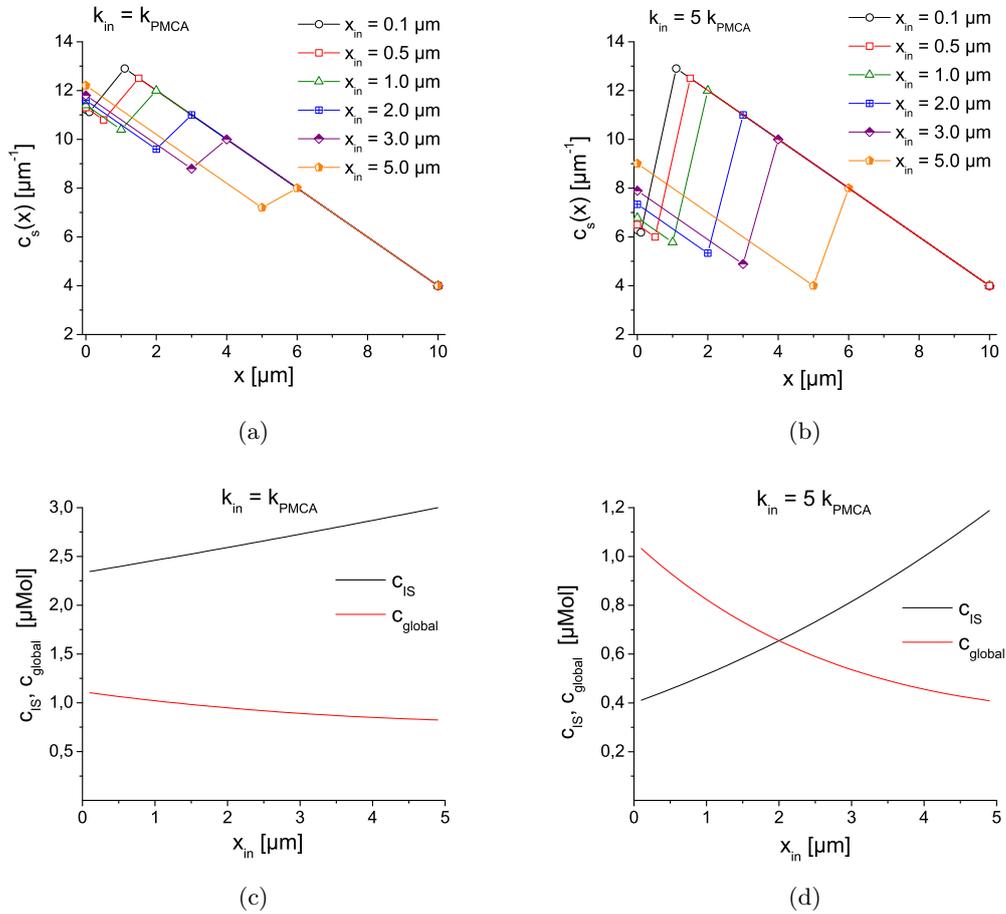


Abbildung 6.2: Lokale und globale Calcium-Signale des 1D-Modells. a) - b) Stationäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $c_s(x)$  als Funktion von  $x$  für verschiedene Mitochondrienpositionen  $x_{\text{in}}$  und verschiedene mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmeraten  $k_{\text{in}}$ . c) - d) Vergleich der stationären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an der Immunologischen Synapse,  $c_{\text{IS}} = c_0$  und der gemittelten globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $c_{\text{global}}$  als Funktion des Abstandes  $x_{\text{in}}$  zwischen IS und Mitochondrien für verschiedene mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmeraten  $k_{\text{in}}$ . Die 1D  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, die mit Hilfe des Modells berechnet werden, sind mit der Formel (6.10) in die korrespondierenden 3D  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in der Einheit  $[\mu\text{M}]$  umgerechnet worden.

für hohe Calcium-Aufnahmeraten der Mitochondrien  $k_{in}$  sogar erreicht werden, dass die globale Konzentration die lokale Konzentration übersteigt (siehe Abbildung 6.2 d)). Bei Verschiebung der Mitochondrien von der Zellmitte in die Nähe der IS ( $x_{in} < 0,5 \mu\text{m}$ ) kommt es zu einer Verdoppelung der globalen Calciumkonzentration. Die qualitativ gleichen Resultate erhält man auch für realistischere / komplexere Varianten dieses 1D-Modells. Die zu Abbildung 6.2 korrespondierenden Ergebnisse für zwei Erweiterungen des Modells sind im Anhang A.2.1 in den beiden Abbildungen A.7 und A.8 zu sehen. Die erste Erweiterung wurde bereits in Quintana et al. [13] diskutiert und unterscheidet sich zu dem von mir diskutierten Modell darin, dass in unmittelbarer Umgebung zur IS im Abstand  $x = 0,1 \mu\text{m}$  eine zusätzliche PMCA-Pumpe positioniert ist. Die zweite Modell-Erweiterung sieht vor, dass das Calcium, das von den Mitochondrien an der Position  $x_{in}$  aufgenommen wird, innerhalb der Mitochondrien diffundiert. Diese Diffusion ersetzt die in der obigen Modell-Definition instantane Freisetzung des aufgenommenen Calciums an der Position  $x_{out}$ . Die mathematischen Lösungen dieser beiden Modellvarianten sind ebenfalls im Anhang A.2.1 zu finden.

Man würde zwar sicherlich erwarten, dass sich die Calciumkonzentration an der Position der Einstrom-Quelle verringert, wenn man eine Senke in der Nähe der Quelle positioniert. Gleichzeitig rechnet man auch mit einer erhöhten Konzentration am Ort der Calcium-Freisetzung. Dass sich jedoch die Gesamtmenge Calcium innerhalb der Zelle deutlich erhöhen lässt, indem man ohne weitere Annahmen lediglich eine räumliche Umverteilung der Mitochondrien vornimmt, ist eine äußerst interessante und auf den ersten Blick nicht triviale Vorhersage dieses einfachen eindimensionalen Modells. Um den physikalischen Effekt, der hinter diesen Ergebnissen steckt, besser zu verstehen, stelle ich im nächsten Abschnitt ein Modell-System vor, welches dem 1D-Modell sehr ähnlich ist und die Diffusion durch einen diskreten Teilchen Random Walk ersetzt.

### 6.3 1D-Modell eines Random Walks / Effekt der Randbedingungen

Im vorigen Abschnitt konnte bereits mit Hilfe eines sehr einfachen 1D-Modells gezeigt werden, dass die Mitochondrienposition sowohl die lokalen als auch die globalen Calcium-Signale in T-Zellen beeinflusst. Dabei liefert die Positionierung der Mitochondrien innerhalb des Zytoplasmas und relativ zur Immunologischen Synapse (IS) bzw. relativ zur Position der CRAC-Kanäle den entscheidenden Parameter, was im Ergebnisteil (Abschnitt 6.2.3) erläutert ist. Dort habe ich auch bereits erwähnt, dass es durchaus nicht verwunderlich ist, dass die lokale Calciumkonzentration nahe der IS umso geringer wird, je kürzer die Distanz zwischen den Mitochondrien und der IS ist. Dies resultiert aus der Tatsache, dass die Mitochondrienspitze in dem Modellgleichungs-System eine Calcium-Senke darstellt. Die Möglichkeit, die Gesamtmenge an Calcium innerhalb der Zelle durch ein Heranrücken der Mitochondrien an die Position des Calcium-Einstroms deutlich zu erhöhen, stellt eine beachtenswerte und in dieser Form unerwartete Vorhersage des Mo-

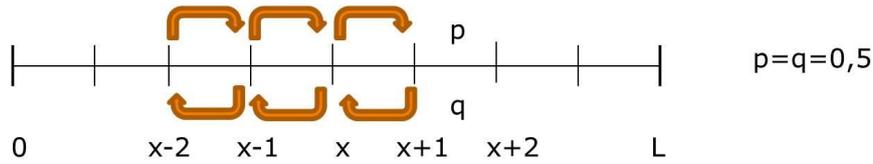


Abbildung 6.3: Skizze eines diskreten und symmetrischen eindimensionalen Random Walks auf dem Intervall  $[0, L]$ . Der Abstand zwischen den Gitter- oder Kettenpositionen ist immer gleich, und die Wahrscheinlichkeit  $q$  des Random Walkers, nach links bzw. die Wahrscheinlichkeit  $p$ , nach rechts zu springen, sind gleich groß. Dabei gilt  $p=q=0,5$ .

dells dar.

Um den physikalischen Effekt, der für diese Ergebnisse verantwortlich ist, etwas genauer zu beleuchten, stelle ich im Folgenden ein weiteres eindimensionales, jedoch stochastisches Modell vor. Es handelt sich hierbei um das Modell eines symmetrischen und diskreten 1D Random Walks, das dem deterministischen 1D-Modell des vorigen Abschnittes sehr ähnlich ist, bei dem jedoch die Diffusion durch einen diskreten Teilchen Random-Walk ersetzt wird.

Das von mir betrachtete Modell-System wird durch einen symmetrischen und diskreten Random Walk in einer Dimension auf dem Gitter  $\{0, 1, 2, \dots, L\}$  modelliert. Das Teilchen bzw. der Random Walker startet zur Zeit  $t = 0$  an der Position  $n \in [0, L - 1]$  und führt dann zu diskreten Zeiten zufällig Schritte bzw. Sprünge nach links oder rechts aus. Dabei bezeichnet  $p$  die Wahrscheinlichkeit, einen Schritt nach rechts zu machen, und  $q = 1 - p$  die Wahrscheinlichkeit, einen Schritt nach links zu machen. Ich interessiere mich hier speziell für den ungerichteten oder symmetrischen Random Walk, bei dem  $p = q = 0,5$  gilt, und der analog zur Diffusion ist. Die aktuelle Position des Teilchens oder Random Walkers wird durch die  $x$ -Koordinate der jeweiligen Gitter- oder Kettenposition beschrieben (siehe Abbildung 6.3). Eine wichtige Eigenschaft des Random Walks ist die Unabhängigkeit der einzelnen Schritte. Für den  $i$ -ten Schritt ist es ohne Bedeutung, welche Positionen das Teilchen / der Random Walker in der Vergangenheit besucht hat. Der aktuelle Schritt hängt nur von der aktuellen Position  $x$  ab; es handelt sich beim Random Walk also um einen Markov-Prozess. Im Folgenden werde ich noch einige Eigenschaften des diskreten 1D Random Walks präsentieren, bevor ich diese im Anschluss daran auf den konkreten Fall der Calcium-Signale in T-Zellen und deren Abhängigkeit von der Mitochondrienposition übertrage.

$P(x, N)$  ist die Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich der Random Walker nach  $N$  Zeitschritten an der Position  $x$  befindet. Die Entwicklung dieser Besetzungswahrscheinlichkeit wird durch folgende Master-Gleichung beschrieben:

$$P(x, N + 1) = p \cdot P(x - 1, N) + q \cdot P(x + 1, N) . \quad (6.12)$$

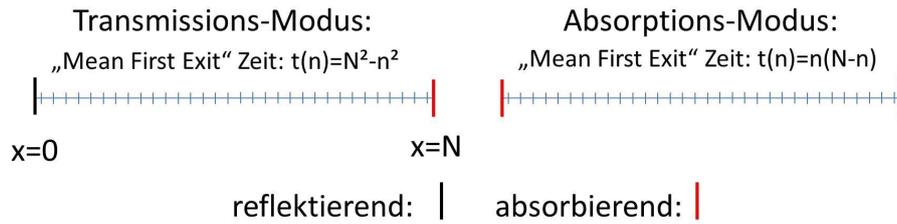


Abbildung 6.4: Diskreter 1D Random Walk mit mindestens einer absorbierenden Randbedingung. Man unterscheidet je nach Art der Randbedingungen zwischen Transmissions- und Absorptions-Modus. Für die beiden Modi ergeben sich unterschiedliche Ausdrücke für die „Mean First Exit“ Zeit  $t(n)$ , die es im Mittel dauert, bis ein Random Walker, der an Position  $n$  startet, an der Systemberandung absorbiert wird.

Im Fall eines symmetrischen Random Walks ( $p = q = 0,5$ ) besitzt sie die Lösung

$$P(x, N) = \frac{N}{\left(\frac{N+x}{2}\right)! \left(\frac{N-x}{2}\right)!} p^{(N+x)/2} q^{(N-x)/2} . \quad (6.13)$$

Im Grenzfall für lange Zeiten führt diese Binomialverteilung unter Ausnutzung der Stirling-Formel auf den Ausdruck für die Gaußsche Wahrscheinlichkeitsverteilung

$$P(x, N) = \frac{1}{\sqrt{2\pi Npq}} e^{[-x-N(p-q)]^2/8Npq} . \quad (6.14)$$

Eine sehr interessante Fragestellung ergibt sich für den 1D Random Walk, wenn mindestens eine der beiden Intervallenden 0 oder  $L$  als absorbierender Systemrand vorliegt. Abhängig von der Art der Randbedingungen können drei Fälle unterschieden werden, die im Allgemeinen als i) Absorptions-Modus ii) Transmissions-Modus und iii) Reflektions-Modus bezeichnet werden.

Für meine Untersuchungen sind nur die ersten beiden Fälle interessant: der Absorptions-Modus, der sich dadurch auszeichnet, dass beide Systemränder absorbierende Berandungen darstellen sowie der Transmissions-Modus, der sich dadurch auszeichnet, dass eine absorbierende und eine reflektierende Berandung vorliegen (siehe Abbildung 6.4). Ist mindestens einer der beiden Systemränder absorbierend, so ergeben sich unmittelbar mehrere interessante Fragestellungen, die in der Literatur unter dem Begriff „First Passage“ Phänomene studiert und diskutiert werden. Eine sehr gute Einführung in die Physik und Mathematik der „First Passage“ Phänomene stellt zum Beispiel das Buch von Sydney Redner dar [138]. Eine Frage in diesem Kontext lautet zum Beispiel: Wie lange dauert es, bis der Random Walker das System verlässt, also einen der absorbierenden Systemränder erreicht und dort absorbiert wird? Die dafür benötigte Zeitspanne wird im Allgemeinen „Mean First Exit Time“ oder im folgenden „Mean First Exit“ Zeit genannt. Befindet man sich im Absorptions-Modus, kann man zusätzlich noch die Frage nach der bedingten oder konditionellen „Mean First Exit“ Zeit stellen. Dies ist die

Zeit, die der Random Walker benötigt, um einen bestimmten der beiden absorbierenden Systemränder zu erreichen. In Abhängigkeit der Startposition  $n$  des Random Walkers ergeben sich für die beiden Fälle folgende Ausdrücke der „Mean First Exit“ Zeiten  $t(n)$ :

$$\text{Absorptions – Modus : } t(n) = n \cdot (L - n), \quad (6.15)$$

$$\text{Transmissions – Modus : } t(n) = L^2 - n^2. \quad (6.16)$$

Für den Absorptions-Modus können noch zusätzlich die bedingten „Mean First Exit“ Zeiten  $t_{\text{links}}(n)$  und  $t_{\text{rechts}}(n)$  angegeben werden. Dies geschieht unter Ausnutzung der Teil-Wahrscheinlichkeiten  $p_{\text{links}}(n)$  und  $p_{\text{rechts}}(n)$ , die in Abhängigkeit der Startposition des Random Walkers die Wahrscheinlichkeit dafür angeben, den linken bzw. rechten Systemrand zu erreichen. Im Falle des 1D symmetrischen Random Walks erhält man diese beiden Wahrscheinlichkeiten zu

$$p_{\text{links}}(n) = 1 - n/L \quad (6.17)$$

$$p_{\text{rechts}}(n) = n/L, \quad (6.18)$$

und somit erhält man für die bedingten „Mean First Exit“ Zeiten (Herleitung und Beweis der Formeln 6.15-6.20, siehe z.B. Redner [138]):

$$t_{\text{links}}(n) = n/3 \cdot (2L - n) \quad (6.19)$$

$$t_{\text{rechts}}(n) = 1/3 \cdot (L^2 - n^2). \quad (6.20)$$

Da nun die wichtigsten Eigenschaften des symmetrischen und diskreten 1D Random Walks inklusive der „Mean First Exit“ Zeit vorgestellt wurden, kann ich damit beginnen, das stochastische 1D T-Zell Modell zu diskutieren. Es soll das Analogon zu dem im vorigen Abschnitt vorgestellten deterministischen 1D-Modell bilden und dabei helfen, jenen physikalischen Effekt besser zu verstehen, der für die Erhöhung des globalen Calcium-Signals in T-Zellen in Abhängigkeit der Mitochondrienposition verantwortlich ist. Diffusion von Teilchen und der Prozess des Random Walks sind mikroskopisch betrachtet unterschiedliche Mechanismen. Da aber im Limes für lange Zeiten die Eigenschaften eines diffundierenden Teilchens und die eines Random Walkers (inklusive der „First Passage“ Phänomene) übereinstimmen, können die Ergebnisse des 1D Random Walk Modells mit denen des deterministischen 1D-Modells verglichen werden.

Ich betrachte hier - wie bereits erwähnt - einen 1D diskreten Random Walk auf dem Intervall  $[0, L]$ . Wiederum nehme ich eine T-Zelle der Länge  $10 \mu\text{m}$  an und unterteile die eindimensionale Strecke in 100 Gitterpunkte mit einem diskreten Abstand von  $0,1 \mu\text{m}$ . Analog zum 1D-Modell des vorigen Abschnitts sollen sich am linken Systemrand bei  $x=0$  der CRAC-Kanal und am rechten Systemrand bei  $x=L$  die PMCA-Pumpen befinden. Dies wird hier im Random Walk Modell dadurch realisiert, dass der Random Walker an der Position  $x=0$  startet (bzw. das System „betritt“) und rechts ein absorbierender Rand (PMCA-Pumpe) vorliegt. Die linke Systemberandung wird durch eine reflektierende Randbedingung modelliert (siehe Abbildung 6.5). Ich nehme ein Mitochondrium der

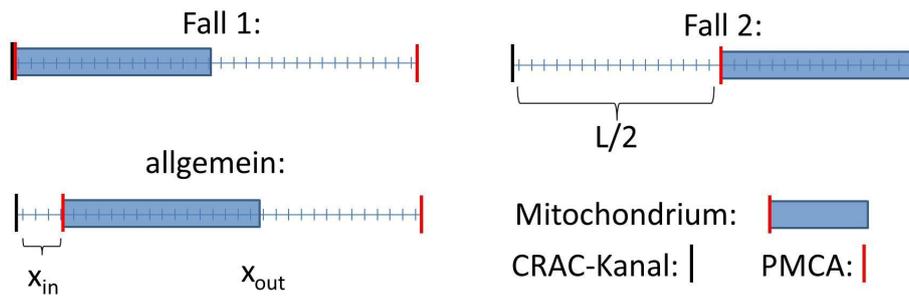


Abbildung 6.5: Skizze des 1D Random Walk Modells zur Untersuchung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen in T-Zellen. Der CRAC-Kanal (schwarz) befindet sich bei  $x=0$  und stellt die Startposition des Random Walkers zum Zeitpunkt  $t=0$  dar. Am rechten Systemrand bei  $x=L$  befinden sich die PMCA-Pumpen (rot), die den Random Walker aus dem System hinaus befördern, sobald er diese Position erreicht. Das Mitochondrium (blau) ist halb so lang wie die T-Zelle und nimmt den Random Walker am vorderen Ende (rot) bei  $x = x_{in}$  auf und gibt ihn instantan am hinteren Ende bei  $x = x_{out}$  wieder ins System ab. Im Fall 1 befindet sich das Mitochondrium unmittelbar an der Immunologischen Synapse bzw. den CRAC-Kanälen an der Position  $x=0$  und bedeckt die linke Systemhälfte. Im zweiten Fall befindet sich das Mitochondrium in der rechten Hälfte der Zelle.

Länge  $L/2$  an, welches analog zum deterministischen Modell an seiner vorderen Spitze ( $x = x_{in}$ ) das Calcium bzw. den Random Walker absorbiert und dann instantan am hinteren Ende ( $x = x_{out}$ ) wieder in das System freisetzt. Der linke Rand des Mitochondriums wird als absorbierende Randbedingung modelliert, wohingegen der rechte Rand für den Random Walker keine „echte“ Randbedingung darstellt; d.h. er kann sich auch auf den Gitterpunkten, die das Mitochondrium modellieren, frei bewegen. Des Weiteren nehme ich an, dass die absorbierenden Randbedingungen (PMCA-Pumpe und Mitochondrien spitze) den Random Walker mit Sicherheit, also mit der Wahrscheinlichkeit  $p_{\text{absorb}} = 1$ , aufnehmen bzw. aus dem System befördern. Im Gegensatz zum deterministischen 1D-Modell kann deshalb im Random Walk Modell keine Aussage über die Abhängigkeit der Calcium-Signale von der PMCA-Pumpstärke oder der Stärke der mitochondrialen Calcium-Aufnahme gemacht werden. Lediglich die Abhängigkeit der globalen Calcium-Signale von der Mitochondrienposition  $x_{in}$  soll mit Hilfe des Random Walk Modells untersucht werden.

Ich berechne in Abhängigkeit von der Mitochondrienposition  $x = x_{in}$  die „Mean First Exit“ Zeit des Random Walks - die über viele Systemrealisierungen gemittelt - ein Maß für die globale Calciumkonzentration darstellt. Zunächst möchte ich noch die beiden „Extremfälle“ 1 und 2 (siehe Abbildung 6.5) diskutieren und deren „Mean First Exit“ Zeit angeben. Im ersten Fall befindet sich das Mitochondrium unmittelbar vor dem CRAC Kanal an der Position  $x=0$  und füllt die linke Systemhälfte aus. Im zweiten Fall befindet sich das Mitochondrium genau in der Mitte des Systems an der Position  $x=L/2$  und füllt

die rechte Systemhälfte aus.

Im Fall 1 wird der Random Walker sofort nach Betreten des Systems vom Mitochondrium absorbiert und an der Position  $x = x_{\text{out}} = L/2$  wieder ins System freigesetzt. Dadurch wird die Startposition  $n$  des Random Walkers effektiv von  $n=0$  zu  $n=L/2$  verschoben, und der Random Walker beginnt dann zum Zeitpunkt  $t=1$  von der Mitte des Systems aus mit seiner Bewegung, dem zufälligen nach links oder rechts „Wandern / Springen“. Für diesen Fall möchte ich hier eine untere Schranke für die „Mean First Exit“ Zeit berechnen. Dabei vernachlässige ich die Tatsache, dass der Random Walker bei Erreichen des linken Systemrandes an der Position  $x=0$  wieder von dem Mitochondrium in die Systemmitte transportiert wird, wodurch das „Spiel“ erneut beginnt. Ich gehe also zunächst einmal davon aus, dass der Random Walker sowohl links als auch rechts vollständig absorbiert wird. Die „Mean First Exit“ Zeit (Zeit nach der der Random Walker zum ersten Mal absorbiert wurde, egal ob rechts oder links) berechnet sich in dann auf die gleiche Art, wie für ein System im Absorptions-Modus (siehe Abbildung 6.4), bei dem der Random Walker in der Mitte des Systems startet, und man erhält die „Mean First Exit“ Zeit zu:

$$t(L/2)_{1,\text{untere}} = L/2 \cdot (L - L/2) = L^2/4. \quad (6.21)$$

Da der Random Walker bzw. das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion nach Erreichen des linken Randes eigentlich vom Mitochondrium absorbiert und wieder in der Systemmitte freigesetzt wird, ist die „Mean First Exit“ Zeit  $t(L/2)_1$  für Fall 1 also immer größer als die gerade berechnete untere Schranke und es gilt:  $t(L/2)_1 \geq t(L/2)_{1,\text{untere}}$ .

Im Fall 2 legt der Random Walker eine Strecke  $L/2$  zurück, bis er vom Mitochondrium absorbiert wird. Er wird dann unverzüglich zum absorbierenden rechten Rand transportiert, was wiederum bedeutet, dass er das System umgehend verlässt. In diesem Fall ist die „Mean First Exit“ Zeit gleich der eines Systems mit einem reflektierenden und einem absorbierenden Rand, also gleich der „Mean First Exit“ Zeit eines Systems mit halbiertes Systemlänge, das sich im Transmissions-Modus befindet. Die „Mean First Exit“ Zeit  $t(0)_2$  (Systemlänge  $L/2$ ) für Fall 2 ergibt sich also zu:

$$t(0)_2 = (L/2)^2 - 0 = L^2/4. \quad (6.22)$$

Fasst man diese Überlegungen zusammen, so erhält man:

$$t(L/2)_1 \geq t(L/2)_{1,\text{untere}} = L^2/4 = t(0)_2. \quad (6.23)$$

Man erkennt bereits hier, dass die „Mean First Exit“ Zeit - bei Mittelung über viele Systemrealisierungen ein Maß für die globale Calciumkonzentration - umso größer ist, je näher sich die Mitochondrien am CRAC-Kanal befinden. Der exakte Wert für  $t(L/2)_1$  ergibt sich als Spezialfall ( $x_{\text{in}} = 0$ ) der allgemeinen Lösung des Modells (Gleichung 6.33) zu  $L^2/2$ , wie nun im Folgenden hergeleitet wird.

Betrachtet man den allgemeinen Fall, der in Abbildung 6.5 skizziert ist, so kann man die „Mean First Exit“ Zeit durch Aufspaltung in zwei Teile  $t_I$  und  $t_{II}$  berechnen, wie im Folgenden erläutert wird. Der Random Walker startet wiederum an Position  $x=0$  (CRAC-Kanal) und „sieht“ zunächst ein System der Länge  $x_{\text{in}}$ , wobei dieses System

links von einem reflektierenden Rand und rechts von einem absorbierenden Rand (Mitochondrienspitze) begrenzt wird. Der erste Anteil zur „Mean First Exit“ Zeit berechnet sich demnach als „Mean First Exit“ Zeit eines Random Walks in einem System der Länge  $x_{in}$ , welches sich im Transmissions-Modus befindet:

$$t_I(0) = x_{in}^2 - 0 = x_{in}^2. \quad (6.24)$$

Nachdem der Random Walker im verkürzten System I den rechten Rand erreicht hat, wird er vom Mitochondrium absorbiert (im Mittel nach der Zeit  $t_I(0) = x_{in}^2$ ) und dann an der Position  $x = x_{out}$  wieder in das System freigesetzt. Nun „sieht“ der Random Walker ein um  $x_{in}$  verkürztes System II mit zwei absorbierenden Rändern, das sich im Absorptions-Modus befindet. Die gesamte „Mean First Exit“ Zeit setzt sich also aus  $t_I(0) = x_{in}^2$  plus der noch zu bestimmenden Zeit  $t_{II}$  zusammen. Das System II besitzt die verkürzte Länge  $L' = L - x_{in}$ . Trifft der Random Walker bei seiner Zufallsbewegung auf den rechten Rand ( $x = L'$ , PMCA-Pumpe), so verlässt er das System. Trifft er auf den linken Rand ( $x = 0'$ , Mitochondrienspitze), so wird er wieder zum Punkt  $x = x'_{out} = x_{out} - x_{in}$  transportiert. Jedes mal, wenn der Random Walker zuerst die linke und nicht die rechte Systemberandung erreicht, beginnt das „Spiel“ erneut, und man erhält einen zusätzlichen Beitrag zur „Mean First Exit“ Zeit. Deshalb muss man nun die konditionelle bzw. bedingte „Mean First Exit“ Zeit  $t_{II}$  berechnen, nach der der Random Walker zum ersten Mal den rechten Rand berührt und das System verlässt. Dies geschieht unter der Bedingung, dass der Random Walker zuvor null mal, einmal, zweimal, ..., k-mal den linken Rand berührt hat.  $t_{II}(x'_{out}) = t_{II}(x_{out} - x_{in})$  ist die Summe aus allen Möglichkeiten, im Absorptions-Modus den rechten Rand (PMCA-Pumpe) zu erreichen. Dabei kann der Random Walker vorher bereits mehrmals den linken Rand ( $x = x_{in}$ ) berührt haben (wird vom Mitochondrium wieder an die Stelle  $x'_{out}$  transportiert) und jeweils wieder bei  $x = x'_{out} = x_{out} - x_{in}$  gestartet sein. Startpunkt des Random Walkers ist also  $x = x'_{out} = x_{out} - x_{in} = l_{Mito}$ , die Distanz zum rechten Rand ist  $L - x_{in} - (x_{out} - x_{in})$  und zum linken Rand  $l_{Mito} = x_{out} - x_{in}$ . Das System hat die Länge  $L' = L - x_{in}$ , und die Länge des Mitochondriums  $l_{Mito} = x_{out} - x_{in}$  ist konstant. Die Wahrscheinlichkeit, vom linken Rand absorbiert zu werden, beträgt im Absorptions-Modus allgemein  $p_{links}(n) = 1 - n/L$ , hier also

$$\begin{aligned} p_{links}(x'_{out}) &= 1 - (x_{out} - x_{in})/(L - x_{in}) \\ &= 1 - l_{Mito}/(L - x_{in}), \end{aligned} \quad (6.25)$$

und die Wahrscheinlichkeit, vom rechten Rand absorbiert zu werden, allgemein  $p_{rechts}(n) = n/L$ , hier also

$$\begin{aligned} p_{rechts}(x'_{out}) &= (x_{out} - x_{in})/(L - x_{in}) \\ &= l_{Mito}/(L - x_{in}). \end{aligned} \quad (6.26)$$

Die bedingten „Mean First Exit“ Zeiten betragen für mein Modell

$$\begin{aligned}
 t_{\text{links}}(x'_{\text{out}}) &= \frac{x_{\text{out}} - x_{\text{in}}}{3} (2(L - x_{\text{in}}) - (x_{\text{out}} - x_{\text{in}})) \\
 &= \frac{l_{\text{Mito}}}{3} (2(L - x_{\text{in}}) - l_{\text{Mito}}),
 \end{aligned} \tag{6.27}$$

und

$$\begin{aligned}
 t_{\text{rechts}}(x'_{\text{out}}) &= \frac{1}{3} ((L - x_{\text{in}})^2 - (x_{\text{out}} - x_{\text{in}})^2) \\
 &= \frac{1}{3} ((L - x_{\text{in}})^2 - l_{\text{Mito}}^2).
 \end{aligned} \tag{6.28}$$

Betrachtet man das in Abbildung 6.6 dargestellte Baumdiagramm, so kann man sich leicht überlegen, wie sich die gesamte „Überlebenszeit“  $t_{\text{II}}(x'_{\text{out}})$  des Random Walkers bis zum ersten Ausstieg durch den rechten Rand zusammensetzt. Die Zeit  $t_{\text{II}}(x'_{\text{out}})$  ergibt sich zu:

$$\begin{aligned}
 t_{\text{II}}(x'_{\text{out}}) &= p_l^0 p_r \cdot (0 \cdot t_l + t_r) + p_l^1 p_r \cdot (1 \cdot t_l + t_r) + p_l^2 p_r \cdot (2 \cdot t_l + t_r) + \dots \\
 &= p_r \sum_{z=0}^{\infty} p_l^z t_r + p_r \sum_{z=1}^{\infty} p_l^z \cdot (z \cdot t_l),
 \end{aligned} \tag{6.29}$$

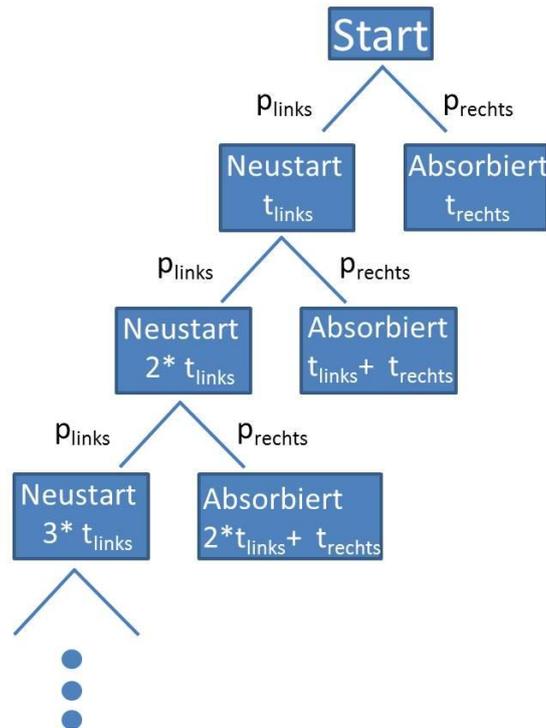


Abbildung 6.6: Baumdiagramm zur Bestimmung der „Mean First Exit“ Zeit des Random Walkers bei Absorption durch ein Mitochondrium.

wobei  $p_r$  für  $p_{\text{rechts}}$  und  $p_l$  für  $p_{\text{links}}$  als Abkürzung gewählt wurde. Setzt man für diese beiden geometrischen Reihen ihre Grenzwerte ein, so erhält man:

$$\begin{aligned} t_{\text{II}}(x'_{\text{out}}) &= p_r \cdot \frac{1}{1-p_l} \cdot t_r + p_r \cdot \frac{p_l}{(1-p_l)^2} \cdot t_l \\ &= \frac{p_r}{p_r} \cdot t_r + \frac{p_r p_l}{p_r^2} \cdot t_l = t_r + \frac{p_l}{p_r} \cdot t_l, \end{aligned} \quad (6.30)$$

wobei hier

$$\sum_{k=0}^{\infty} q^k = \frac{1}{1-q}, \quad (6.31)$$

und

$$\sum_{k=0}^{\infty} k \cdot q^k = \frac{q}{(1-q)^2}, \quad (6.32)$$

ausgenutzt wurde. Insgesamt erhält man für die „Mean First Exit“ Zeit  $t_{\text{exit}}$  des von mir betrachteten Random Walk Systems:

$$\begin{aligned} t_{\text{exit}} &= t_{\text{I}} + t_{\text{II}} \\ &= x_{\text{in}}^2 + t_r + \frac{p_l}{p_r} \cdot t_l. \end{aligned} \quad (6.33)$$

Die analytische Lösung für die „Mean First Exit“ Zeit  $t_{\text{exit}}$  des von mir betrachteten 1D Random Walk Modells ist in Abbildung 6.7 a) (schwarze Kurve) in Abhängigkeit von der Mitochondrienposition  $x_{\text{in}}$  zu sehen. Daneben ist in der Abbildung auch die mittels Computersimulation berechnete „Mean First Exit“ Zeit  $t_{\text{exit}}$  in Abhängigkeit von der Mitochondrienposition  $x_{\text{in}}$  des 1D Random Walk Systems abgebildet. Die Länge der T-Zelle beträgt in beiden Fällen  $10 \mu\text{m}$  und die Diskretisierung wurde zu  $\Delta x = 0,1 \mu\text{m}$  gewählt, so dass die Zelle durch  $L = 100$  Gitterplätze repräsentiert wird. Die Mitochondrienlänge beträgt bei allen gezeigten Ergebnissen  $5 \mu\text{m}$ . Somit besetzten die Mitochondrien eine Strecke von  $l = L/2 = 50$  Gitterplätzen.

Zur Bestimmung der „Mean First Exit“ Zeit per Computersimulation startet der Random Walker an der Position  $x = 0$  und ich zähle die Anzahl an Schritten, die der Random Walker innerhalb der Zelle zurücklegt, bevor er von der PMCA-Pumpe nach außen transportiert wird. Diese Prozedur habe ich  $2 \cdot 10^5$ -mal mit unterschiedlicher Initialisierung des Zufallszahlengenerators ausgeführt und die „Mean First Exit“ Zeit dann aus Mittelung über diese  $2 \cdot 10^5$  Durchläufe berechnet. In der Abbildung 6.7 b) ist die lokale Calciumkonzentration bzw. die gemittelte Aufenthaltsdauer des Random Walkers in Abhängigkeit der Gitterposition für zwei verschiedene Mitochondrienposition  $x_{\text{in}}$  dargestellt.

Ein Vergleich mit den Resultaten des deterministischen 1D-Modells (Inset der Abbildung und Abbildung 6.2) zeigt, dass sich die Ergebnisse der beiden 1D-Modelle qualitativ nicht unterscheiden. Die „Mean First Exit“ Zeit  $t_{\text{exit}}$  gibt an, wie lange sich der Random Walker bzw. das Calcium-Ion im Mittel innerhalb der Zelle aufgehalten hat, bevor er / es von der PMCA-Pumpe aus der Zelle transportiert wurde. Dabei ergibt sich die „Mean First Exit“ Zeit  $t_{\text{exit}}$  als Summation über alle Aufenthaltsdauern des Random Walkers bzw.

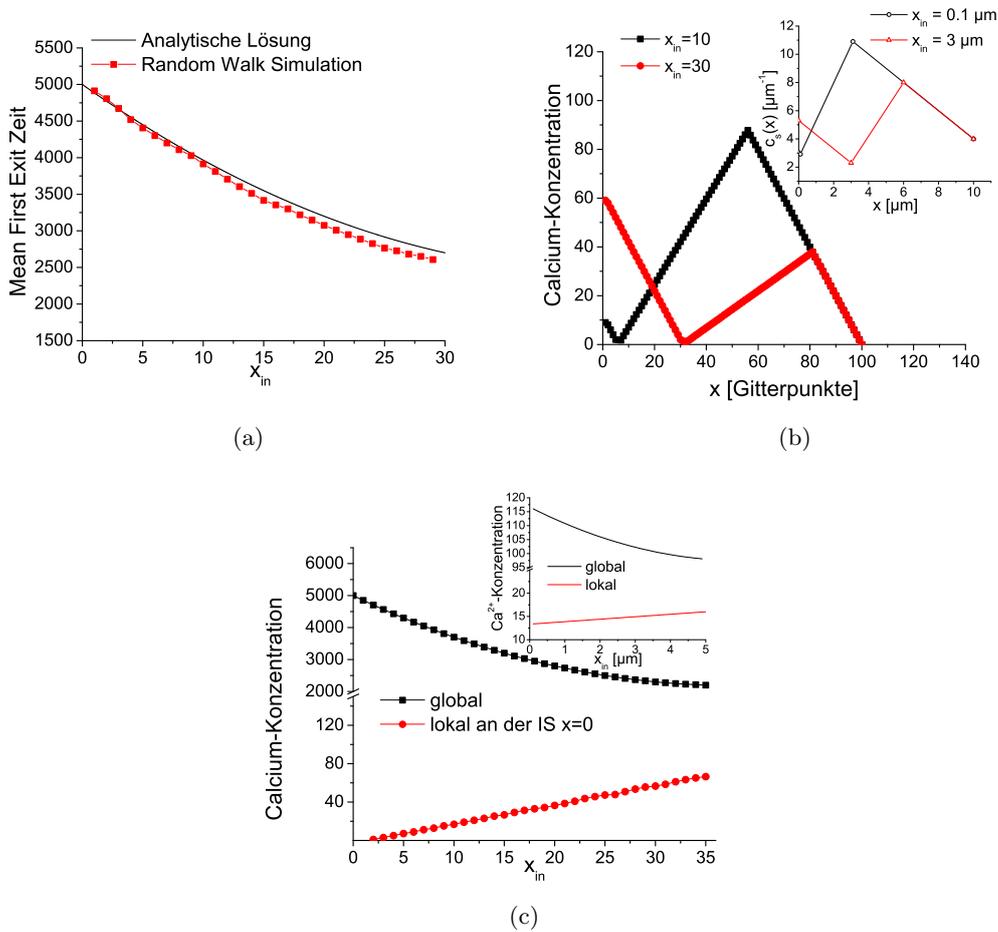


Abbildung 6.7: Ergebnisse des 1D Random Walk Modells. Die Zelllänge beträgt  $10 \mu\text{m}$  und wurde in  $L = 100$  Gitterplätze mit diskretem Abstand  $\Delta x = 0,1 \mu\text{m}$  aufgeteilt. Die Mitochondrienlänge beträgt  $l = L/2 = 5 \mu\text{m}$  und entsprechend  $l = 50$  Gitterplätze. a) Dargestellt ist die „Mean First Exit“ Zeit eines Calcium-Ions, die ein Maß für die globale Calciumkonzentration ist, in Abhängigkeit von der Mitochondrienposition  $x_{in}$ . Die rote Kurve wurde mittels einer Computersimulation berechnet ( $2 \cdot 10^5$  Mittelungen), die schwarze Kurve entspricht der analytischen Lösung aus Gleichung 6.33. b) Die per Computersimulation berechnete Calciumkonzentration innerhalb der Zelle für zwei verschiedene Mitochondrienpositionen  $x_{in}$ . Im Inset ist zum Vergleich die mittels deterministischem 1D-Modell berechnete Konzentration abgebildet (vgl. Abbildung 6.2). c) Auftragung der mittels Computersimulation bestimmten lokalen und globalen Calcium-Signale in Abhängigkeit der Mitochondrienposition  $x_{in}$ . Im Inset sind zum Vergleich die mittels deterministischem 1D-Modell berechneten Calcium-Signale abgebildet.

des Calcium-Ions an den unterschiedlichen Gitterplätzen, die in Teil b) der Abbildung aufgetragen sind. Die „Mean First Exit“ Zeit ist also ein Maß für die globale Calciumkonzentration, und würde man sie durch die Anzahl an Gitterplätzen dividieren, wäre sie das Analogon zur gemittelten zytosolischen Calciumkonzentration des deterministischen 1D-Modells. In Teil c) der Abbildung 6.7 ist die lokale und globale Calciumkonzentration des 1D Random Walk Modells als Funktion der Variablen  $x_{in}$  zu sehen. Man erkennt direkt, dass ebenso wie beim deterministischen 1D-Modell des vorigen Abschnitts (siehe auch Inset der Abbildung), wiederum die globale Calciumkonzentration mit kleinerem Abstand der Mitochondrien zum CRAC-Kanal ansteigt während gleichzeitig die lokale Calciumkonzentration mit kleinerem Abstand der Mitochondrien zum CRAC-Kanal abfällt.

Fasst man nun alle bisherigen Ergebnisse und Überlegungen zusammen, so kann man mit Hilfe des 1D Random Walk Modells sehr gut verstehen, wie die Mitochondrienposition die globalen Calcium-Signale kontrolliert. Die „Mean First Exit“ Zeit  $t_{exit}$ , die ein Maß für die globale Calciumkonzentration ist, hängt direkt vom Parameter  $x_{in}$  ab und steigt umso mehr an, je kleiner  $x_{in}$  ist. Dies wird sowohl an der Form der Gleichung 6.33 deutlich als auch an den Überlegungen zur Berechnung der „Mean First Exit“ Zeit  $t_{exit}$  für die beiden „Extremfälle“ 1 und 2 (siehe Abbildung 6.5).

Wie kann man sich dieses Resultat anschaulich erklären? Es gilt Folgendes: Sobald das Calcium-Teilchen bzw. der Random Walker das System am Ort  $x=0$  (CRAC-Kanal) betritt beginnt es / er mit seinem Random Walk innerhalb des ersten Teilsystems I der Länge  $x_{in}$ , das sich im Transmissions-Modus befindet. Am linken Rand dieses Teilsystems wird das Calcium-Teilchen reflektiert, und sobald es zum ersten Mal den rechten Systemrand an der Stelle  $x = x_{in}$  erreicht, wird es vom Mitochondrium absorbiert. Die Aufnahme durch das Mitochondrium hat zur Folge, dass das Calcium-Teilchen am Ende des Mitochondriums ( $x = x_{out}$ ) wieder in das Zytosol abgegeben wird und sich nun im Teilsystem II befindet. Das Teilsystem II besitzt eine um  $x_{in}$  verkürzte Länge und befindet sich im Absorptions-Modus, da beide Systemberandungen absorbierend sind. Der linke Rand wird von der Spitze des Mitochondriums gebildet. Erreicht das Calcium-Teilchen während des Random Walks die Mitochondrienspitze  $x = x_{in}$ , so wird es dort erneut absorbiert und an der Stelle  $x = x_{out}$  ins Zytosol freigesetzt. Bei Erreichen des rechten Systemrandes, der durch die Anhäufung von PMCA-Pumpen charakterisiert ist, wird das Calcium-Teilchen vollständig aus dem System bzw. aus der Zelle heraus transportiert. Es ist also logisch, dass sich das Calcium-Teilchen umso länger innerhalb der Zelle aufhält und bewegt, je öfter es im Laufe seiner Zufallsbewegung zuerst den linken und nicht den rechten Systemrand erreicht. Die Wahrscheinlichkeit  $p_{links}$ , den linken Rand zu erreichen, und damit auch die „Mean First Exit“ Zeit  $t_{links}$  sind umso größer, je kleiner  $x_{in}$  ist (siehe Gleichung 6.25 und 6.27), also umso näher das Mitochondrium dem CRAC-Kanal kommt. Dies kann man sich leicht damit erklären, dass sowohl die Wahrscheinlichkeiten  $p_{links,rechts}$  als auch die „Mean First Exit“ Zeiten  $t_{links,rechts}$  nur von den Streckenlängen im Teilsystem II bzw. der Gesamtlänge des Teilsystems II abhängen. Die Strecke  $s_{links}$ , die das Calcium-Teilchen bis zum linken Rand zurücklegen muss, entspricht gerade der Länge des Mitochondriums  $l = x_{in} - x_{out}$ , die immer konstant ist. Die Länge

der Strecke bis zu den PMCA-Pumpen am rechten Rand ergibt sich als Differenz der Zelllänge  $L$  minus der Länge des Mitochondriums und minus der Länge des Teilsystems I, also zu:

$$s_{\text{rechts}} = L - l - x_{\text{in}}. \quad (6.34)$$

Diese Strecke ist variabel und hängt von der Position des Mitochondriums  $x_{\text{in}}$  ab. Sie sollte möglichst groß sein, damit auch das Teilsystem II groß ist und sich das Calcium-Teilchen dort lange aufhält, bevor es bei seiner Zufallsbewegung den rechten Rand erreicht. Je kleiner die Distanz  $x_{\text{in}}$  zwischen Mitochondrium und CRAC-Kanal ist, umso größer wird das Teilsystem II. Der Grenzfall  $x_{\text{in}} = 0$  entspricht dem zuvor betrachteten Extremfall 1 aus Abbildung 6.5, für den eine untere Schranke der „Mean First Exit“ Zeit berechnet wurde. Zusammenfassend kann man sagen, dass man eine möglichst lange Verweildauer des Calcium-Teilchens in der Zelle dadurch erreicht, dass das Calcium-Teilchen in größtmöglicher Entfernung zu den PMCA-Pumpen (absorbierende Randbedingung) ins Zytosol freigesetzt wird. Ist das betrachtete Modell-System so aufgebaut wie im Fall des deterministischen und des stochastischen 1D-Modells (CRAC Kanal bei  $x=0$ , PMCA-Pumpen bei  $x=L$ ), so ist der Einfluss der absorbierenden Randbedingungen ausschlaggebend. Erst wenn man auch PMCA-Pumpen in der Nähe des Immunologischen Synapse und somit in der Nähe der CRAC-Kanäle annimmt, kommt noch ein zweiter Effekt hinzu, nämlich der Wettbewerb zwischen Mitochondrien und PMCA-Pumpen. Für das 3D-Modell des folgenden Abschnitts spielt der Wettbewerb um das in die Zelle einströmende Calcium eine wichtige Rolle. Im Anhang A.2.4 sind die beiden Effekte:

- Einfluss der Position der Randbedingungen
- Wettbewerb zwischen Mitochondrien und PMCA-Pumpen um das einströmende Calcium

für eine vereinfachte 3D-Würfelgeometrie nochmals verdeutlicht.

## 6.4 Dreidimensionales Reaktions-Diffusions Modell

### 6.4.1 Motivation und Vorbetrachtung

Zur vollständigen T-Zell-Aktivierung wird ein sehr spezielles, robustes Calcium-Signal benötigt. Die dazu erforderliche Hochregulierung der intrazellulären Calciumkonzentration ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zellorganellen (Zytosol, Mitochondrien, ER, usw.), verschiedener Calcium-Kanäle sowie unterschiedlicher Pumpen, die das Calcium zwischen den Zellorganellen hin und her transportieren. Um beispielsweise die experimentell beobachtete Mitochondrien-Translokation hin zur Immunologischen Synapse (IS) oder die Anhäufung von PMCA-Pumpen in der Nähe der IS zu verstehen [13, 72, 73], habe ich ein dreidimensionales Reaktions-Diffusions-Modell entwickelt, das im nächsten Abschnitt vorgestellt wird.

Bisher ist noch nicht vollständig geklärt, ob es physiologische Gründe für die Mitochondrien-Translokation hin zur IS und die PMCA-Akkumulation in der Nähe der IS gibt, oder ob diese beiden Prozesse nur eine Randerscheinung darstellen, und nicht essentiell für die T-Zell-Aktivierung sind. Die Ergebnisse der in den vorherigen Abschnitten diskutierten eindimensionalen Modelle liefern jedoch starke Hinweise darauf, dass die Position der Mitochondrien die Calcium-Signale in T-Zellen bestimmt. Aus diesem Grund soll mit Hilfe eines 3D-Modells analysiert werden, welchen Einfluss die räumliche Anordnung von Zellorganellen und den verschiedenen Calcium-Kanälen / Pumpen auf die entstehenden Calcium-Signale hat.

Mitochondrien wurden zu Beginn der Modellierung von Calcium-Signalen in der Literatur lange Zeit nicht berücksichtigt [114, 139]. Kurz vor der Jahrtausendwende häuften sich allerdings die experimentellen Beobachtungen - die nur exemplarisch von mir genannt werden können - dass Mitochondrien einen sehr großen Einfluss auf die Calcium-Signalgebung in unterschiedlichsten Zellen haben [69–71, 140, 141]. Bis heute Reihen sich zahlreiche weitere Experimente nahtlos ein, die ebenfalls die herausragende Stellung der Mitochondrien für die Calcium-Signalgebung schildern (z.B.: [13, 63, 64, 66, 73, 74], siehe Abschnitt 2.3.2).

Aus diesem Grund wurde die Modellierung von Mitochondrien im letzten Jahrzehnt bei der Entwicklung von theoretischen Modellen zur Calcium-Signalgebung mit einbezogen. Erste Modelle konnten zeigen, dass Mitochondrien maßgeblich die Amplitude der entstehenden Calcium-Signale beeinflussen [28–30, 142]. Dies ist im Prinzip damit zu erklären, dass die Mitochondrien große Mengen an Calcium sehr schnell aufnehmen und verzögert wieder abgeben und dadurch neben dem ER quasi einen zweiten Calcium-Pool darstellen. Fast alle Zell-Modelle, die Mitochondrien berücksichtigen, haben das Problem, dass sie lediglich die Pufferfunktion der Mitochondrien berücksichtigen und daneben von räumlich homogenen Calciumkonzentrationen ausgehen. Dass dies wahrscheinlich nicht der vollständig richtige Ansatz ist, lassen die Resultate der von mir vorgestellten 1D-Modelle vermuten. In den Abschnitten 6.2 und 6.3 habe ich gezeigt, dass die mitochondriale Calcium-Aufnahme und die Freisetzung in möglichst weiter Entfernung zu

den PMCA-Pumpen ausreichen, um eine erhöhte zytosolische Calciumkonzentration zu erhalten.

Aber noch immer wird die Rolle der Mitochondrien und die räumliche Anordnung der unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle / Pumpen in Modellen zur Calcium-Signalgebung unterschätzt. So vernachlässigt beispielsweise eine aktuelle theoretische Studie zur Calcium-Signalgebung in T-Zellen die Mitochondrien in ihrer Modellierung gänzlich [27]. Dies ist sehr kritisch zu sehen, da die Mitochondrien, wie bereits oben im Text erwähnt, einen sehr starken Einfluss auf die beobachteten Calcium-Signale haben. Durch die Existenz einer Kopplung zwischen den Mitochondrien und der ER-Membran (Review siehe z.B. [143]) und die aktive Bewegung der Mitochondrien in Richtung Zellmembran, regulieren die Mitochondrien beispielsweise die  $\text{IP}_3$ -Kanäle [70] und auch die CRAC-Kanäle [65]. Es bleibt jedoch die Frage, wie diese Modulation der Ionenkanäle genau funktioniert.

In den letzten Jahren haben mehrere theoretische Arbeiten gezeigt, dass die Calcium-Freisetzung durch den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor durch Calcium-Puffer erhöht werden kann [44, 144, 145]. Dies resultiert im Wesentlichen daraus, dass die Puffer die Calciumkonzentration in der Nähe des Kanals reduzieren und dadurch die Calcium abhängige Kanalinhibierung mindern. Auch der CRAC-Kanal wird durch die Ausbildung von Calcium-Mikrodomänen in Kanalnähe zumindest teilweise inhibiert (siehe Kapitel 2.4). Aus diesem Grund könnte man vermuten, dass ein zum  $\text{IP}_3$ -Rezeptor ähnlicher Effekt die Regulierung des CRAC-Kanals in T-Zellen bedingt. Die Schlussfolgerung wäre, dass die Pufferung von Calcium durch die Mitochondrien in der Nähe der IS für die CRAC-Kanal Regulierung verantwortlich ist. Allerdings erachte ich im Rahmen der T-Zell-Aktivierung den Abstand der Mitochondrien zum CRAC-Kanal als entscheidenden physikalischen Parameter. Im Gegensatz zur reinen Pufferung von Calcium und der damit einhergehenden Reduzierung der Calcium-Mikrodomäne sowie Kanalinhibierung ist die Umverteilung und Freisetzung von Calcium in weiter Entfernung zu den verschiedenen Calciumpumpen wichtig. Dies lassen die Resultate der 1D-Modelle vermuten, die ohne die Modellierung einer Calciumpufferung erzielt wurden. In den entsprechenden Abschnitten wurde gezeigt, dass eine Verschiebung der Mitochondrien hin zum Ort des Calciumeinstroms bereits zu einer erheblichen Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration führt, auch wenn von einer reinen  $\text{Ca}^{+2}$ -Aufnahme und -Umverteilung durch die Mitochondrien ausgegangen wird (Effekt der Randbedingung, Abschnitte 6.2 und 6.3).

Aus diesem Grund steht bei der im folgenden Abschnitt vorgestellten Modellierung die Untersuchung des Einflusses der räumlichen Anordnung der verschiedenen Zellorganellen und Kanäle / Pumpen auf die entstehenden Calcium-Signale im Fokus, was in dieser Form bisher noch nicht in der Literatur untersucht wurde. Ziel ist es, dadurch ein tieferes Verständnis der T-Zell Aktivierung zu erhalten, und die Fragen zu beantworten, ob der Abstand Mitochondrien zur IS gleichzeitig die lokalen und globalen Calcium-Signale steuern kann, und ob die Umordnung der PMCA- Pumpen ein notwendiger Effekt für die T-Zell-Aktivierung ist.

## 6.4.2 3D T-Zell-Modell

In diesem Abschnitt stelle ich das von mir entwickelte dreidimensionale Reaktions-Diffusions Modell vor. Es dient zur Untersuchung der Calcium-Signale, die während der T-Zell-Polarisierung entstehen und modelliert eine vollständige T-Zelle inklusive Zytosol und Zellmembran. Des Weiteren werden folgende Organellen und Kanäle / Pumpen für die T-Zell-Aktivierung als essentiell erachtet und von mir in der Beschreibung der Calcium-Signale berücksichtigt: CRAC-Kanal, SERCA- und PMCA-Pumpen, IP<sub>3</sub>-Rezeptor und Mitochondrien.

In sehr guter Approximation an die Realität (siehe Abbildung 2.9) nehme ich eine idealisiert kugelförmige T-Zelle mit Radius  $r_{cell} = 4 \mu m$  an. Durch Betrachtung von 2D Mikroskopie-Aufnahmen der AG Prof. Hoth der Universität des Saarlandes wird abgeschätzt, dass der Zellkern ca. halb so groß ist wie die Zelle selbst, und dass Mitochondrien in zwei Raumdimensionen eine Fläche von ca. 10% der Zellfläche einnehmen. Bei Modellierung eines kugelförmigen Nucleus liefert diese Abschätzung einen Kernradius von  $r_{nuc} = r_{cell}/2 = 2 \mu m$ . Außerdem führt diese Abschätzung bei Annahme einer Mitochondrien-Länge von ca.  $3,5 \mu m$  und eines Mitochondrien-Durchmessers

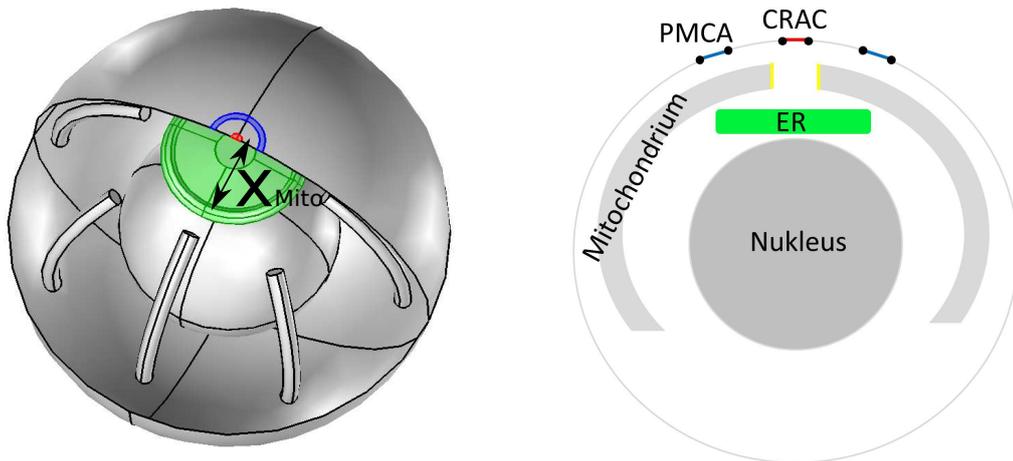


Abbildung 6.8: Modellgeometrie des 3D-Modells. Links: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Modellgeometrie zur Untersuchung von Calcium-Signalen in T-Zellen. Die äußere Hülle stellt die Zell-Plasmamembran dar, die innere Kugel den Zellkern / Nucleus und die Kreisfläche an der Zellspitze die Immunologische Synapse. An der IS kommt es zu einer Anhäufung von CRAC-Kanälen (rote Fläche) und PMCA-Pumpen (blaue Kreisscheibe). Das grüne Volumen repräsentiert das Endoplasmatische Retikulum, und die röhrenförmigen Konstrukte mit gelber Spitze bilden die Mitochondrien ab. Der schwarze Pfeil zeigt die Distanz zwischen Mitochondrien und IS  $x_{Mito}$  an. Rechts: Zweidimensionaler Schnitt der Modellgeometrie durch die x-z Ebene.

$d_M = 300$  nm dazu, dass ca. vier bis zehn dieser röhrenförmigen Mitochondrien im Zyotosol vorhanden sein sollten.

In meinen Simulationen setze ich acht Mitochondrien voraus, die sich in einem Abstand  $x_{Mito}$  zur IS befinden und an ihrem oberen Ende (gelbe Fläche, siehe Abbildung 6.8) Calcium aufnehmen und am anderen Ende wieder freisetzen können. Innerhalb der Mitochondrien diffundiert das Calcium mit der Diffusionskonstanten  $D_M$ . Ich gehe davon aus, dass sich an der IS ein CRAC-Kanal-Cluster bestehend aus ca. 40-100 Kanälen und einem Radius von  $r_{CRAC} = 0,1 \mu m$  gebildet hat. In einem Abstand von 300 nm zu diesem CRAC-Cluster repräsentiert ein Kugelsegment mit 100 nm Breite eine Akkumulation von PMCA-Pumpen. In dem Base-Case bzw. in der Standardkonfiguration haben sich 50% aller PMCA-Pumpen innerhalb dieses Kugelsegments angehäuft, wohingegen die restlichen 50% der Pumpen homogen in der Zell-Plasmamembran (PM) verteilt sind. Innerhalb des Zyotosols befindet sich ein mobiler Calcium-Puffer  $b$  der mit Diffusionskonstante  $D_b$  frei diffundiert. Die anfängliche Gesamtmenge an Puffer  $[b]_T = [b] + [bc]$  ist homogen im Zyotosol verteilt, und ich postuliere, dass die Bindung von Calcium an den Puffer dessen Diffusionseigenschaften nicht verändert. Hierbei bezeichnet  $[b]_T$  die Gesamtmenge an Calcium-Puffer,  $[b]$  den freien mobilen Puffer und  $[bc]$  die Spezies „Puffer-Calcium“. Das ER (grünes Volumen, siehe Abbildung 6.8) repräsentiert das dritte Gebiet, das zusammen mit Zyotosol und Mitochondrien die Modellgeometrie vervollständigt. Das naturgemäß sehr dünne/filigrane ER-Netzwerk wird in meinem Base-Case Szenario als massives Gebiet modelliert, weshalb ich offene Fluss-Bedingungen für das zyotosolische Calcium  $c_{cyt}$  an den Zyotosol-ER Berandungen annehme. Dies hat zur Folge, dass das zyotosolische Calcium das ER-Gebiet nicht „spürt“ und frei durch das Gebiet sowie durch dessen Berandungen diffundieren kann. Die Modellgeometrie, die aus der gesamten Zelle abzüglich des Nucleus besteht, ergibt sich als Summe dreier disjunkter Gebiete: Zyotosol, ER und Mitochondrien. Innerhalb dieser drei Gebiete wird die Calcium-Dynamik durch folgende Reaktions-Diffusions Gleichungen beschrieben:

$$\text{Zyotosol : } \frac{\partial c_{cyt}}{\partial t} = D_{cyt} \nabla^2 c_{cyt} - k_1 \cdot c_{cyt} \cdot b + k_2 \cdot bc \quad (6.35)$$

$$\frac{\partial b}{\partial t} = D_b \nabla^2 b - k_1 \cdot c_{cyt} \cdot b + k_2 \cdot bc \quad (6.36)$$

$$\frac{\partial bc}{\partial t} = D_{bc} \nabla^2 bc + k_1 \cdot c_{cyt} \cdot b - k_2 \cdot bc \quad (6.37)$$

$$\text{Mitochondrien : } \frac{\partial c_M}{\partial t} = D_M \nabla^2 c_M \quad (6.38)$$

$$\text{ER : } \frac{\partial c_{ER}}{\partial t} = D_{ER} \nabla^2 c_{ER} \quad (6.39)$$

Der Calcium-Transfer zwischen diesen dreidimensionalen Gebieten sowie der Calcium-Ein- / Aus-Strom durch die Zell-Plasmamembran bezeichne ich mit  $J_M$ ,  $J_{ER}$  und  $J_{PM}$ . Diese Ströme werden als Fluss- bzw. Randbedingungen auf speziellen zweidimensionalen Flächen definiert. Der Calcium-Austausch durch die Zellmembran  $J_{PM}$  setzt sich aus zwei Beiträgen zusammen,  $J_{PM} = J_{CRAC} - J_{PMCA}$ , dem Einstrom der CRAC-Kanäle und dem Calcium, das durch die PMCA-Pumpen aus dem Zyotosol herausgepumpt wird. Der Calcium-Austausch des Endoplasmatischen Retikulums ist auf der gesamten ER-Oberfläche (grüne Fläche, siehe Abbildung 6.8) definiert und kann ebenfalls in zwei Beiträge aufgeteilt werden. Der Fluss  $J_{ER} = J_{IP_3} - J_{SERCA}$  setzt sich zusammen aus

der Calcium-Freisetzung durch die IP<sub>3</sub>-Rezeptoren und dem Calcium, welches durch die SERCA-Pumpen zurück ins ER gepumpt wird. Die Modellgleichungen für die unterschiedlichen Calcium-Ströme werden im Folgenden vorgestellt.

Der Strom  $J_{CRAC}$  ist nur innerhalb des CRAC-Clusters (rote Fläche in Abbildung 6.8) definiert. Bisher existieren ausser einem analytischen Modell zur CRAC-Kanalaktivität als Funktion der STIM1-Expression [25] keine detaillierten Modelle für den CRAC-Kanal. Im Rahmen des 3D-Modells interessiere ich mich jedoch nicht für die Formation der CRAC-Kanäle, die zudem Gegenstand der Modellierung und Untersuchung in Kapitel 5 ist. An dieser Stelle möchte ich untersuchen, welche lokalen und globalen Calcium-Signale in Abhängigkeit der T-Zell-Polarisierung aufgrund des SOCE-Einstroms entstehen. Zu diesem Zweck nehme ich eine vereinfachte Modellgleichung an, bei der der Calcium-Einstrom des CRAC-Clusters von zwei Größen abhängt: zum einen, da der CRAC-Kanal ein speichergesteuerter Ionen-Kanal ist, vom ER-Füllstand bzw. der Calciumkonzentration innerhalb des ER ( $c_{ER}$ ), zum anderen von der gemittelten Calciumkonzentration innerhalb einer 100 nm großen Mikrodomäne, deren Zentrum mit der des Kanal-Cluster übereinstimmt. Diese beiden Abhängigkeiten repräsentieren die in der Literatur beschriebenen Inhibierungsmechanismen des CRAC-Kanals durch einen noch nicht vollständig verstandenen negativen Calcium-Feedbackmechanismus sowie durch das Auffüllen des ER [9–11, 94–96] (siehe Kapitel 2.4). Somit ergibt sich insgesamt:

$$J_{CRAC} = k_{CRAC} \cdot f(c_{ER}) \cdot g_{c_{1/2}, \Delta c}(c_{cyt}^{(micro)}). \quad (6.40)$$

Hierbei sind  $f(x)$  und  $g(x)$  beides sigmoidale Funktionen, die die CRAC-Kanal-Aktivierung durch Entleerung des ER sowie die CRAC-Kanal-Inhibierung durch eine erhöhte Calcium-Mikrodomänen-Konzentration modellieren. Die Funktion  $f(x)$  ist identisch Null für einen gefüllten Speicher  $x > 10 \mu\text{Mol}$  und  $f(0) = 1$  für einen entleerten Speicher. Der Ausdruck  $g_{c_{1/2}, \Delta c}(x)$  variiert von  $g(x) = 1$  für  $x \leq c_{1/2} - \Delta c$  zu  $g(x) = 0$  für  $x \geq c_{1/2} + \Delta c$ . Für den Großteil meiner Untersuchung gehe ich von einem entleerten ER aus (Thapsigargin-Experimente), so dass sich vollständig aktivierte CRAC-Kanäle ergeben, die lediglich durch die Ausbildung einer Mikrodomäne inhibiert werden. Die entsprechende Gleichung für den CRAC-Strom ergibt sich in diesem Fall zu  $J_{CRAC} = k_{CRAC} \cdot g(c_{cyt}^{(micro)})$ .

Das Herausbefördern von Calcium-Ionen aus dem Zytosol wird von zwei ATPase-Pumpen übernommen. Zum einen sind die PMCA-Pumpen für das Abpumpen des zytosolischen Calciums durch die Zellmembran in den extrazellulären Raum verantwortlich und zum anderen übernehmen die SERCA-Pumpen den Rücktransport von Calcium-Ionen aus dem Zytosol ins ER. Beides sind ATPase-Pumpen, die sich sowohl im Aufbau als auch in der Funktion sehr ähnlich sind. Sie befördern Calcium entgegen hohen Konzentrationsgradienten durch Energieverbrauch in Form von ATP und ihre Pumpzyklen beruhen auf dem Wechsel zwischen zwei verschiedenen Konformationen (siehe Abschnitt 2.3.3). Die Gesamtanzahl von SERCA und PMCA-Pumpen pro Zelle variiert von Zelltyp zu Zelltyp, liegt aber sehr wahrscheinlich jeweils im Bereich von  $10^5$  Pumpen/Zelle.

In der Literatur existieren sehr wenig detaillierte Modelle für die beiden ATPase-Pumpen. Üblicherweise werden die ATPase-Pumpen in der Literatur durch Hill-Gleichungen modelliert [12, 45, 49, 113, 146–148]. Lediglich Higgins et al. [112] haben ein Modell der SERCA-Pumpe entwickelt, welches den Pumpzyklus der ATPase unter Konformationsänderung berücksichtigt und eine weitaus detailliertere Form der Beschreibung darstellt. Dieses Modell zeichnet sich durch die Annahme aus, dass Calcium während des Pumpzyklus nicht instantan aufgenommen und wieder freigesetzt wird, sondern eine kurze Dauer von der SERCA gepuffert wird. Diese auf einer sehr kleinen Zeitskala ablaufende Pufferung reicht aus, um die Amplitude und Frequenz der resultierenden Calcium-Signale zu beeinflussen [112].

Im Rahmen der von mir betrachteten 3D-Modellierung interessiere ich mich für die Untersuchung von lang andauernden, robusten Calcium-Signalen, die mehrere Minuten andauern und für eine erfolgreiche T-Zell-Aktivierung benötigt werden. Des Weiteren soll mit Hilfe des hier vorgestellten 3D-Modells überprüft werden, ob der Wettbewerb zwischen Mitochondrien und ATPase-Pumpen einen Einfluss auf die entstehenden Calcium-Signale hat, ob also die räumliche Anordnung der ATPase-Pumpen relativ zu den Mitochondrien und den CRAC-Kanälen entscheidend ist. Für diese Art der Fragestellung ist die genaue Dynamik der einzelnen ATPase-Pumpen, die Verteilung der ATP-Konzentration sowie der Ablauf der Pumpzyklen nicht wichtig. Essentiell ist allerdings, dass die Form der jeweiligen Modellgleichungen die Tatsache widerspiegelt, dass die Aktivität der beiden ATPasen in Abhängigkeit der zytosolischen Calciumkonzentration reguliert wird [81–84, 149, 150]. Die Aktivität der beiden Pumpen ist unter Ruhebedingungen relativ gering und steigt mit erhöhter zytosolischer Calciumkonzentration an bis sie schließlich in eine Sättigung übergeht.

Dadurch ergibt sich direkt, dass die räumliche Anordnung der Pumpen eine wichtige Rolle spielt, da beispielsweise ATPasen in Regionen niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration weitaus weniger effektiv Calcium befördern als Pumpen, die sich in der Nähe von Calcium-Mikrodomänen befinden. Die experimentell gemessenen Modulation der SERCA- und PMCA-Pumpenströme als Funktion der Calciumkonzentration können in guter Näherung als Hill-Gleichungen beschrieben werden [81–84, 149, 150], wobei die Hill-Koeffizienten je nach Typ der Pumpe variieren. Aus den genannten Gründen wähle ich jeweils phänomenologische Ansätze für die entsprechenden Gleichungen aus, die durch experimentelle Beobachtungen motiviert sind, und mit der üblichen Modellierung der Calcium-Literatur übereinstimmen [12, 45, 49, 113, 146–148].

Der Fluss der PMCA wird durch

$$J_{PMCA,PM} = k_{PMCA,PM} \cdot \frac{c_{cyt}}{k_p + c_{cyt}}, \quad (6.41)$$

und

$$J_{PMCA,IS} = k_{PMCA,IS} \cdot \frac{c_{cyt}}{k_p + c_{cyt}}, \quad (6.42)$$

modelliert. Dabei ist  $J_{PMCA,PM}$  auf der Zellplasmamembran-Oberfläche definiert und  $J_{PMCA,IS}$  beschreibt den Fluss durch die PMCA-Pumpen, die innerhalb des blauen Kugelsegments (siehe Abbildung 6.8) akkumuliert sind. Der Parameter  $k_p$  repräsentiert die Calciumkonzentration, bei der die Pumpen mit der Hälfte ihrer Maximaleffektivität  $k_{PMCA}$  arbeiten. Dieser Ansatz entspricht einer Hill-Gleichung mit Koeffizient von 1. Im Ergebnisteil sind zusätzlich dazu Ergebnisse gezeigt und diskutiert, die unter Verwendung verschiedener Ansätze (linearer Ansatz, Sigmoidal-Funktionen, Hill-Koeffizient von 2 und 4) für den PMCA-Fluss (Gleichungen 6.49-6.50) erhalten wurden.

Wie oben bereits erläutert, nutze ich auch für die Beschreibung der SERCA-Pumpen einen phänomenologischen Ansatz. Für den Großteil der Untersuchungen werden blockierte SERCAs (Thapsigargin-Experimente) angenommen. Unter diesen Bedingungen kann die Gleichung 6.43 vernachlässigt werden. Für die Berechnungen der Calcium-Signale bei Annahme aktiver SERCAs steht die räumliche Anordnung der SERCA-Pumpen relativ zu den anderen Zellorganellen und Calcium-Kanälen im Vordergrund. Wichtig ist auch hier, dass die Calcium abhängige Regulierung der SERCA-Pumpen in der Modellgleichung Berücksichtigung findet. Insgesamt wird der aus den SERCA-Pumpen resultierende Calcium-Rückfluss ins ER in dem Modell durch

$$J_{SERCA} = k_{SERCA} \cdot c_{cyt} \cdot j(c_{cyt}) \quad (6.43)$$

beschrieben, wobei  $j(c_{cyt})$  eine sigmoidale Funktion darstellt. Diese Funktion nimmt bei einer zytosolischen Calciumkonzentration von 0 nM den Wert Null an und erreicht ihren Maximalwert von Eins bei Konzentrationen von ca. 400 nM. Dieser Ansatz, bei dem der maximale Fluss durch Multiplikation mit einer Sigmoidalfunktion nichtlinear von der Calciumkonzentration abhängt, ist vergleichbar mit Ansätzen, die eine Hill-Gleichung voraussetzen. Hauptunterschied der beiden Ansätze ist, dass die von mir angenommene Modellgleichung die Sättigung des Stroms nicht exakt widerspiegelt. Aus diesem Grund habe ich die Berechnung der Calcium-Signale auch unter Verwendung eines Hill-Gleichungs-Ansatzes und einem Hill-Koeffizienten von zwei durchgeführt. Die entsprechenden Resultate sind im Ergebnisteil ebenfalls diskutiert und unterscheiden sich qualitativ nicht von denen des Base-Case Szenarios. Typischerweise werden in der Literatur Hill-Koeffizienten von eins oder zwei zur Modellierung der Calcium-abhängigen Pumpleistung der SERCA-Pumpen verwendet [12, 146, 147].

Der  $IP_3$ -Rezeptor ist der in der Literatur wohl am häufigsten und detaillgetreuesten modellierte Ionen-Kanal (Aspekte der Modellierung, siehe Abschnitt 2.2.1). Trotzdem habe ich mich für die hier betrachtete Calcium-Signalgebung während der T-Zell-Aktivierung dazu entschieden, eine sehr stark vereinfachte Beschreibung des  $IP_3$ -Rezeptors / Stroms zu verwenden. Die Gründe hierfür sind vielfältig.

Zum einen gehe ich bei der Modellierung von Thapsigargin-Experimenten von geblockten SERCAs und vollständig entleertem ER aus, so dass die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER durch die  $IP_3$ -Rezeptoren zum Zeitpunkt des Simulationsstarts bereits stattgefunden hat. Für den Fall der Modellierung des physiologischen Szenarios bei aktiven SERCAs

ist bekannt, dass die Calcium-Freisetzung durch den intrazellulären Speicher nicht ausreicht, um die für die T-Zell-Aktivierung notwendigen robusten Calcium-Signale zu erzeugen [86]. Hinzu kommt, dass während einer erfolgreichen T-Zell-Aktivierung an der IS ständig  $IP_3$  produziert wird und die Dynamik der  $IP_3$ -Rezeptoren in der Größenordnung von Millisekunden liegt, wohingegen mit Hilfe des 3D-Modells das Langzeitverhalten der Calcium-Signale in T-Zellen untersucht wird. Die Calcium-Freisetzung durch den  $IP_3$ -Rezeptor dient in dem hier betrachteten Modell lediglich dazu, den speichergesteuerten Calciumeinstrom durch den CRAC-Kanal zu initialisieren und zu kontrollieren. Dies geschieht in Konkurrenz zu den SERCA-Pumpen, die bei erhöhten zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen die Calciumionen zurück ins ER transportieren. Können die SERCAs dies ungehindert tun, so füllt sich das ER wieder und der CRAC-Kanal wird inhibiert. Begünstigt die räumliche Anordnung der Organellen die Mitochondrien bei der Calcium-Umverteilung, so reicht die Pumpleistung der SERCAs nicht aus um die Freisetzung durch die  $IP_3$ -Rezeptoren auszugleichen und der speichergesteuerte CRAC-Kanal bleibt aktiviert.

Als Konsequenz dieser Überlegungen nehme ich in meinen Simulationen für die Zeitspanne  $t_{IP_3}$  vollständig aktivierte  $IP_3$ -Rezeptorkanäle an. Das bedeutet, dass der Fluss  $J_{IP_3}$  für Zeiten  $t > t_{IP_3}$  gleich Null ist und andernfalls durch eine konstante Ausflussrate bestimmt ist, die mit der aktuellen ER-Calciumkonzentration multipliziert wird:

$$\begin{aligned} J_{IP_3} &= k_{IP_3} \cdot c_{ER} && t < t_{IP_3}, \\ J_{IP_3} &= 0 && \text{sonst.} \end{aligned} \tag{6.44}$$

Für eine modifizierte Form dieser Gleichung, welche die Calcium abhängige Inhibierung der  $IP_3$ -Rezeptoren berücksichtigt, ändern sich die im Ergebnis-Teil gezeigten Resultate qualitativ nicht (Daten nicht gezeigt). Hauptgrund hierfür ist, dass eine Calcium abhängige Inhibierung des Rezeptors erst bei zytosolischen Konzentrationen von mehr als 800-1000 nM beobachtet wird [8]. Solch hohe globale Konzentrationen entsprechen in meinen Modellierungen den maximalen Signalen, die auftreten, wenn sich die Mitochondrien sehr nahe an der IS befinden (siehe Abbildung 6.11).

Wie bereits in der Vorbetrachtung dieses Abschnitts erwähnt, fanden Mitochondrien bei der Untersuchung von Calcium-Signalen in Zellen lange Zeit keine Berücksichtigung. Dies änderte sich kurz vor der Jahrtausendwende als sich die experimentellen Beobachtungen häuften, dass Mitochondrien einen sehr großen Einfluss auf die Calcium-Signalgebung in unterschiedlichsten Zellen haben [69–71, 140, 141]. Auch für die T-Zell-Aktivierung spielen Mitochondrien eine wichtige Rolle (siehe Abschnitt 2.3.2), und dürfen speziell bei der Modellierung von Calcium-Signalen in T-Zellen keinesfalls ignoriert werden. Da Mitochondrien ab einer zytosolischen Konzentration von ca. 500 nM damit beginnen sehr stark Calcium zu puffern [63, 69] wurde zunächst hauptsächlich die Pufferwirkung der Mitochondrien in Modelle einbezogen. Diese ersten Modelle konnten zeigen, dass die Amplituden der entstehenden Calcium-Signale von den Mitochondrien beeinflusst

wird [28–30, 142]. Die beobachtete Amplitudenmodulation beruht im Wesentlichen auf der Tatsache, dass die Mitochondrien große Mengen an Calcium sehr schnell aufnehmen und verzögert wieder abgeben und dadurch neben dem ER einen zweiten Calcium-Pool darstellen. Bis heute betrachten die meisten Modelle eine räumlich homogene Calciumkonzentration für die Beschreibung der Calcium-Signalgebung und stellen die Calcium-Dynamik, inklusive der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und Abgabe, durch ein System von gekoppelten Differentialgleichungen dar.

Es gibt auch einige wenige Modelle, die sich sehr detailliert mit der Calcium-Dynamik der Mitochondrien beschäftigen [151–153]. Diese modellieren hauptsächlich die Kinetik des Calcium-Uniporter und die Auswirkungen der Calcium-Aufnahme auf die ATP-Produktion. Dabei wird die Abhängigkeit der Calcium-Aufnahme des Uniporters als Funktion verschiedener Variablen berechnet, wie beispielsweise: der zytosolischen Calciumkonzentration, des Membranpotentials, der Temperatur, der mitochondrialen Magnesiumkonzentration, der zytosolischen Natriumkonzentration, der ATP-Konzentration, und vieler weiterer. Diese sehr detailreiche Beschreibung der Energieproduktion der Mitochondrien bzw. der Kinetik des Calcium-Uniporters führt dazu, dass die Modelle teilweise von mehr als 50 Parametern abhängen. Eine solche Herangehensweise an die Beschreibung der mitochondrialen Calcium-Dynamik ist für die von mir betrachtete Modellierung der T-Zell-Aktivierung weder zweckmäßig noch zielführend.

Eines der Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, welchen Einfluss die Position der Mitochondrien auf die in T-Zellen entstehenden Calcium-Signale hat. Um diese Frage zu beantworten, ist es meines Erachtens nicht notwendig die mitochondriale Calcium-Aufnahme und -Abgabe in Abhängigkeit von beispielsweise der Temperatur, der Natrium-Konzentration oder des Membranpotentials zu studieren. Essentiell ist, dass neben der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und Pufferung durch die Mitochondrien auch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Umverteilung durch die Mitochondrien in die Modellierung einbezogen wird. Außerdem ist es von großer Bedeutung, dass die mitochondriale Calcium-Aufnahme bzw. Abgabe und Umverteilung eine Funktion der am jeweiligen Ort vorherrschenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist. Aufgrund der obigen Überlegungen modelliere ich den mitochondrialen Calcium-Fluss wie folgt:

$$J_M = -k_{M_{in}} \cdot c_{cyt} + k_{M_{out}} \cdot c_M. \quad (6.45)$$

Dabei beschreibt  $k_{M_{in}} \cdot c_{cyt}$  die Calcium-Aufnahme an den Mitochondrien-Spitzen, die in Richtung der IS zeigen (gelbe Flächen, siehe Abbildung 6.8). Die Calcium-Abgabe der Mitochondrien wird durch den Term  $k_{M_{out}} \cdot c_M$  beschrieben und ist auf die zur IS entgegengesetzten Mitochondrienenden begrenzt. Analog zu experimentellen Beobachtungen [63, 64] hängt die mitochondriale Calcium-Aufnahme in meinem Modell von der zytosolischen Konzentration  $c_{cyt}$  ab, wohingegen die Calcium-Freisetzung durch die Mitochondrien eine Funktion des bereits durch die Mitochondrien aufgenommenen bzw. gepufferten Calciums  $c_M$  ist. Die Einschränkung des Base-Case Szenarios, die mitochondrialen Calcium-Aufnahme und -Abgabe nur an den Mitochondrienenden zu erlauben, führt zu einer erheblichen Einsparung an Computerrechenzeit. Gleichzeitig erbringt sie qualitativ die gleichen Ergebnisse wie Simulationen, bei denen obige Gleichungen auf

der gesamten Mitochondrien-Oberfläche Gültigkeit besitzen, wie im Ergebnisteil gezeigt ist. Die von mir zur Modellierung der mitochondrialen Calcium-Aufnahme und -Abgabe gewählte Gleichung 6.51 korrespondiert mit der üblichen Umsetzung in der Literatur [29, 142]. Die oftmals einbezogene Natrium abhängige Freisetzung von Calcium durch den Natrium-Calcium-Austauscher innerhalb der Mitochondrien [142, 154] wird von mir nicht berücksichtigt und kann im Rahmen einer verbesserten Beschreibung in zukünftigen Arbeiten umgesetzt werden.

Mit Hilfe dieses Modells möchte ich zwei unterschiedliche Szenarien studieren. Das erste der beiden Szenarien ist stark an Experimente angelehnt, die sich mit Calcium-Signalen in T-Zellen beschäftigen. In fast allen Experimenten dieser Art kommt die Droge Thapsigargin zum Einsatz, die die SERCA-Pumpen blockiert und somit zu einem vollständig entleerten ER und zu voll aktivierten CRAC-Kanälen führt. In diesem Fall vernachlässige ich in meiner Modellierung das ER-Gebiet inklusive der SERCA-Pumpen und IP<sub>3</sub>-Rezeptoren und setze voll aktivierte CRAC-Kanäle voraus, die lediglich durch die Ausbildung einer Calcium-Mikrodomäne in Kanalnähe inhibiert werden. Als Konsequenz reduziert sich das Modellgleichungs-System um die Gleichung (6.39) und die entsprechende Randbedingung für den Fluss  $J_{ER}$ . Außerdem ändert sich Gleichung (6.40) zu  $J_{CRAC} = k_{CRAC} \cdot g(c_{cyt}^{(micro)})$ .

Berücksichtigt man hingegen bei der Berechnung des Systems den vollständigen Satz der oben definierten Gleichungen (6.35-6.39) mit sämtlichen beschriebenen Randbedingungen, so ist man in der Lage, ein eher an physiologische Verhältnisse angepasstes Szenario zu studieren, welches in Experimenten nur sehr schwer oder gar nicht zu realisieren ist. In diesem Fall analysiere ich Calcium-Signale, die entstehen, wenn zur Zeit  $t = 0$  ein gefülltes ER vorliegt, die SERCA Pumpen aktiv sind und IP<sub>3</sub> für eine vorgegebene Dauer  $t_{IP_3}$  im Zytosol vorhanden ist. Während der Dauer dieses IP<sub>3</sub>-Stimulus wird Calcium von den IP<sub>3</sub>-Rezeptoren freigesetzt, was eine Entleerung des ER und damit verbunden eine Aktivierung der CRAC-Kanäle zur Folge hat. Die Aktivierung der CRAC-Kanäle bedingt einen starken Calcium-Einstrom ins Zellinnere, wodurch die zytosolische Calciumkonzentration ansteigt. Als Reaktion beginnen die SERCA-Pumpen das einströmende Calcium wieder zurück ins ER zu befördern, was eine teilweise Inhibierung der CRAC-Kanäle verursacht.

Zur Berechnung der Modellgleichungen nutze ich das Paket „transport of diluted species“ der Software „Comsol Multiphysics“ [117]. Comsol Multiphysics ist eine Finite-Elemente-Methoden Software, die sich hervorragend dazu eignet, Reaktions-Diffusions Systeme komplexer Geometrien zu simulieren.

## 6.4.3 Parameterwerte des Base-Case Szenarios

Als Diffusionskonstante des freien zytosolischen und des mitochondrialen Calciums verwende ich den von Albritton et al. gemessenen Wert  $D_{cyt} = D_M = 220 [\mu m^2/s]$  [126]. Aufgrund der internen Struktur der Mitochondrien ist die Diffusion innerhalb der Mitochondrien behindert und in Realität langsamer als die freie Calcium-Diffusion im Zytosol. Jedoch hat eine verminderte Diffusionskonstante  $D_M$  keine Auswirkung auf die Resultate der stationären Calcium-Profile (Daten nicht gezeigt). Die Diffusionskonstante innerhalb des ER ist ebenfalls um einen Faktor 2-5 kleiner als die im Zytosol, da das ER eine sehr fein verzweigte Röhrenstruktur aufweist [46, 155]. Mobile Calcium-Puffer diffundieren in der Regel mit einer Diffusionskonstanten, die ca. um eine Größenordnung kleiner ist als die des freien Calciums [128, 156]. Die Reaktionsraten für Calcium-Bindung und Dissoziation,  $k_1$  und  $k_2$  sowie die Anfangswerte der Pufferkonzentration  $c_b(t = 0)$  stimmen sehr gut mit den Modellparametern überein, die üblicherweise zur Untersuchung von Calcium-Signalen verwendet werden [12].

Ich nehme an, dass ca. 40-60 CRAC-Kanäle innerhalb einer Fläche von  $A_{CRAC} = 3,0 \cdot 10^{-14} m^2$  clustern, wobei die Anzahl von Orai1-Kanälen innerhalb eines Clusters sogar mehrere hundert Kanäle betragen kann [157]. Jeder einzelne dieser Kanäle soll voll aktiviert sein und ca.  $10^4 Ca^{2+}$ -Ionen pro Sekunde in die Zelle pumpen [158]. Diese Annahme ergibt einen Parameter für den CRAC-Kanal Einstrom von  $k_{CRAC} \approx 3 \cdot 10^{-5} mol/(m^2s)$ . In dem Base-Case Szenario nehme ich des Weiteren an, dass 50% aller PMCA-Pumpen innerhalb des Kugelsegments um die IS akkumuliert sind (siehe Abbildung 6.8). Die restlichen 50% sind homogen über die Zellmembran verteilt. Aus dem Oberflächen-Verhältnis von Zellplasmamembran zu dem Kugelsegment  $A_{PM}/A_{segment} = 720$  ergibt sich das Verhältnis der beiden Maximalströme  $k_{PMCA,PM} = k_{PMCA,IS}/720$ . Die maximale Rate, mit der die PMCA-Pumpen Calcium aus der Zelle befördern, liegt in der Größenordnung von 50-200 nM/s [82], wodurch sich multipliziert mit dem von mir simulierten Zellvolumen ( $V = 2.7 \cdot 10^{-13} dm^3$ ) eine maximale Pumpstärke von  $0,5 \cdot 10^{-19} mol/s$  ergibt. Für das Base-Case Szenario errechnet sich demnach der Wert des maximalen PMCA-Stroms zu  $I_{PMCA}^{max} = 2 \cdot A_{PM} \cdot k_{PMCA}^{max} = 1.12 \cdot 10^{-18} mol/s$ . Dieser Wert stimmt sehr gut mit Annahmen anderer theoretischer Arbeiten überein [42, 159]. Die größtmögliche Calcium-Aufnahme durch die Mitochondrien kann für mein Modell zu  $I_M^{max} = A_M \cdot k_M^{max} \cdot c \approx 1 \cdot 10^{-18} mol/s$  abgeschätzt werden, wobei  $c = 20 - 50 nM$  die Calciumkonzentration repräsentiert, die sich durch Mittelung über die Mitochondrien-Spitzen (gelbe Fläche, siehe Abbildung 6.8) ergibt. Das aus meiner Parameterwahl resultierende Verhältnis  $I_{PMCA}^{max}/I_M^{max} \approx 1$  stimmt sehr gut mit den experimentellen Resultaten überein, wonach die Calcium-Aufnahme durch Mitochondrien und die Calcium-Beseitigung durch die PMCA-Pumpen von ca. gleicher Größenordnung sind [13, 82, 160, 161].

Die Robustheit der Resultate in Bezug auf die Variation des Verhältnisses  $I_{PMCA}^{max}/I_M^{max}$  wird in Abbildung 6.11 b) und Abbildung 6.12 diskutiert. Dort sind außerdem Ergebnisse zu sehen, die mittels eines geänderten Ansatzes  $J_M = k_{Min} \cdot c_{cyt}^2 / (k_{M1}^2 + c_{cyt}^2) - k_{Mout} \cdot c_M / (k_{M2} + c_M)$  (vgl. Gleichung 6.51) der Calcium-Aufnahme durch Mitochondrien berechnet wurden. Dieser Ansatz orientiert sich an theoretischen Arbeiten, die ebenfalls

Calcium-Signale unter Berücksichtigung von Mitochondrien simulieren [142, 154]. Auch unter Annahme dieses Ansatzes sind die Ergebnisse wieder robust gegenüber einer Variation des Verhältnisses  $I_{PMCA}^{max}/I_M^{max}$ .

Die Anfangswerte, die Reaktions- und Diffusionsraten sowie andere Parameterwerte der Standardkonfiguration sind in Tabelle 6.2 zusammengefasst.

Parameter	Wert [Einheit]	Parameter	Wert [Einheit]
$D_{cyt}$	220 [ $\mu m^2/s$ ]	$k_1$	100 [ $m^3/(mol \cdot s)$ ]
$D_M$	220 [ $\mu m^2/s$ ]	$k_2$	0,3 [1/s]
$D_b$	20 [ $\mu m^2/s$ ]	$k_{Min}$	$4 \cdot 10^{-2}$ [m/s]
$D_{bc}$	20 [ $\mu m^2/s$ ]	$k_{Mout}$	$2 \cdot 10^{-3}$ [m/s]
$D_{ER}$	100 [ $\mu m^2/s$ ]	$k_{SERC A}$	$10^{-5}$ [m/s]
$c_{cyt}(t=0)$	100 [nM]	$k_{IP_3}$	$10^{-8}$ [m/s]
$c_M(t=0)$	100 [nM]	$k_{CRAC}$	$4 \cdot 10^{-5}$ [mol/( $m^2 s$ )]
$c_{ER}(t=0)$	10 [ $\mu M$ ]	$k_{PMCA}$	$2,8 \cdot 10^{-9}$ [mol/( $m^2 s$ )]
$c_b(t=0)$	10 [ $\mu M$ ]	$k_p$	0,25 [ $\mu M$ ]
$c_{bc}(t=0)$	0,5 [ $\mu M$ ]	$c_{1/2}$	7,5 [ $\mu M$ ]
$A_{CRAC}$	$3,04 \cdot 10^{-14}$ [ $m^2$ ]	$\Delta c$	6,5 [ $\mu M$ ]
$A_{PM}$	$2,0 \cdot 10^{-10}$ [ $m^2$ ]	$A_M$	$5,08 \cdot 10^{-13}$ [ $m^2$ ]
wobei mol die Stoffmenge an Teilchen bezeichnet und M=mol/dm <sup>3</sup> ist.			

Tabelle 6.2: Parameter, Reaktions- und Diffusionsraten sowie Anfangswerte, die als Base-Case- oder Standard-Parameter des 3D-Modells benutzt werden.

#### 6.4.4 Ergebnisse I: Geblockte SERCA-Pumpen und Einfluss der Mitochondrien- und PMCA-Pumpenposition

Zunächst präsentiere ich Ergebnisse meines Modells, die unter Annahme von geblockten SERCA-Pumpen und voll aktivierten CRAC-Kanälen gewonnen wurden. In diesem Fall vernachlässige ich die ER-Domäne, wodurch sich das Modellgleichungs-System um Gleichung (6.39) reduziert. Experimentell wird dies durch Einsatz des SERCA-Blockers Thapsigargin erreicht. In Abbildung 6.9 sind Schnappschüsse der sich ergebenden räumlichen und zeitlichen Entwicklung der Calciumkonzentration abgebildet, wobei sich die Mitochondrien in dem vorliegenden Fall sehr nah an der Immunologischen Synapse bzw. dem CRAC-Kanal Cluster befinden ( $x_{\text{Mito}} = 0,1 \mu\text{m}$ ). Wie man erkennt, erreicht die  $\text{Ca}^{2+}$ -Verteilung schon in den ersten 20 Sekunden ihren stationären Zustand. Die sich einstellende stationäre räumliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Verteilung für verschiedene Mitochondrienpositionen ist in Abbildung 6.10 dargestellt. Diese 3D-Schnappschüsse der Zelle zeigen die bereits im 1D-Modell vorhergesagte starke Abhängigkeit des globalen Calcium-Signals von der Mitochondrienposition. Deshalb soll nun im Folgenden genauer untersucht werden, welchen Einfluss der Abstand Mitochondrien-IS  $x_{\text{Mito}}$  sowie die PMCA-Pumpenverteilung auf das sich einstellende stationäre Calcium-Profil haben.

Die stationäre, lokale und globale Calciumkonzentration als Funktion der Mitochondrienposition  $x_{\text{Mito}}$  unter Verwendung der Base-Case Parameter ist in Abbildung 6.11 a) zu sehen. Die lokale oder Mikrodomänen-Konzentration wird berechnet, indem die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $c_{\text{cyt}}$  über eine 100 nm große Kugel mit Mittelpunkt im Zentrum des CRAC-Clusters gemittelt wird. Analog zu den 1D-Resultaten sagt auch das 3D-Modell im Fall von aktivierten CRAC-Kanälen voraus, dass die Mitochondrienbewegung hin zur IS bzw. der Abstand der Mitochondrien zur IS ( $x_{\text{Mito}}$ ) sowohl die lokalen als auch die globalen Calcium-Signale kontrolliert. Die horizontalen grauen Linien deuten die lokalen und globalen Calcium-Signale an, die sich unter Annahme der Base-Case Parameter bei blockierten Mitochondrien ergeben. In Übereinstimmung mit den experimentellen Resultaten von Hoth et al. [71] liegt das globale Calcium-Signal bei Blockade der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme durch die Mitochondrien unter den Werten aller anderen Calcium-Signale, obwohl die Mitochondrien gleichzeitig auch als starke Calcium-Puffer agieren, wie in Abbildung 6.11 c) zu sehen ist.

Nicht überraschend ist die Tatsache, dass die lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomäne verringert wird, je näher sich die Mitochondrien an der IS befinden. Die Mitochondrien-Spitze stellt nämlich im Prinzip eine Senke dar, die durch Bewegung der Mitochondrien hin zur IS näher an die Quelle des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms gebracht wird. Dass gleichzeitig jedoch auch das globale Calcium-Signal ansteigt, welches sich aus Mittelung der Calciumkonzentration über das gesamte Zellvolumen ergibt, je näher sich die Mitochondrien an der IS befinden, ist erst einmal intuitiv nicht zu erwarten. Im Inset von Abbildung 6.11 a) werden die Ergebnisse für eine leicht abgeänderte Modellgeometrie unter Annahme der Base-Case Parameter gezeigt. In diesem Fall, der mit der räumlichen Anordnung des 1D-Modells vergleichbar ist (siehe Abschnitt 6.2), sind 50% der PMCA-Pumpen nicht

an der IS akkumuliert, sondern an dem ihr gegenüberliegenden Pol. Diese unphysiologische Anordnung der PMCA-Pumpen macht durchaus Sinn, wenn man die Tatsache berücksichtigt, dass die Bildung von CRAC-Clustern am der IS gegenüberliegenden Pol beobachtet werden kann [108]. Analog zur Standardkonfiguration liefert auch sie das

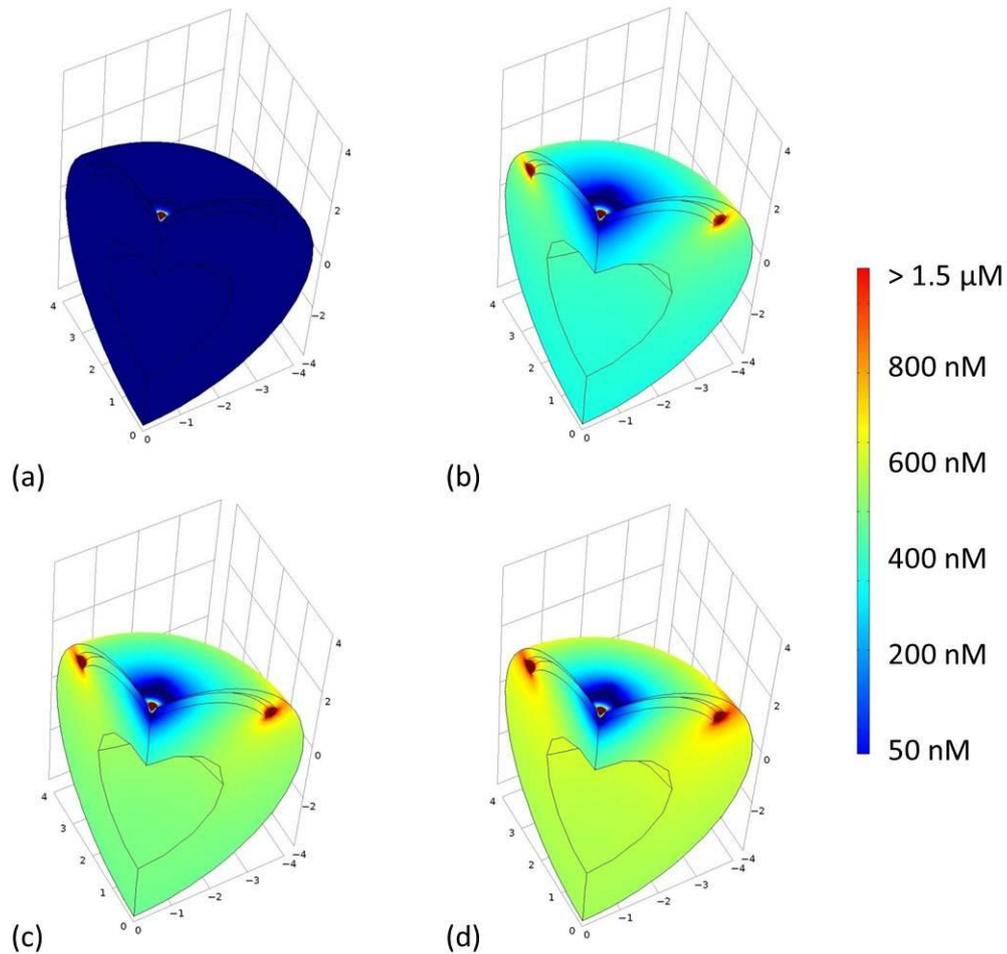


Abbildung 6.9: Dreidimensionale Schnappschüsse der räumlichen und zeitlichen Entwicklung der zytosolischen Calciumkonzentration  $c_{cyt}$ . Abgebildet ist ein Viertel der Zellgeometrie und die Oberflächenkonzentration der sichtbaren Modelldomäne für einen Abstand Mitochondrien-IS von  $x_{Mito} = 0,1 \mu\text{m}$ . Die benutzten Parameter wurden in Abschnitt 6.4.3 diskutiert und sind in Tabelle 6.2 aufgelistet. Dargestellt ist die räumliche Calciumkonzentration  $c_{cyt}$  für verschiedene Systemzeiten t: a) Zeit  $t = 0$  s b) Zeit  $t = 5$  s c) Zeit  $t = 10$  s d) Zeit  $t = 20$  s.

Ergebnis, dass die Mitochondrienposition  $x_{\text{Mito}}$  die Calcium-Signale kontrolliert, selbst wenn die Abhängigkeit der Calcium-Signale hier nicht so steil mit  $x_{\text{Mito}}$  abfällt. In diesem Fall befinden sich die PMCA-Pumpen in einer Region mit niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Um dies zu verdeutlichen, ist das Calcium-Profil für verschiedene Mitochondrienpositionen in Abbildung 6.11 d) illustriert. Die dort gezeigte Calciumkonzentration wurde

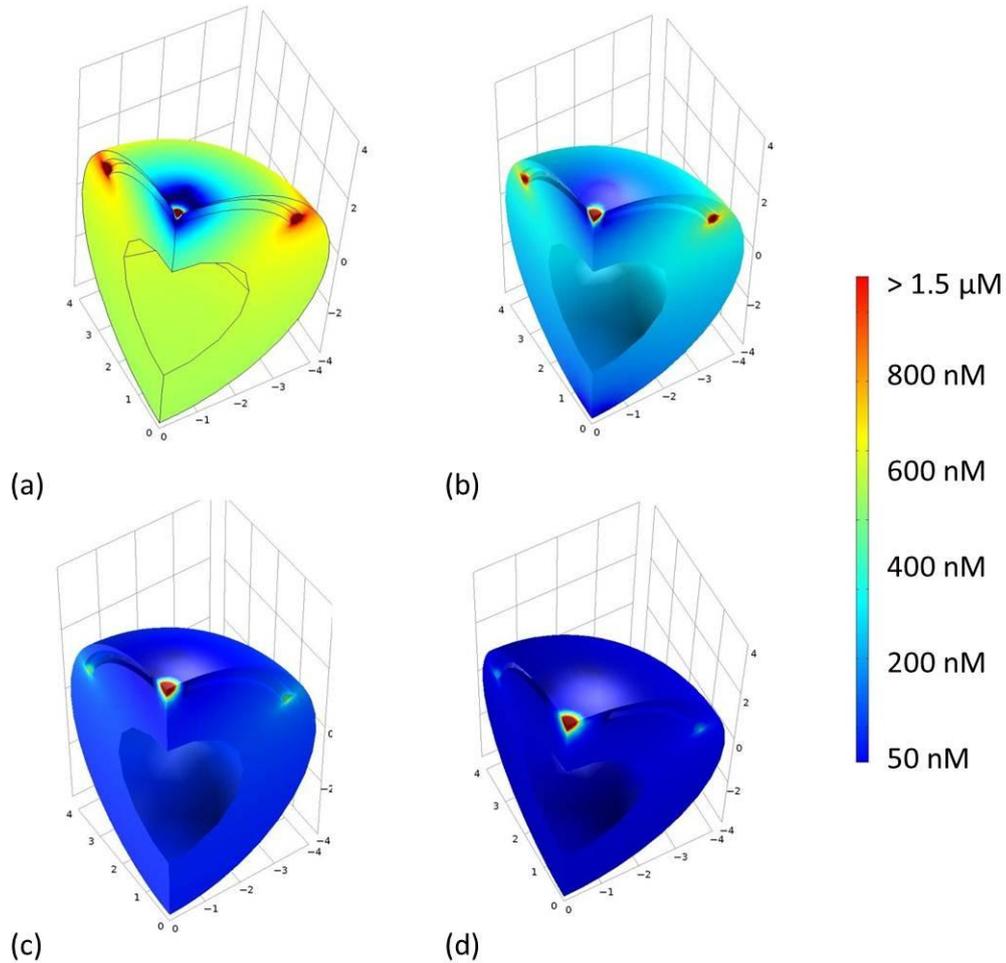


Abbildung 6.10: Dreidimensionale Schnappschüsse der zytosolischen Calciumkonzentration  $c_{\text{cyt}}$ . Vergleiche die Schnappschüsse mit den entsprechenden Punkten in Abbildung 6.11 a). Die benutzten Parameter wurden in Abschnitt 6.4.3 diskutiert und sind in Tabelle 6.2 aufgelistet. Abgebildet ist die sich einstellende stationäre Calciumkonzentration  $c_{\text{cyt}}$  zum Zeitpunkt  $t = 20$  s für verschiedene Mitochondrienpositionen  $x_{\text{Mito}}$ : a)  $x_{\text{Mito}} = 0,1 \mu\text{m}$  b)  $x_{\text{Mito}} = 0,3 \mu\text{m}$  c)  $x_{\text{Mito}} = 0,5 \mu\text{m}$  d)  $x_{\text{Mito}} = 1,0 \mu\text{m}$ .

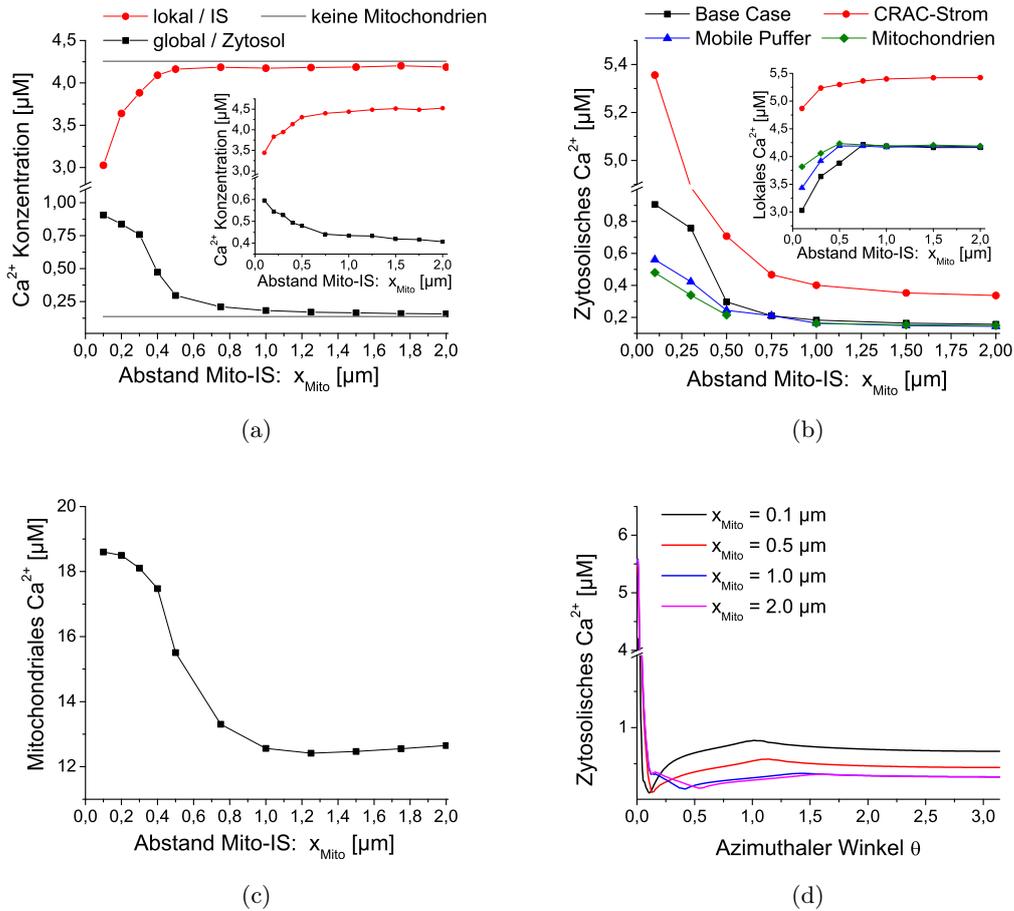


Abbildung 6.11: Lokale und globale Calcium-Signale als Funktion des Abstands Mitochondrien-Immunologische Synapse. a) Lokale (100 nm Mikrodomäne) und globale (zytosolische) stationäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale als Funktion des Abstandes Mitochondrien-IS  $x_{\text{Mito}}$ . Die horizontale, konstante graue Linie repräsentiert das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal, welches ohne Mitochondrien ( $k_{\text{Min}} = 0$ ) zustande kommt. Inset: PMCA-Pumpen akkumulieren nicht an der IS, jedoch an dem ihr gegenüberliegenden Zellpol. b) Globale und lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale als Funktion von  $x_{\text{Mito}}$  für das Base-Case Szenario, eine erhöhte Konzentration mobiler  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (100 mM), stärkeren CRAC-Strom ( $k_{\text{CRAC}} = 2 \cdot 10^{-4} [\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})]$ ) und schwächere mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme / Umverteilung ( $k_{\text{Min}} = 4 \cdot 10^{-3} [\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})]$ ,  $k_{\text{Mout}} = 2 \cdot 10^{-4} [\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})]$ ). c) Stationäres mitochondriales Calcium als Funktion der Mitochondrienposition für das Base-Case Szenario. d) Calciumkonzentration gemessen in einem Abstand von 10 nm zur Zellplasmamembran als Funktion des azimuthalen Winkels  $\theta$  für verschiedene Mitochondrienpositionen  $x_{\text{Mito}}$ . An der IS ist  $\theta = 0$ .

in einem Abstand von 10 nm zur Zellplasmamembran gemessen und als Funktion des azimuthalen Winkels  $\theta$  aufgetragen. Der Winkel  $\theta$  nimmt dabei die Werte 0 am oberen Zellpol (Position der IS) und  $\pi$  am gegenüberliegenden Pol an. Da die Aktivität der PMCA-Pumpen in Abhängigkeit der zytosolischen Calcium-Konzentration reguliert wird und mit höherer Konzentration ansteigt (vgl. Gleichung 6.49 + 6.50), sind die Pumpen in der Region des unteren Pols (der IS gegenüberliegend) weitaus weniger effektiv.

Die starke Abhängigkeit der Calcium-Signale vom Abstand der Mitochondrien zur IS ( $x_{\text{Mito}}$ ) ist sehr robust gegenüber Parameteränderungen. In Abbildung 6.11 b) ist diese Robustheit anhand einiger Beispiele demonstriert: für einen stärkeren CRAC-Kanal Strom, für eine höhere Konzentration mobiler Calcium-Puffer sowie für eine verstärkte Calcium-Aufnahme und -Abgabe durch die Mitochondrien. Diese Robustheit bleibt auch bei Änderung vieler anderer Parameter bzw. Änderung von Modellgleichungen bestehen, wie in Abbildung 6.12 zu sehen ist. Im Teil a) dieser Abbildung ist die bereits im Abschnitt 6.4.3 diskutierte Abhängigkeit der Resultate für eine Variation des Verhältnisses  $I_{\text{PMCA}}^{\text{max}}/I_M^{\text{max}}$  dargestellt. Das Verhältnis der maximalen Pumpstärke der PMCA-Pumpen und der maximalen Calcium-Aufnahme durch die Mitochondrien stimmt für das Base-Case Szenario sehr gut mit den experimentellen Resultaten überein, wonach diese in etwa von gleicher Größenordnung sind:  $I_{\text{PMCA}}^{\text{max}}/I_M^{\text{max}} \approx 1$  [13, 82, 160, 161]. Auch für eine Änderung des Verhältnisses  $I_{\text{PMCA}}^{\text{max}}/I_M^{\text{max}}$  über mehrere Größenordnungen hinweg ist das Resultat, dass die Mitochondrienposition  $x_{\text{Mito}}$  die Calcium-Signale kontrolliert, sehr robust, wie in Abbildung 6.12 a) + d) zu sehen ist. Dieses Ergebnis ändert sich auch dann nicht, wenn verschiedene Ansätze für Modellgleichungen der Zellorganellen bzw. verschiedene Ansätze, der die Calcium-Kanäle und Pumpen beschreibenden Gleichungen verwendet werden. In Abbildung 6.12 b) sind zum Beispiel die lokalen und globalen Calcium-Signale für unterschiedliche in der Literatur verwendete Ansätze zur Modellierung der PMCA-Pumpen dargestellt [42, 159]. In Teil c) der Abbildung sind die resultierenden Calcium-Signale für einen vom Base-Case abweichenden Ansatz der Calcium-Aufnahme und -Abgabe durch die Mitochondrien zu sehen, der sich an anderen theoretischen Arbeiten zur Simulation von Calcium-Signalen orientiert [142, 154]. In beiden Fällen ändert sich nichts an dem Resultat, dass die globale Calciumkonzentration mit geringerem Abstand  $x_{\text{Mito}}$  der Mitochondrien zur IS ansteigt und gleichzeitig das lokale Signal abnimmt.

Wie bereits ausführlich erläutert, werden von meinem Modell höhere globale Calcium-Signale gemessen, je kürzerer die Entfernung zwischen den Mitochondrien und den CRAC-Kanälen an der IS ist. Obwohl die Mitochondrien in unmittelbarer Umgebung der CRAC-Kanäle zu einer Verminderung der lokalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomäne und somit zu einer Reduzierung der CRAC-Kanal-Inhibierung (vgl. Gleichung 6.40) führen, ist nicht nur der daraus unverzüglich resultierende erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom für die beobachteten hohen Calcium-Signale entscheidend. Vielmehr sagt mein Modell voraus, dass die Position der PMCA-Pumpen relativ zur Position der CRAC-Kanäle / des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms eine entscheidende Rolle zukommt. Neben der Mitochondrienposition sind die Umverteilung und Anhäufung von PMCA-Pumpen nahe der IS essentiell für die benötigten hohen globalen

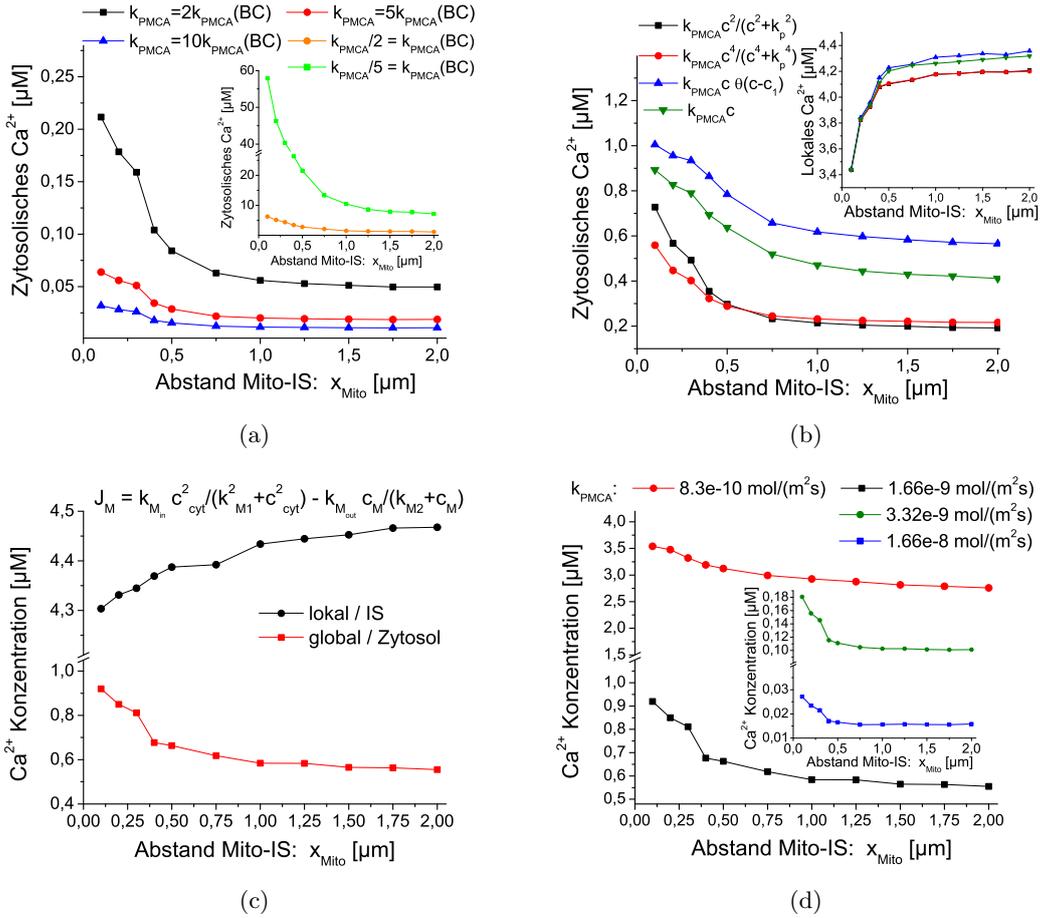


Abbildung 6.12: Robustheit der Modellvorhersagen (Distanz Mitochondrien-IS  $x_{\text{Mito}}$  kontrolliert die globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale) gegenüber Parametervariation. BC = Base-Case. a) Globales  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal als Funktion des Abstands  $x_{\text{Mito}}$  für verschiedene Werte des Parameters  $k_{\text{PMCA}}$ . Schwarze Kurve:  $k_{\text{PMCA}} = 5,6 \cdot 10^{-9}$   $[\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})]$ , rote Kurve:  $k_{\text{PMCA}} = 1,4 \cdot 10^{-8}$   $[\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})]$  und blaue Kurve:  $k_{\text{PMCA}} = 2,8 \cdot 10^{-8}$   $[\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})]$ . Inset: Orangefarbene Kurve:  $k_{\text{PMCA}} = 1,4 \cdot 10^{-9}$   $[\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})]$ , grüne Kurve:  $k_{\text{PMCA}} = 5,6 \cdot 10^{-10}$   $[\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})]$ . b) Lokale (100 nm Mikrodomäne) und globale stationäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale als Funktion des Abstands Mitochondrien - IS  $x_{\text{Mito}}$ . Im Gegensatz zum Base-Case mit unterschiedlichen Ansätzen für den PMCA-Fluss  $J_{\text{PMCA}}$  (Gleichung 6.49 + 6.50). Schwarze Kurve:  $J_{\text{PMCA}} = k_{\text{PMCA}} \cdot c_{\text{cyt}}^2 / (k_{\text{p}}^2 + c_{\text{cyt}}^2)$ ,  $k_{\text{PMCA}} = 2,8 \cdot 10^{-9}$   $[\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})]$ . Rote Kurve:  $J_{\text{PMCA}} = k_{\text{PMCA}} \cdot c_{\text{cyt}}^4 / (k_{\text{p}}^4 + c_{\text{cyt}}^4)$ ,  $k_{\text{PMCA}} = 2,8 \cdot 10^{-9}$   $[\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})]$ . Grüne Kurve:  $J_{\text{PMCA}} = k_{\text{PMCA}} \cdot c$ ,  $k_{\text{PMCA}} = 0,002$   $[\text{m}/\text{s}]$ . Blaue Kurve:  $J_{\text{PMCA}} = k_{\text{PMCA}} \cdot c \cdot \Theta(c - c_1)$ ,  $k_{\text{PMCA}} = 0,002$   $[\text{m}/\text{s}]$ , wobei  $\Theta$  eine sigmoidale Funktion und  $c_1 = 500$  nM ist. c) Lokale und globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als Funktion der Mitochondrienposition  $x_{\text{in}}$  für einen zum Base-Case unterschiedlichen Ansatz für  $J_{\text{M}}$  (Gleichung 6.51),  $J_{\text{M}} = k_{\text{M}_{\text{in}}} \cdot (c_{\text{cyt}}^2) \cdot (k_{\text{M}_1}^2 + c_{\text{cyt}}^2)^{-1} - k_{\text{M}_{\text{out}}} \cdot (c_{\text{M}}) \cdot (k_{\text{M}_2} + c_{\text{M}})^{-1}$ . Wobei  $k_{\text{M}_1} = 1$   $[\mu\text{M}]$ ,  $k_{\text{M}_2} = 1,5$   $[\mu\text{M}]$ ,  $k_{\text{M}_{\text{in}}} = 2 \cdot 10^{-6}$   $[\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})]$ ,  $k_{\text{M}_{\text{out}}} = 1,5 \cdot 10^{-6}$   $[\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})]$  und  $k_{\text{PMCA}} = 1,66 \cdot 10^{-9}$   $[\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})]$  sind. Diese Werte führen zu einer maximalen Calcium-Aufnahme durch Mitochondrien und zu einer maximalen Calcium-Abpumpung durch die PMCA-Pumpen von  $I_{\text{PMCA}}^{\text{max}} = k_{\text{PMCA}} \cdot A_{\text{PM}} = 1,66 \cdot 10^{-9} \text{mol}/(\text{m}^2\text{s}) \cdot 2 \cdot 10^{-10} \text{m}^2 = 3,3 \cdot 10^{-19} \text{mol}/\text{s}$  und  $I_{\text{M}}^{\text{max}} = 2 \cdot 10^{-6} \text{mol}/(\text{m}^2\text{s}) \cdot 5 \cdot 10^{-13} \text{m}^2 = 1 \cdot 10^{-18} \text{mol}/\text{s}$  und somit zu einem Verhältnis von  $I_{\text{PMCA}}^{\text{max}}/I_{\text{M}}^{\text{max}} = 0,33$ . d) Äquivalent zu c), jedoch für verschiedene Parameterwerte von  $k_{\text{pmca}}$  und somit für verschiedene Verhältnisse  $I_{\text{PMCA}}^{\text{max}}/I_{\text{M}}^{\text{max}}$ .

Calcium-Signale und damit auch für die T-Zell-Aktivierung. Das Verhältnis von PMCA-Pumpen, die an der IS angehäuft sind, und den restlichen PMCA-Pumpen, die homogen in der Zell-Plasmamembran verteilt sind, stellt den einzig auffindbaren Parameter dar, der den Einfluss der Mitochondrienposition auf die entstehenden stationären Calcium-Signale reduziert oder sogar aufheben kann. Falls ich die experimentell gefundene PMCA-Pumpen Anhäufung an der IS [13] vernachlässige und eine homogene Verteilung der Pumpen in der gesamten Zellmembran annehme, hängen die globalen Calcium-Signale nicht mehr vom Parameter  $x_{\text{Mito}}$  ab (siehe Abbildung 6.13 a)). Eine fatale Konsequenz für die T-Zell-Aktivierung ist die Tatsache, dass unter diesen Bedingungen keine hohen globalen Calcium-Signale existieren.

Um diesen starken Einfluss der PMCA-Pumpenverteilung zu verstehen, ist das Verhältnis für verschiedene räumliche Anordnungen der Menge an Calcium dargestellt, das vom PMCA-Cluster an der IS ( $PMCA_{IS}$ ) und den in der restlichen Membran homogen verteilten PMCA-Pumpen ( $PMCA_{PM}$ ) aus der Zelle heraus transportiert wird (siehe Abbildung 6.13 b)). Es findet also eine Art Wettbewerb zwischen den Mitochondrien und den PMCA-Pumpen um das durch die CRAC-Kanäle einströmende Calcium statt. Befinden sich die Mitochondrien in kurzer Distanz zur IS gewinnen sie den Wettbewerb gegen die PMCA-Pumpen. Je mehr Pumpen allerdings um die IS angehäuft sind, desto weniger Calcium wird von ihnen aus der Zelle abtransportiert, wodurch wiederum die globale Calciumkonzentration innerhalb der Zelle ansteigt. Ist der Abstand der Mitochondrien zur IS ( $x_{\text{Mito}}$ ) kleiner als ca. 300 nm, so ist die Menge an Calcium, die durch PMCA-Pumpen innerhalb des Clusters um die IS hinaus befördert wird, vergleichsweise gering zu der Menge, die durch die in der Zellmembran homogen verteilten PMCA-Pumpen abgepumpt wird. Im Base-Case Szenario sind 50% der Pumpen um die IS akkumuliert, während sich die restlichen 50% in der Zellmembran verteilen. Unter diesen Bedingungen beträgt der Anteil des durch die akkumulierten PMCA-Pumpen heraus beförderten Calcium ca. 20%. Demgegenüber stehen ca. 80%, die durch die in der Membran verteilten Pumpen hinaus befördert werden. Auf der anderen Seite kann man in Abbildung 6.13 erkennen, dass der Einfluss der Mitochondrienposition ( $x_{\text{Mito}}$ ) umso größer ist, je mehr PMCA-Pumpen um die IS angehäuft sind. Nimmt man an, dass alle PMCA-Pumpen homogen in der Zellplasmamembran verteilt sind und es zu keiner Akkumulation der Pumpen kommt (rote Kurve, Abb. 6.13 b), so ist das Verhältnis  $PMCA_{IS}/PMCA_{CM}$  unabhängig von der Mitochondrienposition  $x_{\text{Mito}}$  fast identisch Null. Ursache hierfür ist das sehr große Oberflächen-Verhältnis der Zellmembran zum Kugelsegment an der IS von  $A_{CM}/A_{IS} = 720$ . Der Wettbewerb zwischen Mitochondrien und PMCA-Pumpen um das durch den CRAC-Kanal einströmende Calcium ist der zweite Mechanismus, der die Calcium-Signale in T-Zellen beeinflusst. Um ein hohes globales Signal zu erhalten, ist neben der Positionierung der Mitochondrien nahe der IS auch noch ein weiterer Mechanismus verantwortlich. Wie in Rahmen des 1D Random Walk Modells ausführlich besprochen wird (siehe Abschnitt 6.3), ist es auch wichtig, dass die Mitochondrien das Calcium in größtmöglicher Entfernung zu den PMCA-Pumpen wieder ins Zytosol freisetzen. Dies ist auch der Grund dafür, dass bei Akkumulation der PMCA-Pumpen am der IS-gegenüberliegenden Pol ebenfalls eine erhöhte globale Calciumkonzentration ge-

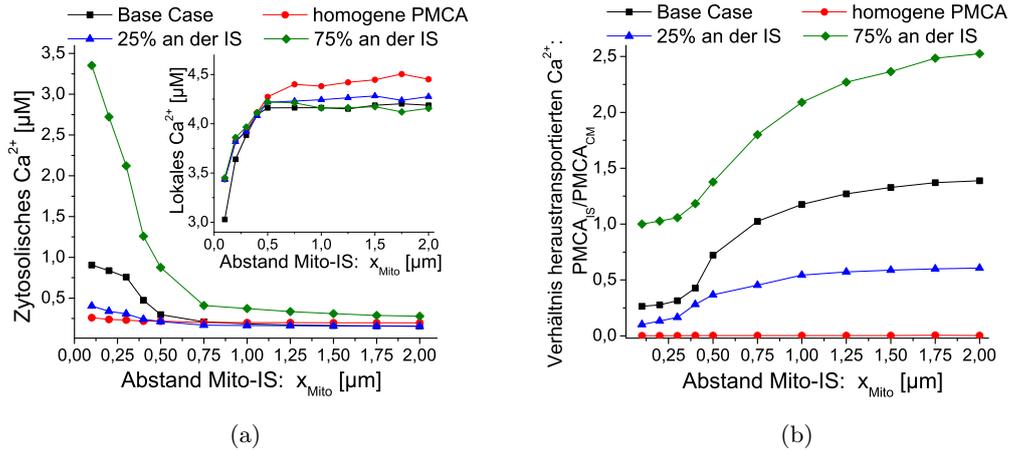


Abbildung 6.13: Einfluss der PMCA-Pumpenverteilung auf die entstehenden Calcium-Signale. a) Calcium-Signale für verschiedene PMCA-Pumpen Anhäufungen an der IS. b) Verhältnis der Menge an Calcium, das vom PMCA-Cluster an der IS und den in der restlichen Membran homogen verteilten PMCA-Pumpen aus der Zelle heraus transportiert wird.

messen werden kann. Denn in diesem Fall ist zwar der Wettbewerb zwischen den PMCA-Pumpen und den Mitochondrien minimal, jedoch der „Randbedingungs-Effekt“ maximal. Um dies zu verdeutlichen, habe ich im Anhang A.2.4 das Zusammenspiel der beiden Mechanismen anhand einer vereinfachten 3D-Würfelgeometrie dargestellt (siehe Abbildung A.9).

#### 6.4.5 Ergebnisse II: Aktive SERCA-Pumpen und Einfluss der ER / SERCA-Position

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse des Modells versuchen Vorhersagen für ein physiologisches Szenario zu machen. Dazu wird der vollständige Satz an Modellgleichungen 6.35-6.39 inklusive der Modellierung des Endoplasmatischen Retikulums in der Berechnung berücksichtigt. Die Berücksichtigung der ER-Domäne bedingt die Modellierung aktiver SERCA-Pumpen und aktiver  $\text{IP}_3$ -Kanäle. Außerdem wird die Aktivität des CRAC-Kanals in diesem Fall durch den ER-Füllstand gesteuert (vgl. Gleichung 6.40), und eine Wiederauffüllung des ER führt zur Inhibierung des Kanals.

Die zeitliche Entwicklung des globalen / zytosolischen Calcium-Signals für verschiedene Mitochondrienpositionen ist in Abbildung 6.14 a) abgebildet. Bei Annahme eines konstanten  $\text{IP}_3$ -Signals, das während der kompletten Simulationsdauer vorhanden sein soll ( $t_{\text{IP}_3} = 250$  s), sagt das Modell eine starke Abhängigkeit des globalen Calcium-Signals vom Abstand der Mitochondrien zur IS ( $x_{\text{Mito}}$ ) voraus. Dies geschieht - ohne Berücksichtigung der ER-Domäne - analog zu dem im vorigen Abschnitt diskutierten

Szenario. Als weiteres Ergebnis lässt das Modell die Aussage zu, dass die CRAC-Kanal Ströme im „stationären“ Zustand und damit verbunden die globalen Calcium-Signale umso stärker sind, je geringer der Abstand der Mitochondrien zur IS ist. Unabhängig von der Mitochondrienposition kann bei dieser Systemkonfiguration allerdings keine starke Wiederauffüllung des ER beobachtet werden und somit auch keine CRAC-Kanal-Deaktivierung. Dies ändert sich, wenn ein kürzerer  $IP_3$ -Stimulus angenommen wird. Sind die  $IP_3$ -Kanäle zum Beispiel nur für die Dauer von 30 Sekunden aktiv ( $t_{IP_3} = 30$  s), so kann man eine partielle CRAC-Kanal-Inhibierung beobachten, die durch die teilweise Wiederauffüllung des ER verursacht wird (siehe Abbildung 6.14 b)). CRAC-Kanal-Deaktivierung und ER-Auffüllung geschehen am schnellsten für kleine Werte von  $x_{Mito}$ , da in diesem Fall bei Beendigung des  $IP_3$ -Stimulus höhere globale Calciumkonzentrationen vorherrschen, und die SERCA-Pumpen zum Zeitpunkt  $t = 30$  s eine höhere Pumpleistung besitzen. Die zeitliche Entwicklung des Systems unter Annahme eines kurzzeitigen  $IP_3$ -Stimulus und eines Mitochondrien-Abstandes von  $x_{Mito} = 0,1 \mu\text{m}$  (rote Kurve in Abbildung 6.14 b)) ist als Abfolge dreidimensionaler Schnappschüsse in Abbildung 6.15 zu sehen.

Die bisherigen Resultate dieses Abschnitts ändern sich jedoch drastisch (siehe Abbildung 6.14 c)+d)), wenn die System- bzw. Modellgeometrie geändert wird. Statt einer homogenen SERCA-Pumpenverteilung über die gesamte ER-Oberfläche setzt ich nun voraus, dass sich alle SERCA-Pumpen während der Zell-Polarisierung in einem Cluster anhäufen. Dieses Cluster besteht aus einer kreisförmigen Fläche mit einem Durchmesser von 350 nm (siehe Abbildung 6.8 a), Kreis in der Mitte der ER-Domäne), die sich unterhalb der IS befindet. Bei ständiger Calcium-Freisetzung durch die  $IP_3$ -Rezeptoren, also für  $t_{IP_3} = 250$  s, sind die Ergebnisse noch qualitativ gleich zu dem Fall von homogen verteilten SERCA-Pumpen (Daten nicht gezeigt). Unter Annahme eines transienten / kurz andauernden  $IP_3$ -Signals ( $t_{IP_3} = 30$  s) kann man hingegen ein gänzlich anderes Verhalten des Systems beobachten. Befinden sich die Mitochondrien in weiter Entfernung zur IS ( $x_{Mito} > 500$  nm), so sind die Ergebnisse dieses Szenarios noch analog zu den Resultaten für Systemkonfiguration mit nicht clusternden SERCA-Pumpen: ein transienter  $IP_3$ -Stimulus bedingt eine Wiederauffüllung des ER, die dann ihrerseits zu einer Inhibierung des CRAC-Kanal Stroms führt, gefolgt von einem daraus resultierenden Abfall der globalen Calciumkonzentration. Für ein Szenario mit geclusterten SERCA-Pumpen trifft das Modell jedoch folgende Voraussage: Zellen, deren Mitochondrien sich in kurzer Distanz zur IS befinden ( $x_{Mito} < 300$  nm), können auch in Abwesenheit eines  $IP_3$ -Stimulus (also für Zeiten  $t > t_{IP_3}$ ) ein robustes globales Calcium-Signal erzeugen und aufrechtzuerhalten (siehe Abbildung 6.14 c)).

Die Zellen, bei denen die Mitochondrien in kurzer Distanz zur IS liegen, können ein hohes globales Calcium-Signal aufrechterhalten. Ursache dafür ist die geschilderte räumliche Konfiguration, die dafür sorgt, dass die Mitochondrien den Wettbewerb um  $Ca^{2+}$ -Ionen sowohl gegen die PMCA-Pumpen als auch gegen die SERCA-Pumpen gewinnen. Dadurch wird eine Wiederauffüllung des Calcium-Speichers (Endoplasmatisches Retikulum) reduziert (siehe Abbildung 6.14 d)), was wiederum auch die Inhibierung der CRAC-Kanäle verringert. Die zeitliche Entwicklung des Systems bei Annahme eines kurzen

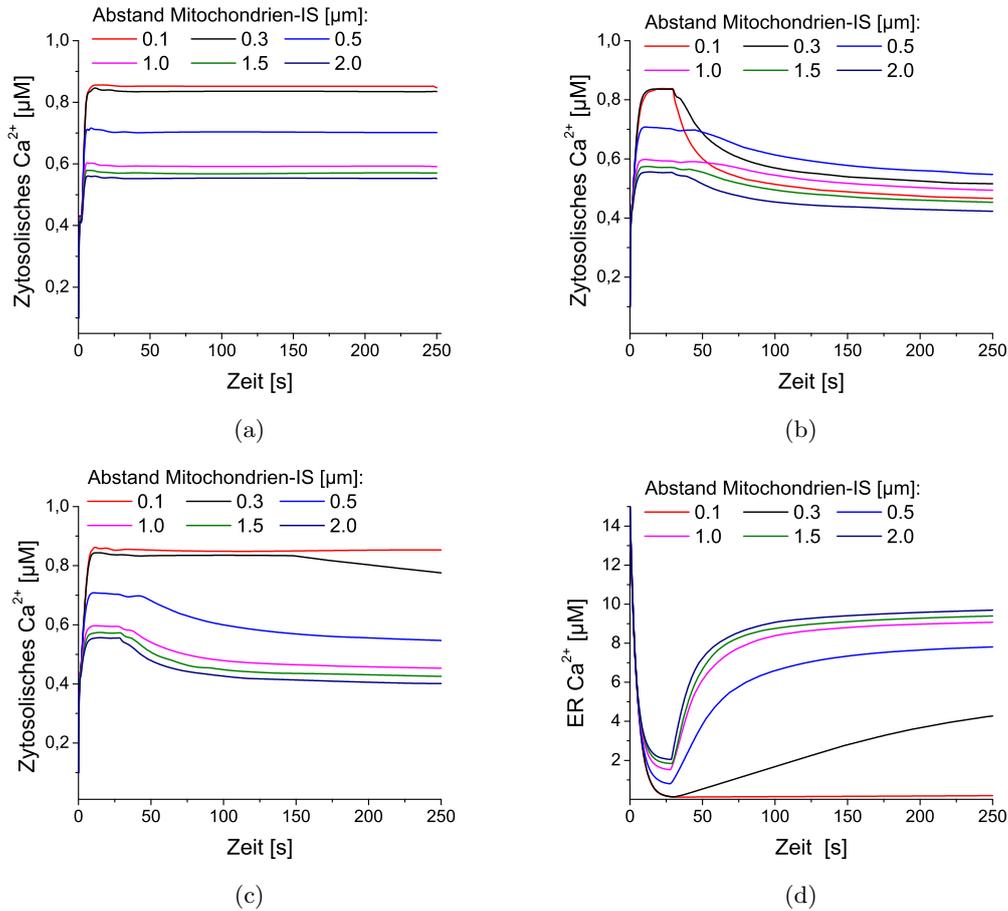


Abbildung 6.14: Zeitliche Entwicklung des globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals im Zytosol und des ER-Füllstandes für verschiedene Zeitdauern des  $\text{IP}_3$ -Signals sowie für verschiedene SERCA-Pumpenverteilungen bzw. Positionen. Für die gesamte Simulationsdauer nehme ich immobile Mitochondrien an, die sich in einem Abstand  $x_{\text{Mito}}$  zur Immunologischen Synapse befinden. a) Zeitliche Entwicklung des globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals. Die SERCA-Pumpen sind homogen auf der ER-Oberfläche verteilt, und  $\text{IP}_3$  ist während der gesamten Simulationsdauer präsent,  $t_{IP_3} = 250$  s. b) Zeitliche Entwicklung des globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals für homogen verteilte SERCA-Pumpen und  $t_{IP_3} = 30$  s. c) Zeitliche Entwicklung des globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals. Die SERCA-Pumpen sind nahe der IS akkumuliert, und  $\text{IP}_3$  ist nur während den ersten 30 Sekunden vorhanden. d) ER-Füllstand ( $\text{ER-Ca}^{2+}$ ) als Funktion der Zeit unter der Bedingung dass die SERCA-Pumpen in Nähe der IS akkumuliert sind und  $t_{IP_3} = 30$  s gilt.

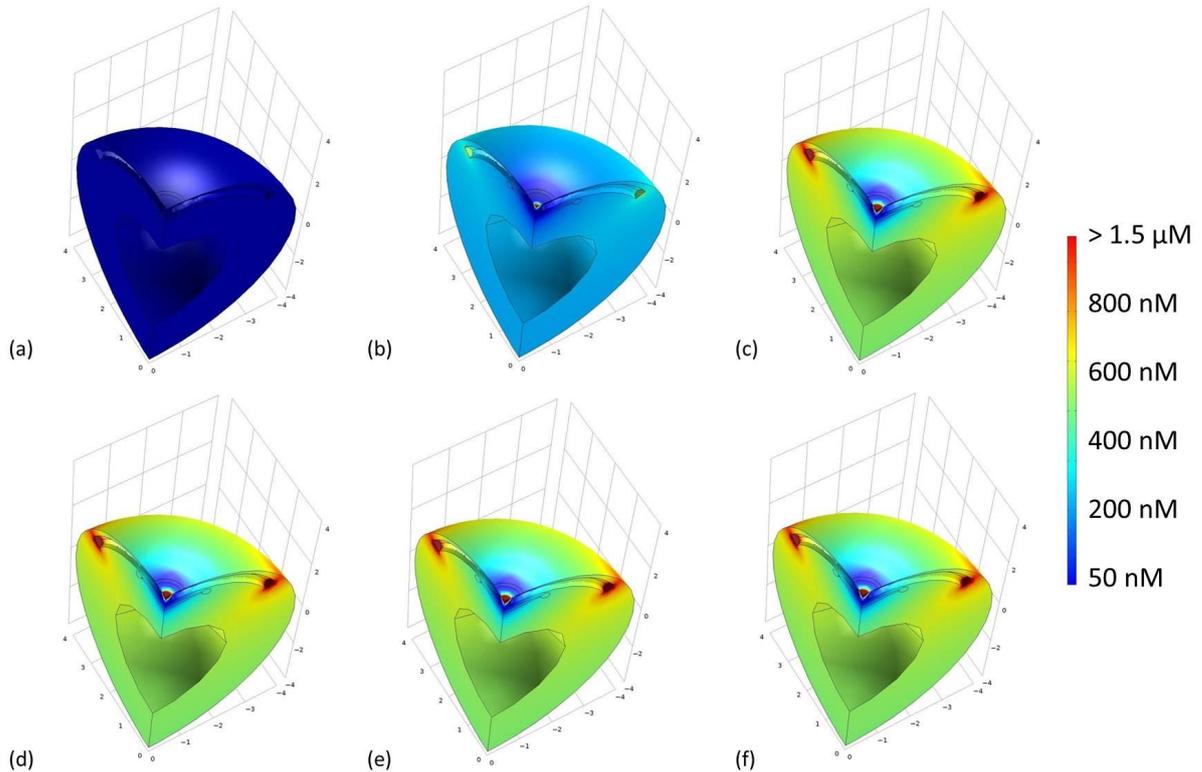


Abbildung 6.15: Dreidimensionale Schnappschüsse der räumlichen und zeitlichen Entwicklung der zytosolischen Calciumkonzentration  $c_{cyt}$ . Die verwendeten Parameter wurden in Abschnitt 6.4.3 diskutiert und sind in Tabelle 6.2 aufgelistet. Diese Schnappschüsse korrespondieren zum Verlauf der roten Kurve aus Abbildung 6.14 b). Die SERCA-Pumpen sind homogen über die ER-Membran verteilt, der Abstand Mitochondrien-IS beträgt  $x_{Mito} = 0,1 \mu\text{m}$  und  $\text{IP}_3$  ist nur während den ersten 30 Sekunden präsent ( $t_{\text{IP}_3} = 30 \text{ s}$ ). Dargestellt ist die räumliche Calciumkonzentration  $c_{cyt}$  für verschiedene Systemzeiten  $t$ : a) Zeit  $t = 0 \text{ s}$ . b) Zeit  $t = 2,5 \text{ s}$ . c) Zeit  $t = 5 \text{ s}$ . d) Zeit  $t = 30 \text{ s}$ . e) Zeit  $t = 60 \text{ s}$ . f) Zeit  $t = 250 \text{ s}$ .

$\text{IP}_3$ -Stimulus sowie eines Mitochondrien-Abstandes von  $x_{Mito} = 0,1 \mu\text{m}$  (rote Kurve in Abbildung 6.14 c)) ist als Abfolge dreidimensionaler Schnappschüsse in Abbildung 6.16 zu sehen. Auch diese Ergebnisse sind ebenso wie die Resultat des vorigen Abschnitts wieder sehr robust. Die Modell-Resultate ändern sich weder bei Annahme einer realistischeren / filigraneren ER-Geometrie noch bei Annahme eines abgeänderten Ansatzes für die Modellierung der SERCA-Pumpen, wie in Abbildung 6.17 zu sehen ist. Beide Änderungen liefern qualitativ die gleichen Resultate wie das Base-Case Szenario: wiederum kontrolliert die Mitochondrienposition die lokalen und globalen Calcium-Signale, und eine SERCA-Pumpen-Anhäufung unterhalb der IS in Kombination mit einer klei-

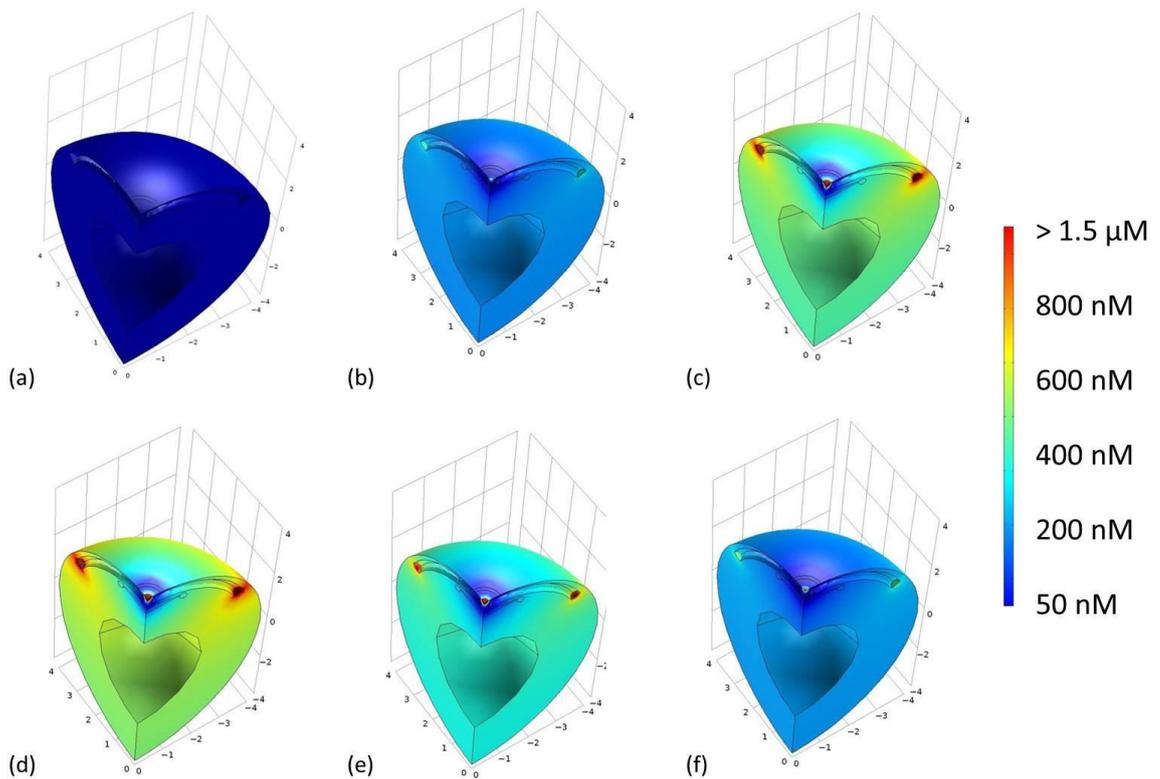


Abbildung 6.16: Dreidimensionale Schnappschüsse der räumlichen und zeitlichen Entwicklung der zytosolischen Calciumkonzentration  $c_{cyt}$ . Die verwendeten Parameter wurden in Abschnitt 6.4.3 diskutiert und sind in Tabelle 6.2 aufgelistet. Diese Schnappschüsse korrespondieren zum Verlauf der roten Kurve aus Abbildung 6.14 c). Die SERCA-Pumpen sind in der Nähe der IS akkumuliert, der Abstand Mitochondrien-IS beträgt  $x_{Mito} = 0,1 \mu\text{m}$ , und  $\text{IP}_3$  ist nur während den ersten 30 Sekunden präsent  $t_{IP_3} = 30 \text{ s}$ . Dargestellt ist die räumliche Calciumkonzentration  $c_{cyt}$  für verschiedene Systemzeiten  $t$ : a) Zeit  $t = 0 \text{ s}$ . b) Zeit  $t = 2,5 \text{ s}$ . c) Zeit  $t = 5 \text{ s}$ . d) Zeit  $t = 30 \text{ s}$ . e) Zeit  $t = 60 \text{ s}$ . f) Zeit  $t = 250 \text{ s}$ .

nen Distanz Mitochondrien-IS ( $x_{Mito} < 300 \text{ nm}$ ) führt auch ohne  $\text{IP}_3$ -Stimulus zu einem robusten Calcium-Signal.

Als Schlußfolgerung dieses Ergebnisteils lässt sich zusammenfassen, dass mein Modell auch für transiente  $\text{IP}_3$ -Signale das Vorkommen von robusten und hohen Calcium-Signalen voraussagt, die zur erfolgreichen T-Zell-Aktivierung unbedingt notwendig sind. Diese treten jedoch nur auf, wenn es der Zelle gelingt, im Zuge des Polarisationsprozesses nach erfolgter IS-Ausbildung die Mitochondrien in die Nähe der IS zu bringen und gleichzeitig die SERCA-Pumpen in dieser Region zu akkumulieren.

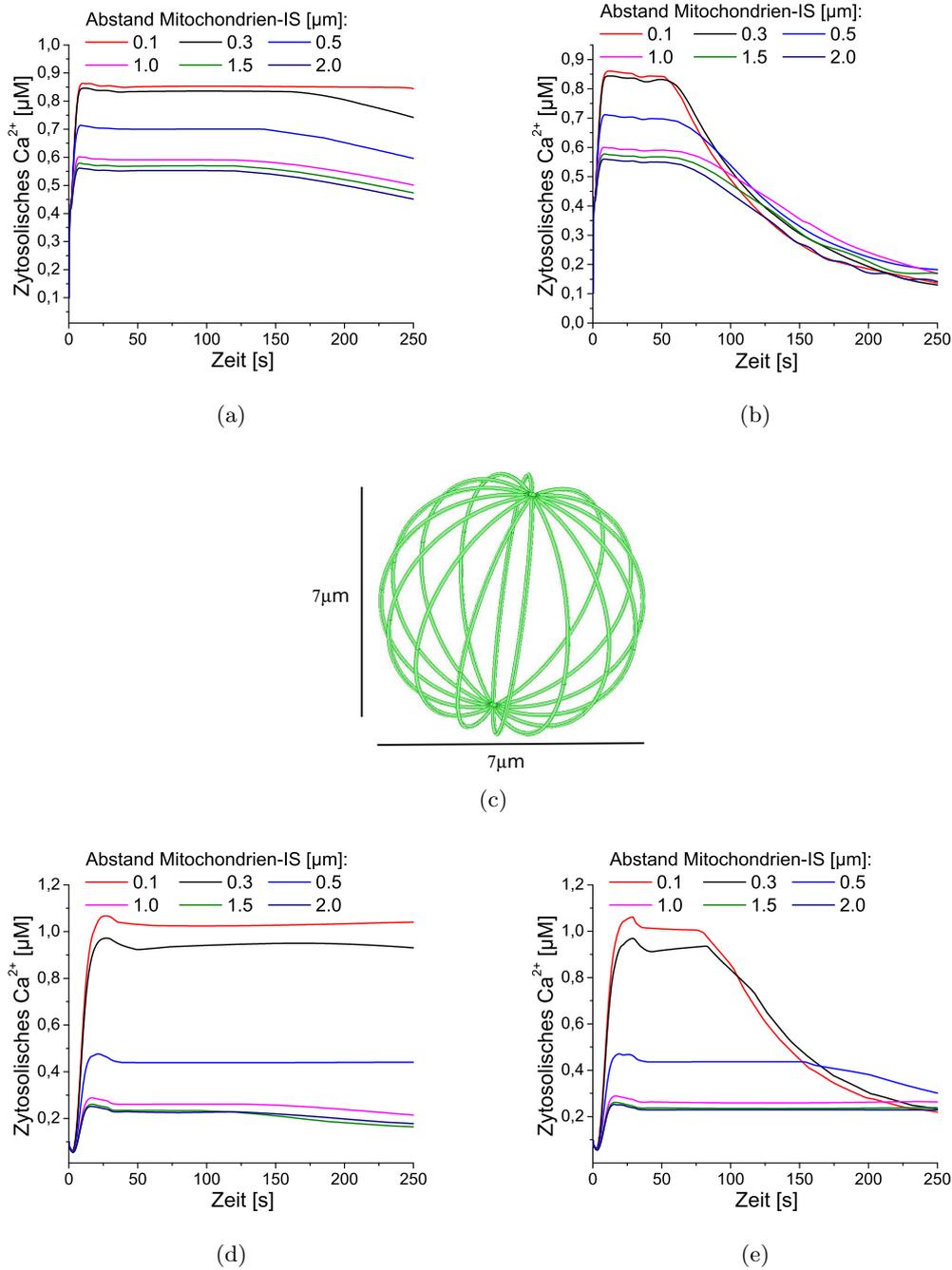


Abbildung 6.17: Zeitliche Entwicklung des globalen  $Ca^{2+}$ -Signals.  $IP_3$  ist nur während den ersten 30 Sekunden vorhanden,  $t_{IP_3} = 30s$ . a)+b): Im Gegensatz zu Abbildung 6.14 wurde ein unterschiedlicher Ansatz für Gleichung 6.43 benutzt:  $J_{SERCA} = k_{SERCA} \cdot c^2 / (c^2 + k_s^2)$ , wobei  $k_s = 300$  nM und  $k_{SERCA} = 5e^{-9}$  [mol/(m<sup>2</sup>s)] sind. a) Die SERCA-Pumpen sind nahe der IS akkumuliert. b) Die SERCA-Pumpen sind homogen in der ER-Membran verteilt. c) ER-Geometrie zur Berechnung der in Teil d)+e) erhaltenen Resultate. d) Globales  $Ca^{2+}$ -Signal, unter Annahme der in c) gezeigten ER-Geometrie und SERCA-Pumpen, die in der Nähe der IS akkumuliert sind. e) Globales  $Ca^{2+}$ -Signal, bei Annahme der in c) gezeigten ER-Geometrie und homogen in der ER-Membran verteilten SERCA-Pumpen. Vergleiche mit Abbildung 6.14.

## 6.5 Einfluss der Struktur des Mitochondriennetzwerkes sowie der Position des Endoplasmatischen Retikulums auf das globale Calcium-Signal

### 6.5.1 Einleitung

Im vorigen Abschnitt habe ich die Auswirkungen der Mitochondrienposition relativ zur Immunologischen Synapse auf die entstehenden Calcium-Signale untersucht. Bei allen von mir in diesem Rahmen durchgeführten Simulationen war die Form der Mitochondrien gleichbleibend. Lediglich die Position der Mitochondrien innerhalb des Zytoplasmas wurde geändert. In der Realität bewegen sich die Mitochondrien jedoch nicht nur fort, sondern führen auch die Prozesse der Fusion und Teilung (Fission) aus (für ein Review siehe zum Beispiel [162]). Um ihre Funktion korrekt ausüben zu können, ist es wichtig, dass die Mitochondrien keine starren Körper sind, sondern dass sie die Fähigkeit besitzen, ihre Form dynamisch zu verändern. Eine eingeschränkte bzw. geminderte Fusion und Teilung von Mitochondrien in Neuronen können verantwortlich für verschiedene neurologische Krankheiten wie zum Beispiel Alzheimer sein [163]. Fusion und Teilung ermöglichen es den Mitochondrien untereinander, und mit dem Zytoplasma zu kommunizieren, Inhalte untereinander auszutauschen sowie schneller auf Veränderungen innerhalb der Zelle zu reagieren.

Vor diesem Hintergrund möchte ich im Folgenden zusätzlich noch den Einfluss der Struktur des Mitochondriennetzwerkes auf das globale Calcium-Signal untersuchen. Ich versuche herauszufinden, wie sich die vorgegebene Form der Mitochondrien, ihre Vernetzung untereinander und ihre Position relativ zu den PMCA-Pumpen auf die globale Calciumkonzentration auswirkt. Dazu verwende ich sowohl das 3D-Modell des vorigen Abschnitts als auch dessen vereinfachte, zweidimensionale Version, die ich im Folgenden vorstellen möchte.

Ich greife für diese Simulationen auf ein zweidimensionales Modell zurück, da es zwei enorme Vorteile gegenüber der Modellierung in 3D bietet. Zum einen lassen sich die verschiedenen Strukturen des Mitochondriennetzwerkes schneller mit Hilfe der Software Comsol-Multiphysics programmieren und erzeugen, zum anderen benötigt die Berechnung der stationären Lösung weitaus weniger Computerrechenzeit, als dies in 3D der Fall wäre. Neben den Auswirkungen der Struktur des Mitochondriennetzwerkes möchte ich das 2D-Modell dazu nutzen, um einer weiteren interessanten Frage nachzugehen: Welchen Einfluss hat die Position des Endoplasmatischen Retikulums auf die entstehenden Calcium-Signale? Auch wenn das Endoplasmatische Retikulum nicht als Calcium-Speicher betrachtet wird, da ich von vollständig aktivierten CRAC-Kanälen und geblockten SERCA-Pumpen ausgehe (Thapsigargin-Experimente), so stellt das Endoplasmatische Retikulum doch zumindest eine räumliche Begrenzung der zytosolischen Calcium-Diffusion dar. Inwieweit diese Beschränkung der Diffusion die globale Calciumkonzentration und somit letztendlich die T-Zell-Aktivierung beeinflussen kann, versuche ich am Ende dieses Abschnitts näher zu erläutern.

## 6.5.2 2D-Modell zur Untersuchung der Calcium-Signale

Ich betrachte hier eine T-Zelle, bei der die SERCA-Pumpen durch die Droge Thapsigargin blockiert, somit das Endoplasmatische Retikulum entleert und die CRAC-Kanäle vollständig aktiviert sind. Bei der Untersuchung von Calcium-Signalen in zwei Dimensionen nehme ich eine quadratische T-Zelle an, die eine Seitenlänge von  $l_{Zelle} = 8 \mu\text{m}$  besitzt und somit eine Fläche von  $64 \mu\text{m}^2$  umfasst (siehe Abbildung 6.18). Im Gegensatz zu den Simulationen in drei Dimensionen vernachlässige ich im 2D-Modell die Modellierung des Zellkerns sowie der mobilen Calcium-Puffer, was jedoch qualitativ keinen Einfluss auf die Resultate hat. Eine weitere Änderung zum 3D-Modell besteht darin, dass die Anzahl, Größe und Form der Mitochondrien nicht für alle Simulationen gleich ist. Lediglich die aufsummierte Gesamtfläche der in der Simulation vorkommenden Mitochondrien ist konstant und beträgt  $2,7 \mu\text{m}^2$ , was ca. 5% der Zellfläche ausmacht.

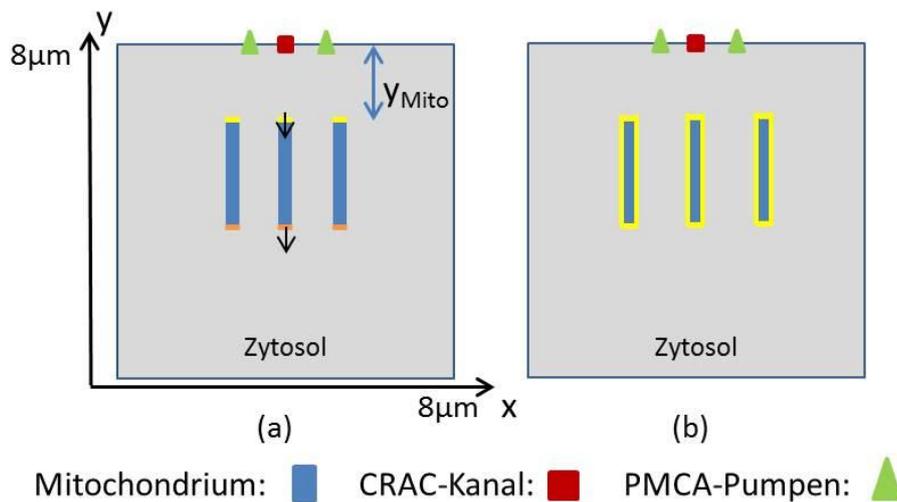


Abbildung 6.18: Schematische Darstellung der 2D-Modellgeometrie. Die Mitochondrien sind blau, der CRAC-Kanal rot und die PMCA-Pumpen grün. Der Modellparameter der den kürzesten Abstand des Mitochondriennetzwerkes zur Immunologischen Synapse angibt wird als  $y_{Mito}$  bezeichnet. a) Szenario 1: analog zum Base-Case in 3D können die Mitochondrien das Calcium nur an den zur IS zeigenden Enden (gelb) aufnehmen und an den gegenüberliegenden Enden (orange) wieder abgeben. b) Szenario 2: die Calcium-Aufnahme und Freisetzung durch die Mitochondrien findet auf der gesamten Mitochondrienoberfläche (gelb) statt.

In den zweidimensionalen Simulationen unterscheidete ich zwei Szenarien: Im ersten Fall können die Mitochondrien analog zum 3D-Modell das Calcium nur an den Mitochondrienspitzen aufnehmen, die parallel zum CRAC-Kanal verlaufen (siehe Abbildung 6.18 a), gelbe Fläche), und an den Mitochondrienenden (orangefarbene Fläche) wieder an das Zy-

tosol abgeben. Im zweiten Szenario modelliere ich die Mitochondrien derart, dass die Calcium-Aufnahme und -Abgabe auf der gesamten Mitochondrienoberfläche stattfinden kann (siehe Abbildung 6.18 b), gelb gekennzeichnet). Innerhalb der Mitochondrien diffundiert das Calcium mit Diffusionskonstante  $D_M$ , die um einen Faktor 10 kleiner ist als die freie Calcium-Diffusion im Zytosol. An der Immunologischen Synapse befindet sich ein CRAC-Kanal-Cluster, das aus ca. 40-100 Kanälen besteht. Es hat eine Ausdehnung von  $l_{CRAC} = 0,1 \mu m$  und erstreckt sich von der Position  $(x/y) = (-0,05 \mu m / 8 \mu m)$  bis hin zur Position  $(x,y) = (0,05 \mu m / 8 \mu m)$ . In einem Abstand von 350 nm zu diesem CRAC-Cluster befindet sich jeweils links und rechts davon eine Akkumulation von PMCA-Pumpen, die eine Ausdehnung von 200 nm haben und sich von  $(x/y) = (-0,6 \mu m / 8 \mu m)$  bis  $(x/y) = (-0,4 \mu m / 8 \mu m)$  und von  $(x/y) = (0,4 \mu m / 8 \mu m)$  bis  $(x/y) = (0,6 \mu m / 8 \mu m)$  erstrecken. Im Base-Case Szenario sind 50% aller PMCA-Pumpen innerhalb dieser beiden Strecken angehäuft, wohingegen die restlichen 50% der Pumpen homogen in der Zellplasmamembran (PM) verteilt sind. Die Modellgeometrie ergibt sich als Summe von zwei disjunkten Gebieten, dem Zytosol und den Mitochondrien. Innerhalb dieser Gebiete wird die Calcium-Dynamik durch folgende Differentialgleichungen beschrieben:

$$\text{Zytosol : } \frac{\partial c_{cyt}}{\partial t} = D_{cyt} \nabla^2 c_{cyt} \quad (6.46)$$

$$\text{Mitochondrien : } \frac{\partial c_M}{\partial t} = D_M \nabla^2 c_M. \quad (6.47)$$

Den Calcium-Transfer zwischen den zweidimensionalen Gebieten sowie den Calcium-Ein- und -Ausstrom durch die PM bezeichne ich analog zum 3D-Modell mit  $J_M$  und  $J_{PM}$ . Diese Ströme werden als Fluss- bzw. Randbedingungen auf den entsprechenden Flächen / Strecken definiert. Der Calcium-Austausch durch die Zellmembran  $J_{PM}$  setzt sich aus zwei Beiträgen zusammen,  $J_{PM} = J_{CRAC} - J_{PMCA}$ , dem Einstrom der CRAC-Kanäle und dem Calcium, das durch die PMCA-Pumpen aus dem Zytosol herausgepumpt wird. Hierbei ist  $J_{CRAC}$  nur innerhalb des CRAC-Clusters (rotes Quadrat in Abbildung 6.18) definiert. Der Calcium-Einstrom des CRAC-Clusters wird durch die dort vorherrschende Calciumkonzentration inhibiert und ergibt sich zu:

$$J_{CRAC} = k_{CRAC} \cdot \text{Sig}(-c_{cyt} + 6,5 \mu M, 1 \mu M). \quad (6.48)$$

Hierbei bezeichnet Sig eine sigmoidale Funktionen, die die CRAC-Kanal-Inhibierung durch eine erhöhte Calcium-Mikrodomänen-Konzentration wiedergibt. Sie ist identisch dem Wert 1 für alle zytosolischen Calciumkonzentrationen, die kleiner als  $5,5 \mu M$  sind, und identisch 0 für alle Konzentrationen, die größer als  $7,5 \mu M$  sind. Zwischen  $5,5 \mu M$  und  $7,5 \mu M$  fällt die Funktion von eins auf Null ab und nimmt bei  $6,5 \mu M$  den Wert 0,5 an. Die PMCA-Pumpen sind für das Abpumpen des zytosolischen Calciums durch die Zellmembran in den extrazellulären Raum verantwortlich, und der entsprechende Fluss wird analog zum 3D-Modell durch

$$J_{PMCA,PM} = k_{PMCA,PM} \cdot \frac{c_{cyt}}{k_p + c_{cyt}}, \quad (6.49)$$

und

$$J_{PMCA,IS} = k_{PMCA,IS} \cdot \frac{c_{cyt}}{k_p + c_{cyt}}, \quad (6.50)$$

modelliert. Dabei ist  $J_{PMCA,PM}$  auf der Zellplasmamembran-Oberfläche definiert und  $J_{PMCA,IS}$  beschreibt den Fluss durch die PMCA-Pumpen, die innerhalb der beiden Strecken um die IS herum (grüne Dreiecke in Abbildung 6.18) akkumuliert sind. Der Parameter  $k_p$  repräsentiert die Calciumkonzentration, bei der die Pumpen mit der Hälfte ihrer Maximaleffektivität  $k_{PMCA}$  arbeiten.

Die Calcium-Aufnahme bzw. -Abgabe und Umverteilung durch die Mitochondrien wird durch den Fluss

$$J_M = -k_{M_{in}} \cdot c_{cyt} + k_{M_{out}} \cdot c_M, \quad (6.51)$$

modelliert, wobei  $k_{M_{in}} \cdot c_{cyt}$  die Calcium-Aufnahme und der Term  $k_{M_{out}} \cdot c_M$  die Calcium-Freisetzung durch die Mitochondrien beschreibt. Die mitochondriale Calcium-Aufnahme hängt in dem 2D-Modell analog zum 3D-Modell von der zytosolischen Konzentration  $c_{cyt}$  ab. Hingegen ist die Calcium-Freisetzung durch die Mitochondrien eine Funktion des bereits durch die Mitochondrien aufgenommenen bzw. gepufferten Calciums  $c_M$ . Wie bereits oben im Text erläutert wurde, findet die Calcium-Aufnahme und -Umverteilung durch die Mitochondrien je nach betrachtetem Szenario auf der gesamten Mitochondrienoberfläche oder nur einigen ausgezeichneten Mitochondrienflächen statt. Die in der Standardkonfiguration benutzen Parameterwerte sind in Tabelle 6.3 zusammengefasst.

Parameter	Wert [Einheit]	Parameter	Wert [Einheit]
$D_{cyt}$	200 [ $\mu m^2/s$ ]	$k_{M_{in}}$	$2 \cdot 10^{-3}$ [ $m/s$ ]
$D_M$	20 [ $\mu m^2/s$ ]	$k_{M_{out}}$	$6 \cdot 10^{-5}$ [ $m/s$ ]
$c_{cyt}(t=0)$	100 [ $nM$ ]	$k_{PMCA}$	$2 \cdot 10^{-6}$ [ $mol/(m^2s)$ ]
$c_M(t=0)$	100 [ $nM$ ]	$k_{CRAC}$	$6 \cdot 10^{-5}$ [ $mol/(m^2s)$ ]
$k_p$	0,25 [ $\mu M$ ]	$s_{CRAC}$	0,1 $\mu m$
$s_{PM}$	32 $\mu m$	$s_{PMCA}$	0,4 $\mu m$
$A_{Zelle}$	64 $\mu m^2$	$A_M$	2,7 $\mu m^2$

Tabelle 6.3: Parameter, Diffusionsraten sowie Anfangswerte, die als Base-Case- oder Standard-Parameter des 2D-Modells benutzt werden.

### 6.5.3 Ergebnisse

Um den Einfluss der Struktur des Mitochondriennetzwerkes zu untersuchen, verwende ich zunächst das 3D-Modell des vorigen Abschnitts. Da hier das Aussehen, die Form und die räumliche Anordnung der Mitochondrien eine wesentliche Rolle spielen, betrachte ich eine mitochondriale Calcium-Aufnahme und -Abgabe, die auf der gesamten Mitochondrienoberfläche (blaue Fläche, siehe Abbildung 6.19) definiert ist. Die Kernaussagen und Resultate des Base-Case Szenarios aus dem vorigen Abschnitt bleiben dadurch qualitativ unverändert, was durch einen Vergleich der Abbildung 6.11 a) und 6.19 a) ersichtlich wird.

Allerdings erkennt man auch, dass die globale Calciumkonzentration weniger stark durch die Mitochondrienposition beeinflusst wird, wenn man eine Calcium-Aufnahme und Calcium-Freisetzung auf der gesamten Mitochondrienoberfläche zulässt. Hier steht eine Erhöhung der globalen Konzentration von ca. 200 nM auf 800 nM für den Base-Case einer weitaus geringeren Erhöhung von 550 nM auf 680 nM für den hier betrachteten Fall gegenüber. Dass der Einfluss der Mitochondrienposition auf die globale Calciumkonzentration hier schwächer ist, hängt damit zusammen, dass der Effekt der Randbedingungen (siehe Abschnitt 6.3) weniger stark ausfällt. Der Mechanismus, der bei Calcium-Aufnahme und -Abgabe auf der gesamten Mitochondrienoberfläche bestimmend ist, ist der Wettbewerb zwischen PMCA-Pumpen und Mitochondrien. Da sich in der gesamten Zellmembran PMCA-Pumpen befinden, kommt nun der Lage bzw. dem Verlauf der Mitochondrien innerhalb des Zytosols mehr Bedeutung zu, auch wenn diese Pumpen weitaus weniger stark konzentriert sind als um die Immunologische Synapse herum.

In Teil b) der Abbildung 6.19 erkennt man, dass die Form und der räumliche Verlauf des Mitochondriennetzwerkes vom Typ I - der im vorigen Abschnitt auch als Standardkonfiguration benutzt wurde - bereits eine optimale Erhöhung der globalen Calciumkonzentration in Abhängigkeit der Mitochondrienposition hervorruft. Sowohl eine Netzwerkstruktur vom Typ II oder III, die aus mehreren einzelnen Mitochondrien bestehen, als auch die Strukturen IV-VI, die sich durch eine stärkere Vernetzung auszeichnen, erreichen kein so hohes Calcium-Signal wie die Struktur I.

Die Aufspaltung des Netzwerkes (Typ II) führt zu einem geringeren Calcium-Signal als eine Netzwerkstruktur des Typs I. Einen weiteren Abfall der globalen Calciumkonzentration erhält man, wenn sich in Höhe der PMCA-Pumpen Akkumulation (grünes Kreissegment in Abbildung 6.19) keine Mitochondrien befinden (Geometrie vom Typ III), da in diesem Fall das Calcium ungehindert ins Zelläußere transportiert wird. Auch ein weit verzweigtes Mitochondriennetzwerk (Geometrie vom Typ IV) erzielt kein so hohes Calcium-Signal wie die Base-Case-Konfiguration I. Eine Ursache hierfür liegt in der räumlichen Anordnung der Mitochondrien, die sehr dicht unterhalb der Plasmamembran verlaufen und dadurch das Abpumpen des Calciums durch die in der Membran sitzenden PMCA-Pumpen begünstigt wird. Versucht man dem entgegenzuwirken (Modellgeometrie Typ V) und den Abstand der Mitochondrien zur Zellmembran auf ca. 1  $\mu\text{m}$  zu erhöhen, so misst man das mit Abstand geringste Calcium-Signal aller von mir untersuchten Mitochondriennetzwerke. Der Grund dafür liegt darin, dass nun auch an der IS

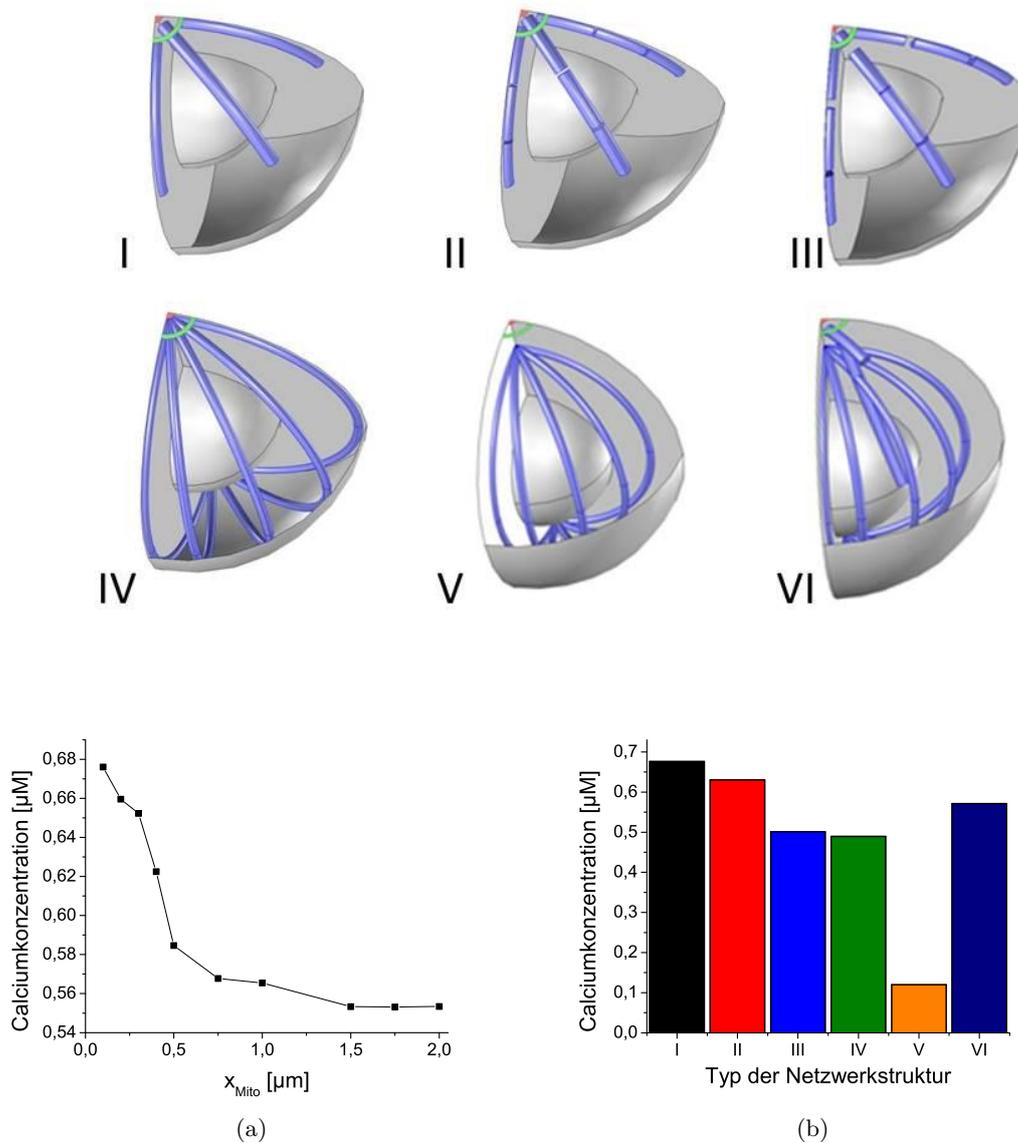


Abbildung 6.19: Ergebnisse des 3D-Modells. Oben sind die sechs verschiedenen Modellgeometrien skizziert, für die mit Hilfe des 3D-Modells die stationären Calcium-Signale berechnet wurden. Im Gegensatz zum Base-Case Szenario des 3D-Modells erfolgen die Calcium-Aufnahme und -Freisetzung durch die Mitochondrien auf der gesamten, blau eingefärbten Mitochondrienoberfläche. Der CRAC-Kanal ist rot und die PMCA-Pumpen sind grün dargestellt. a) Globale Calciumkonzentration in Abhängigkeit des Abstandes der Mitochondrien zur IS  $x_{\text{Mito}}$  für die Geometrie I. b) Stationäre globale Calciumkonzentration für die sechs verschiedenen Mitochondriennetze I-VI.

keine Mitochondrien mehr verlaufen und dort das einströmende Calcium unverzüglich von den PMCA-Pumpen wieder nach außen transportiert wird. Eine Veränderung der Struktur vom Typ V, bei der ein Mitochondrium vom höchsten Punkt des Netzwerkes senkrecht nach oben zur Immunologischen Synapse führt, erhöht die gemessene stationäre Calciumkonzentration auf einen Wert von  $0,48 \mu\text{M}$  (Daten nicht gezeigt).

Eine ähnliche Umgestaltung des Netzwerkes, die bezogen auf das erhaltene Calcium-Signal weiter optimiert wurde, ist die als Typ VI bezeichnete Netzwerkstruktur. Sie entsteht durch eine Erweiterung des Mitochondriennetzwerk vom Typus V durch ein zur IS verlaufendes Mitochondrium. Dieses zusätzliche Mitochondrium ist mit dem ursprünglichen Netzwerk verbunden, befindet sich in einem sehr geringen Abstand zur IS und läuft an der PMCA-Pumpen-Akkumulation vorbei. Der geringe Abstand zur IS und die Lage relativ zum Ort der PMCA-Pumpen-Akkumulation sorgt dafür, dass das Mitochondriennetzwerk - im Gegensatz zur Struktur V - wieder in der Lage ist, den Wettbewerb um das einströmende Calcium gegen die PMCA-Pumpen zu gewinnen.

Insgesamt lassen diese Untersuchungen den Schluss zu, dass ein weitverzweigtes Mitochondriennetzwerk ebenso wie eine Aufspaltung des Netzwerkes in viele einzelne Mitochondrien nicht optimal sind, um ein für die T-Zell-Aktivierung erforderliches, starkes und robustes Calcium-Signal zu erhalten. Eine hohe Calciumkonzentration tritt immer dann auf, wenn die Mitochondrien in einem eher kompakten Netzwerk organisiert sind, das sich in geringer Distanz zur IS befindet und am Ort der PMCA-Pumpen vorbei läuft. Auf diese Weise könne sie wirkungsvoll mit den PMCA-Pumpen um das einströmende Calcium konkurrieren.

Um meine bisherigen Aussagen und Erkenntnisse weiter quantifizieren zu können, habe ich das oben im Text beschriebene 2D-Modell genutzt. Mit dessen Hilfe habe ich die stationären Calcium-Signale in Abhängigkeit des Abstandes  $y_{Mito}$  für verschiedene Strukturen des Mitochondriennetzwerkes berechnet.

Die Ergebnisse dieser Studien sind für die zwei oben im Text beschriebenen Szenarien in Abbildung 6.20 dargestellt. Insgesamt habe ich neun unterschiedliche Netzwerkstrukturen untersucht, die ebenfalls in Abbildung 6.20 gezeigt werden, und die in aufsteigender Nummerierung zu höheren Calcium-Signalen führen. Man erkennt unmittelbar, dass die Struktur der Mitochondriennetzwerke einen bedeutenden Einfluss auf die sich einstellenden stationären Calcium-Signale hat, auch wenn weiterhin der Abstand des Mitochondriennetzwerkes zur IS ( $y_{Mito}$ ) eine sehr wichtige Rolle spielt. Die genaue Struktur des Mitochondriennetzwerkes gewinnt für Abstände  $y_{Mito}$ , die kleiner als ca.  $750 \text{ nm}$  sind, immer mehr an Bedeutung. Für einen Wert von  $y_{Mito} = 0,1 \mu\text{m}$  kann das Calcium-Signal von  $680 \text{ nM}$  (Geometrie 1) auf  $975 \text{ nM}$  (Geometrie 9), also um fast 50%, erhöht werden.

Eine weitere Schlussfolgerung die das Modell zulässt ist, dass die Fusion der Mitochondrien, also eine Verringerung der Mitochondrienanzahl sowie eine Veränderung der Netzwerkstruktur hin zu robusteren Formen von Vorteil für hohe Calcium-Signale sind. Analog zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen des 3D-Modells zeigt eine starke Vernetzung der Mitochondrien (Geometrie 4) hingegen keine erkennbare Begünstigung für das Vorkommen von starken Calcium-Signalen. Die stationäre Calciumkonzentration der Geo-

metrie 4 liegt niedriger als beispielsweise die der Geometrien 5 und 6, bei denen drei nicht untereinander vernetzte Mitochondrien für die Calcium-Signale verantwortlich sind. Die höchsten globalen Calciumkonzentrationen können für die Modellgeometrien und entsprechenden Mitochondriennetzwerke 7-9 gemessen werden. Bei diesen drei Konfigurationen sind die Mitochondrien vollständig zu einem einzigen großen Cluster / Netzwerk fusioniert und unterscheiden sich lediglich durch ihre x- bzw. y-Ausdehnungen. Das Cluster der Geometrie 7 ist  $0,9 \mu\text{m} \cdot 3 \mu\text{m}$ , das Cluster der Geometrie 8 ist  $3 \mu\text{m} \cdot 0,9 \mu\text{m}$  und das Cluster der Geometrie 9 ist  $\sqrt{2,7} \mu\text{m} \cdot \sqrt{2,7} \mu\text{m}$  groß. Da die Calcium-Signale der Geometrien 8 und 9 höher sind als die der Geometrie 7, kann man schlussfolgern, dass es für hohe Calcium-Signale wichtig ist, dass das Mitochondrien-Cluster sich bis hin zu den PMCA-Pumpen-Akkumulationen (äußerste x-Koordinaten  $\pm 0,6 \mu\text{m}$ ) erstreckt. Die erhaltenen Resultate sind unabhängig von der Modellierung der mitochondrialen Calcium-Aufnahme und Freisetzung, wie ein Vergleich von Teil a) und b) der Abbildung 6.20 zeigt. Lediglich kleine Abweichungen können festgestellt werden. So sind beispielsweise die Werte der Calciumkonzentration für die Geometrien 6 und 7 für Szenario 1 fast gleich, unterscheiden sich aber für Szenario 2, bei dem die Konzentration im Falle der Geometrie 7 höher ist.

Betrachtet man die neun von mir exemplarisch ausgewählten und modellierten Mitochondriennetzwerke sowie die dazu entsprechenden Verläufe der Calciumkonzentration in Abhängigkeit des Parameters  $y_{Mito}$ , so kann man zusammenfassend Folgendes festhalten: Zum einen hat die Struktur des Mitochondriennetzwerkes einen eindeutigen Einfluss auf die entstehenden Calcium-Signale in T-Zellen. Hierbei werden hohe Calciumkonzentrationen sowohl durch Fusion der Mitochondrien begünstigt als auch durch einen Zusammenschluss der Mitochondrien zu einem robusten Cluster. Eine Vernetzung / Verzweigung der Mitochondrien, wie sie in Geometrie 4 dargestellt ist, ist nicht optimal für die T-Zell-Aktivierung. Zum anderen ist weiterhin die Position des Mitochondriennetzwerkes relativ zur IS und relativ zu den PMCA-Pumpen ein entscheidendes Kriterium für hohe Calcium-Signale. Unabhängig von der Art der Modellierung der mitochondrialen Calcium-Aufnahme und Freisetzung werden optimale Signale für solche Netzwerke gemessen, die sich gleichzeitig sehr nahe am CRAC-Cluster und den PMCA-Pumpen-Anhäufungen befinden. Um einen besseren Eindruck der Calcium-Umverteilung der verschiedenen Netzwerkstrukturen zu erhalten ist der räumliche Konzentrationsverlauf der neun Netzwerke im Anhang in Abbildung A.10 dargestellt.

Bei den meisten meiner theoretischen Studien dieses Kapitels gehe ich davon aus, dass die SERCA-Pumpen blockiert sind, das ER entleert ist, und deshalb die CRAC-Kanäle vollständig aktiviert sind. In diesem Fall hat das ER keine direkte Auswirkung auf die Calcium-Dynamik und taucht nicht in den Modellgleichungen auf, weshalb auch die ER-Domäne bei diesen Simulationen keine Berücksichtigung findet. Aber selbst wenn das ER keinen direkten Einfluss auf die Calcium-Dynamik ausübt, so ist es weiterhin Bestandteil der Zelle und stellt zumindest ein räumliches Hindernis für die Calcium-Diffusion dar. Im Folgenden diskutiere ich deshalb Simulationsergebnisse, die unter Einbeziehung der ER-Domäne berechnet wurden. In diesen Simulationen stellt das ER ein geometrisches Hindernis ohne weitere Funktion dar und impliziert lediglich Randbedingungen für die

Calcium-Diffusion. Da es sich hier zunächst nur um ein reines Testszenario handelt und erste quantitative Resultate betrachtet werden, spielt das genaue Aussehen des ER keine Rolle. Der Abstand des ER zur Zellplasmamembran beträgt in allen Berechnungen

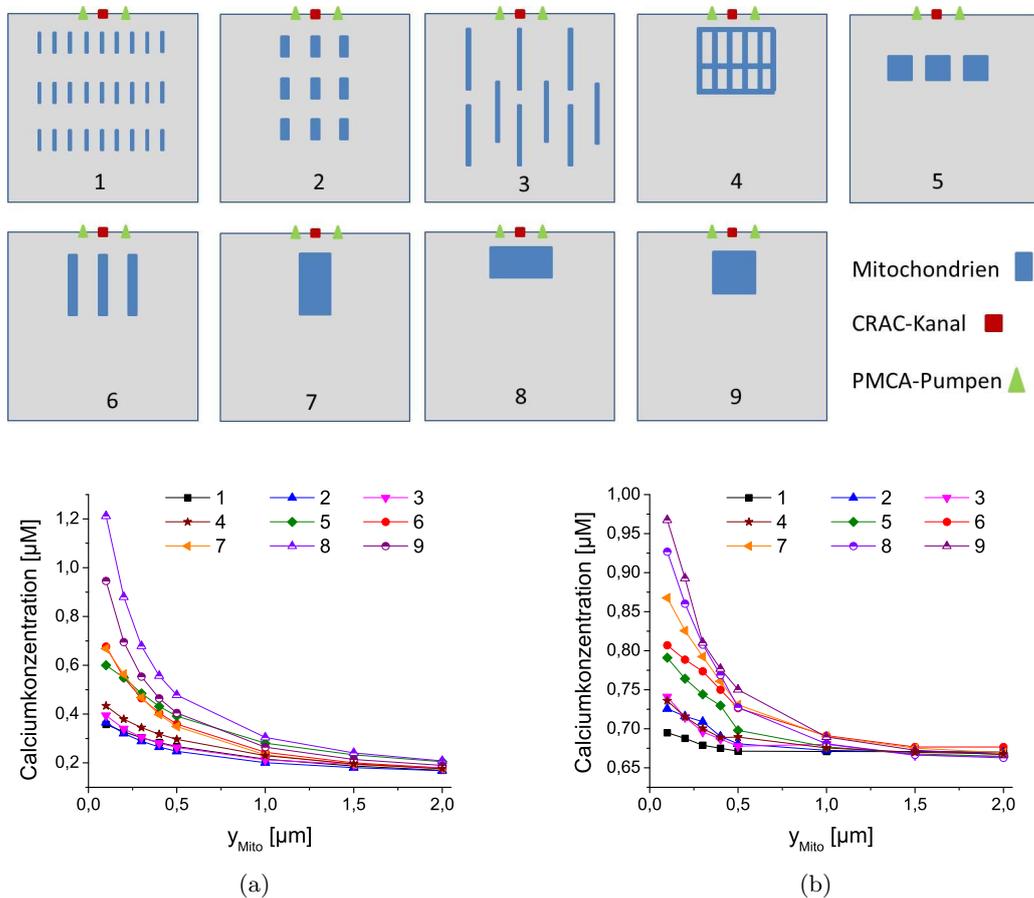


Abbildung 6.20: Ergebnisse des 2D-Modells. Oben sind die neun verschiedenen Strukturen bzw. Formen der Mitochondrien und Mitochondriennetzwerke dargestellt, für die mit Hilfe des 2D-Modells die stationären Calcium-Signale berechnet wurden. Das gesamte Mitochondrienvolumen bzw. die aufsummierte Mitochondrienfläche in 2D ist für alle neun Netzwerkformen gleich. Dadurch ändert sich jedoch je nach Vernetzungsgrad die Strecke, auf der die Mitochondrien Calcium aufnehmen und freisetzen können. a) und b): Stationäres globales Calcium-Signal für die neun verschiedenen Mitochondriennetzwerke in Abhängigkeit des kürzesten Abstands des Mitochondriennetzwerkes zur Immunologischen Synapse  $y_{\text{Mito}}$ . a) Szenario 1 aus Abbildung 6.18, die Calcium-Aufnahme und -Abgabe ist nur an den Mitochondrienenden erlaubt. b) Szenario 2: Die Calcium-Aufnahme und -Freisetzung durch die Mitochondrien findet auf der gesamten Mitochondrienoberfläche statt. Vergleiche auch mit der Abbildung A.10 im Anhang.

20 nm, da die Bildung der CRAC-Kanäle nur an den sogenannten Plasmamembran-Junctions stattfinden kann (siehe Kapitel 2.4.1). Dies sind Orte, an denen der Abstand Zellplasmamembran-ER ca. 10-25 nm beträgt [101]. Mit Hilfe von fünf unterschiedlichen Test-Geometrien (siehe Abbildung 6.21) möchte ich folgende Fragen beantworten: Welche Auswirkung hat eine Einschränkung der Calcium-Diffusion durch das ER, falls

1. sich das ER in kurzer Distanz zum CRAC-Kanal-Cluster befindet (Geometrie II)?
2. das ER von den Mitochondrien verdrängt wurde und sich vor die PMCA-Pumpen geschoben hat (Geometrie III)?
3. das ER von den Mitochondrien so verdrängt wurde, dass sich eine sehr große ER-Fläche zwischen CRAC-Kanal / Mitochondrien und die PMCA-Pumpen geschoben hat (Geometrie IV und V)?

Die Auftragung der stationären, globalen Calciumkonzentration für die fünf unterschiedlichen Geometrien I-V in Abbildung 6.21 lässt die wichtigste Aussage dieser Simulationen erkennen: um ein hohes globales Calcium-Signal zu erreichen, ist es von großer Bedeutung, dass die Mitochondrien das ER von der IS verdrängen.

Als Vergleichswert für eine Simulation ohne Berücksichtigung der ER-Domäne ist die Modellgeometrie I abgebildet, die der Netzwerkstruktur 7 aus Abbildung 6.20 entspricht. Befindet sich das ER noch vor dem CRAC-Kanal-Cluster, wurde also nicht durch die Mitochondrien „zur Seite geschoben“ (Geometrie II), so ist das resultierende Calcium-Signal sehr schwach und circa gleich der Zell-Ruhekonzentration von 100 nM. In diesem Fall verhindert die ER-Domäne eine starke Calcium-Aufnahme durch die Mitochondrien. Es bildet sich eine hohe Calcium-Mikrodomäne in unmittelbarer Umgebung der Kanäle aus, die für eine Inhibierung der Kanäle sorgt (siehe Gleichung 6.48). Schaffen es die Mitochondrien hingegen das ER von der IS zu verdrängen und in Richtung der PMCA-Pumpen zu verschieben, wie dies für die Geometrie III der Fall ist, so ist das Absaugen des Calciums durch die PMCA-Pumpen behindert und die Calcium-Aufnahme durch die Mitochondrien begünstigt. Dadurch kann das Calcium besser ins Zellinnere umverteilt / transportiert werden, und die stationäre Calciumkonzentration steigt auf einen Wert von ca. 1,03  $\mu\text{M}$ . Die beiden Geometrien IV und V stellen Simulationen dar, für die ich eine größere Ausdehnung des ER voraussetze und gleichzeitig davon ausgehe, dass die Mitochondrien in der Lage sind, das ER vollständig von der IS zu verdrängen und in Richtung der Akkumulation der PMCA-Pumpen zu verschieben. Dadurch diffundiert nur sehr wenig Calcium in den Bereich der PMCA-Pumpen und das durch den CRAC-Kanal einströmende Calcium kann ungehindert von den Mitochondrien aufgenommen und im Zytosol verteilt werden. Als Konsequenz ergeben sich sehr hohe Calcium-Signale von ca. 1,25  $\mu\text{M}$  bzw. 2,35  $\mu\text{M}$ .

Für die doch sehr künstlichen Zellgeometrien II-V hat sich gezeigt, dass verschiedene räumliche Anordnungen der Zell-Organellen zu erheblichen Änderungen des globalen Calcium-Signals führen können. Vom „schlechtesten“ Fall (Typ II) bis hin zum „optimalen“ Fall (Typ V) steigt das globale Calcium-Signal von ca. 100 nM auf ca. 2,35  $\mu\text{M}$  an, was einer mehr als 20-fachen Verstärkung des Signals entspricht. Auch wenn die

von mir betrachteten Zellgeometrien sehr artifiziell sind, zeigen sie, dass die räumliche Position des Endoplasmatischen Retikulums einen erheblichen Einfluss auf die Calcium-Signale in T-Zellen haben kann. Aus diesem Grund wären für die Zukunft weitere Studien auch mit Hilfe des dreidimensionalen T-Zell Modells wünschenswert, die die ER-Domäne auch bei Modellierung der sogenannten „Thapsigargin-Experimente“ zumindest als räumlichen Komplex mit einbeziehen.

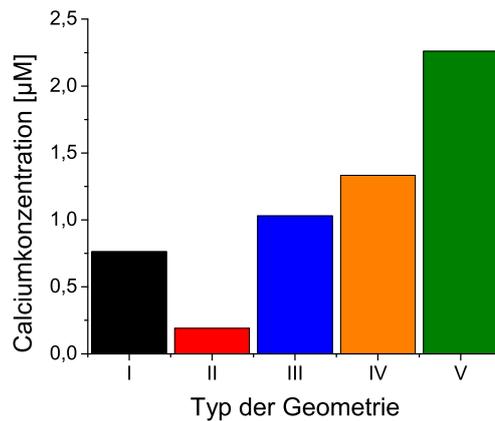
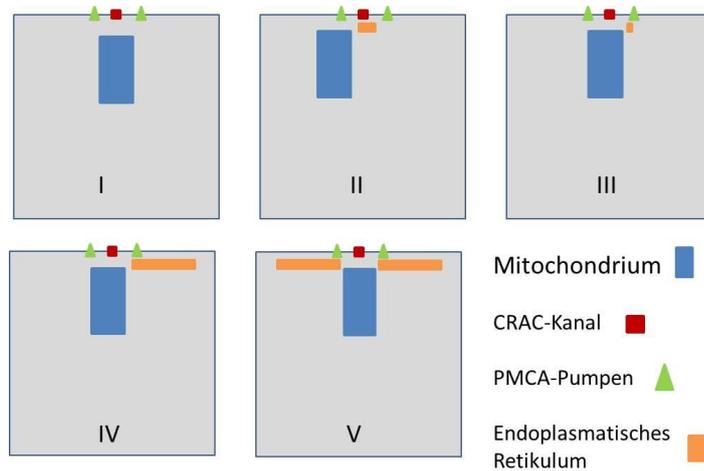


Abbildung 6.21: Ergebnisse des 2D-Modells. Oben sind die fünf verschiedenen Modellgeometrien skizziert, für die mit Hilfe des 2D-Modells die stationären Calcium-Signale berechnet wurden. Einzige Funktion des Endoplasmatische Retikulum besteht darin, ein räumliches Hindernis für die Calcium-Diffusion darzustellen. Unten ist die stationäre globale Calciumkonzentration für die fünf verschiedenen Zellgeometrien abgebildet. Der Abstand des Mitochondriennetzwerkes zur Immunologischen Synapse  $y_{Mito}$  beträgt in allen fünf Fällen  $0,1 \mu\text{m}$ . Lediglich die  $x$ -Position des Mitochondriennetzwerkes ändert sich je nach Geometrie ein wenig, wobei die Änderung nicht größer als  $0,2 \mu\text{m}$  ist.

## 6.6 Zusammenfassung

Das Ziel dieses Kapitels ist es mit Hilfe unterschiedlicher Modelle die Auswirkungen der T-Zell-Polarisierung auf die resultierenden Calcium-Signale und somit auf die Calcium-abhängige T-Zell-Aktivierung zu untersuchen. Die experimentellen Ergebnisse von Quintana et al. [13] deuten darauf hin, dass der Zell-Polarisierung eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von hohen zytosolischen Calciumkonzentrationen zukommt, wie sie für eine erfolgreiche T-Zell-Aktivierung erforderlich sind. Quintana et al. berichten von einer aktiven Bewegung der Mitochondrien hin zur Immunologischen Synapse (Ort des Calcium-Einstroms) sowie einer Akkumulation von PMCA-Pumpen in der Nähe der IS. Ob diese beiden Prozesse jedoch wichtig für die T-Zell-Aktivierung sind oder nur zufällig beobachtet werden, ist soweit noch nicht eindeutig bekannt. Des Weiteren würde man gerne verstehen welchen Einfluss die Struktur des Mitochondrienetzwerkes auf die entstehenden Calcium-Signale hat. Da in Experimenten das Studium von Calcium-Signalen bei aktiven SERCA-Pumpen nahezu unmöglich ist, sollen die theoretischen Studien dieses Kapitels auch dabei helfen, die Auswirkung von aktiven SERCA-Pumpen und der damit verbundenen Wiederauffüllung des Endoplasmatischen Retikulum auf die sich ausbildenden Calcium-Signale zu verstehen.

Im Rahmen dieses Kapitels wurde zunächst in Abschnitt 6.2 mit Hilfe eines einfachen mathematischen 1D-Modells gezeigt, dass der Abstand zwischen Mitochondrien und der IS die lokalen und globalen Calcium-Signale in T-Zellen beeinflusst und kontrolliert. Der physikalische Effekt, der in diesem einfachen Modell die Höhe der stationären Calciumkonzentrationen bestimmt, wird dann in Abschnitt 6.3 anhand eines stochastischen Random Walk Modells veranschaulicht. Dabei steht die Analyse der Mean First Passage Time eines Random Walkers bzw. Calcium-Ions im Vordergrund und es zeigt sich, dass die Aufnahme des einströmenden Calciums durch die Mitochondrien und die Freisetzung des mitochondrialen Calciums in möglichst weiter Entfernung zu den PMCA-Pumpen zu hohen zytosolischen Calciumkonzentrationen führt. Dieser Effekt den ich als „Effekt der Randbedingungen“ bezeichnen kann in vereinfachter Darstellung wie folgt formuliert und verstanden werden: Desto größer die Entfernung zwischen dem Ort der Calcium-Freisetzung durch die Mitochondrien und der Position der PMCA-Pumpen ist, umso länger verweilt das Calcium im Mittel im Zytosol bevor es bei seinem Random Walk durch die PMCA-Pumpen aus der Zelle heraus gepumpt wird.

In Abschnitt 6.4 dieses Kapitels stelle ich ein von mir entwickeltes dreidimensionales Reaktions-Diffusions-Modell vor. Es eignet sich zur Untersuchung der Calcium-Signale, die während der T-Zell-Polarisierung entstehen und beschreibt eine vollständige T-Zelle inklusive Zytosol und Zellmembran. Auch dieses 3D-Modell, bei dem eine realistische Anordnung der Zellorganellen sowie Calcium-Kanäle und -Pumpen angenommen ist, bestätigt die Resultate der eindimensionalen Modelle: Die Position der Mitochondrien relativ zur IS kontrolliert die lokalen und globalen Calcium-Signale in T-Zellen. Zusätzlich dazu sagt das 3D-Modell voraus, dass auch die Umverteilung und Akkumulation der PMCA-Pumpen in der Nähe der IS essentiell für eine erfolgreiche T-Zell-Aktivierung sind. Die Gründe hierfür sind zum einen der bereits erläuterte Effekt der Randbedin-

gungen und zum anderen eine Art Wettbewerb zwischen PMCA-Pumpen und Mitochondrien um das ins Zytosol einströmende Calcium. Je näher sich die Mitochondrien an der IS befinden, umso mehr Calcium saugen sie dort auf, verteilen es in weiter entfernte Regionen des Zytosols und reduzieren gleichzeitig die den Calcium-Einstrom inhibierende Calcium-Mikrodomäne in direkter Umgebung der Immunologischen Synapse. Mittels des 3D-Modells werden zwei verschiedene Szenarien betrachtet: Das erste Szenario entspricht den sogenannten Thapsigargin-Experimenten, bei denen die SERCA-Pumpen und daraus resultierend eine Wiederauffüllung des Endoplasmatischen Retikulums blockiert sind. Das zweite Szenario ist an die physiologische Situation in Zellen angelehnt und modelliert aktive SERCA-Pumpen sowie eine Calcium-Freisetzung durch  $IP_3$ -Kanäle des ER. Die Resultate des 3D-Modells unterscheiden sich für die beiden Szenarien qualitativ nicht, falls man von einer dauerhaften  $IP_3$ -Produktion ausgeht. Die Ergebnisse ändern sich jedoch drastisch, sobald man einen transienten  $IP_3$ -Stimulus annimmt. In diesem Fall erlaubt das Modell die interessante Vorhersage, dass auch in Abwesenheit eines  $IP_3$ -Stimulus starke globale Calcium-Signale aufrechterhalten werden können, falls zwei Konditionen gleichzeitig erfüllt sind. Zum einen müssen sich die Mitochondrien näher als ca. 300 nm an der IS befinden und zum anderen müssen die SERCA-Pumpen des ER in der Nähe der IS akkumuliert sein. An dieser Stelle möchte ich noch darauf hinweisen, dass alle in den Abschnitten 6.2-6.4 gezeigten Resultate erstaunlich robust gegenüber Änderung der Systemparameter sind.

Der Einfluss der Struktur des Mitochondriennetzwerkes auf die entstehenden Calcium-Signale wird in Abschnitt 6.5 anhand eines zweidimensionalen T-Zell-Modells sowie des 3D-Modells aus Abschnitt 6.4 untersucht. Die Resultate dieses 2D-Modells lassen die Schlussfolgerung zu, dass neben der Mitochondrienposition relativ zur IS sowie der Anhäufung von PMCA-Pumpen in der Nähe der IS auch die Struktur des Mitochondriennetzwerkes einen großen Einfluss auf die entstehenden Calcium-Signale hat. Durch Berechnung der stationären Calciumkonzentration für verschiedene Netzwerkstrukturen hat sich herausgestellt, dass eine Fusion der Mitochondrien zu einem einzigen Cluster die höchsten Calcium-Signale hervorruft. Des Weiteren zeigen erste Untersuchungen mit artifiziellen Zellgeometrien, dass auch die räumliche Anordnung des ER Auswirkung auf die entstehenden Calcium-Signale hat. Speziell die Verdrängung des ER weg von der IS hin zu den PMCA-Pumpen verstärkt die resultierenden Calcium-Signale.

Insgesamt liefern die Studien dieses Kapitels eindeutige Hinweise darauf, dass die T-Zell-Polarisierung essentiell für die erfolgreiche T-Zell-Aktivierung ist. Außerdem zeigen die durchgeführten Modellierungen, dass die räumliche Anordnung der unterschiedlichen Zellorganellen sowie Calcium-Kanäle und Calcium-Pumpen einen enormen Einfluss auf die stationären Calcium-Signale hat. Deshalb sollte der räumliche Aspekt in theoretischen Studien von Calcium-Signalen nicht leichtfertig vernachlässigt werden.

# Kapitel 7

## Zusammenfassung und Ausblick

In seiner Funktion als intrazellulärer Signalgeber steuert und reguliert Calcium zahlreiche Prozesse, die lebenswichtig für viele Zellen und Organismen sind. Im Rahmen dieser Dissertation wurden mit Hilfe von verschiedenen stochastischen und deterministischen Modellen die Entstehung und Auswirkung von Calcium-Signalen in Zellen untersucht. Hauptsächlich zwei Modell-Systeme dienen als Vorlage für die theoretischen Studien: die durch Calcium aktivierten Membrantranslokationen des Enzyms Proteinkinase C (PKC) und die für die menschliche Immunabwehr essentielle Calcium abhängige Aktivierung von T-Lymphozyten.

Die Universalität der Calcium-Signalgebung beruht auf der komplexen zeitlichen und räumlichen Kodierung der Calcium-Signale, die als lokale Ereignisse, Oszillationen oder auch intra- und interzelluläre Wellen auftreten können. Die Dekodierung dieser Signale wird z.B von dem Protein PKC übernommen, das durch Binden zweier Calcium-Ionen aktiviert wird und als Konsequenz zur Zellmembran transloziert, um dort in seinen aktivierten Zustand überzugehen. Eines der Ziele dieser Dissertation war es, das Vorkommen von lang andauernden Membransignalen der PKC-Translokationen zu erklären. Um diese lokalen Translokations Ereignisse (LTEs) zu untersuchen, wird ein dreidimensionaler Gillespie-Monte-Carlo Algorithmus verwendet. Der von mir entwickelte Algorithmus zeichnet sich dadurch aus, dass er die Vorteile der in der Literatur existierenden Methoden ausnutzt (NRM, NSM, siehe Kapitel 3) und darüber hinaus die Möglichkeit bietet, ein dreidimensionales Simulationsvolumen (Zytosol) mit einer räumlich hoch aufgelösten 2D-Simulationsfläche (Zellmembran) zu verknüpfen. Dadurch ist der Algorithmus in der Lage, die entstehenden Membransignale in Abhängigkeit von Nächsten-Nachbar Wechselwirkungen zu untersuchen und gleichzeitig eine Clusteranalyse der Signale durchzuführen. Das entsprechende Reaktions-Diffusions Modell benennt eine kooperative Wechselwirkung der PKC-Proteine als möglichen Mechanismus, der das

gleichzeitige Auftreten einer Population von kurz andauernden LTEs und einer Population von lang andauernden LTEs erklären kann. PKC-Moleküle binden über die sogenannten C1- und C2-Domänen an die Plasmamembran. Der kooperative Effekt sorgt dafür, dass via C2-Domäne gebundene PKC-Membrankomplexe eine Wechselwirkung aufeinander ausüben und sich PKC-Cluster ausbilden. Die Lebensdauer dieser Cluster übersteigt die Dauer der zugrunde liegenden Calcium-Signale um mehr als das Zehnfache, da sich laut Modellannahme die Membranablöserate für PKC-Moleküle innerhalb dieser Cluster verringert. Um jedoch sämtliche experimentell beobachteten Charakteristika der beiden LTE-Populationen durch das Modell richtig wiederzugeben, wird neben der kooperativen Bindung noch ein weiterer Mechanismus benötigt. Es handelt sich dabei um die Umsetzung eines stochastischen Prozesses, der dafür sorgt, dass sich Calcium-Ionen zufällig von der C2-Domäne eines membrangebundenen PKC-Moleküls ablösen. Dadurch wird die Ladung des PKC verändert und die elektrostatische Abstoßung zwischen Membran und PKC vergrößert. Dies zieht eine Konformationsänderung des PKC-Moleküls nach sich. Befindet sich das Calcium-Ionen verlierende PKC-Molekül in einem Cluster, so übt es mechanischen Stress auf die Nachbar-PKC aus. Lawinenartig breitet sich dieser mechanische Stress auf weitere benachbarte PKC-Komplexe aus und lässt diese in einen sehr instabilen Zustand mit kurzen Membranlebenszeiten übergehen. Eine gleichzeitige Umsetzung von kooperativer Wechselwirkung und eines „Lawineneffekts“ gibt alle im Experiment [22] gefundenen LTE-Charakteristika richtig wieder: die Plateauphase des Membransignals für Zeiten, nach denen die elementaren Calcium-Signale bereits abgeklungen sind, die begrenzte räumliche Ausdehnung der beiden LTE-Populationen sowie die Verteilung der Signaldauer als Funktion der Signalstärke. Um die Modellvorhersage einer kooperativen Wechselwirkung der PKC-Proteine innerhalb der Membran zu bestätigen, wurden von mir in Kooperation mit Mike Bonny am Lehrstuhl von Prof. Peter Lipp in Homburg FRET-Messungen durchgeführt. Diese Fluoreszenzmikroskopie-Experimente liefern zwar Hinweise darauf, dass die Hypothese einer Wechselwirkung richtig ist, sind aber statistisch nicht aussagekräftig genug, um sie als Beweis für eine solche Wechselwirkung verwenden zu können. Neuere und aktuelle FRET-Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Lipp an der Universität des Saarlandes (noch nicht veröffentlicht, in Vorbereitung) deuten darauf hin, dass sich die von dem Modell gemachte Vorhersage einer kooperativen Wechselwirkung bestätigt. Es scheint jedoch so, dass dieser kooperative Effekt eine universelle Eigenschaft der C2-Domäne darstellt und nicht nur die PKC-Moleküle betrifft. Dieses Ergebnis wiederum würde zum besseren Verständnis vieler anderer durch Signalproteine an der Membran gesteuerter Prozesse beitragen, da zahlreiche weitere Signalproteine ebenfalls eine C2-Domäne besitzen.

Als weiterer Forschungsbereich, in dem die Calcium-Signalgebung eine wichtige Rolle spielt, wäre die menschliche Immunabwehr zu erwähnen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Calcium abhängige Aktivierung von T-Zellen untersucht, die notwendig ist, um schädliche Zellen zu zerstören. Wiederum ist die genaue räumliche und zeitliche Gestalt der Calcium-Signale entscheidend, in diesem Fall für die Zellantwort. Abhängig von den zugrunde liegenden Calcium-Signalen werden im Bereich der Immunabwehr solch unterschiedliche Vorgänge initialisiert wie Immuntoleranz, Zellaktivierung

oder programmierter Zelltod (Apoptosis). Für die T-Zell-Proliferation und -Aktivierung wird ein intensives und robustes Calcium-Signal benötigt, das bis zu Stunden anhält. Die Existenz eines solchen Signals erfordert die Minderung der Calcium abhängigen Deaktivierung der Calcium-Hauptstromquelle in T-Zellen: dem Calcium release-activated (CRAC) Kanal. Aus diesem Grund wurde in der Dissertation mit Hilfe verschiedener Modelle der Einfluss der T-Zell-Polarisierung auf die entstehenden Calcium-Signale studiert. Die Analyse des Zusammenspiels zwischen der räumlichen Anordnung der unterschiedlichen Zell-Organellen sowie der Calcium-Kanäle / Pumpen und den Calcium-Signalen steht dabei im Vordergrund der Arbeit. Das Verständnis dieser komplexen Zusammenhänge wird helfen, die Vorgänge während der physiologischen T-Zell-Aktivierung besser zu verstehen.

Zunächst wurde anhand eines einfachen mathematischen 1D-Modells gezeigt, dass die Bewegung der Mitochondrien hin zur Immunologischen Synapse (IS) die lokalen und globalen Calcium-Signale in T-Zellen beeinflusst und kontrolliert. Die Erklärung des physikalischen Effekts, der in diesem deterministischen 1D-Modell die Höhe der stationären Calciumkonzentrationen bestimmt, erfolgte in einem späteren Abschnitt mit einem äquivalenten Random Walk Modell. Die Analyse des stochastischen Modells ergab, dass die Aufnahme des einströmenden Calciums durch die Mitochondrien und die Freisetzung des mitochondrialen Calciums in möglichst weiter Entfernung zu den PMCA-Pumpen zu hohen zytosolischen Calciumkonzentrationen führt. Dieser Mechanismus wurde von mir als „Effekt der Randbedingungen“ bezeichnet und kann in vereinfachter Formulierung wie folgt verstanden werden: Je größer die Entfernung zwischen dem Ort der Calcium-Freisetzung durch die Mitochondrien und der Position der PMCA-Pumpen ist, desto länger verweilt das Calcium im Mittel im Zytosol, bevor es durch die PMCA-Pumpen aus der Zelle heraus gepumpt wird.

Um ein genaueres Studium der Calcium abhängigen T-Zell-Aktivierung durchführen zu können, wurde von mir ein dreidimensionales Reaktions-Diffusions Modell entwickelt. Dieses physiologisch realistische Modell beschreibt eine vollständige T-Zelle inklusive Zytosol, Mitochondrien, mobilen Calcium-Puffern, Zellkern, Endoplasmatischen Retikulum (ER), Calcium-Kanälen / Pumpen und der Zellmembran. Das Modell ist meines Wissens das erste, das dabei hilft zu verstehen, wie sich die Distanz zwischen verschiedenen Zell-Organellen und die relative Anordnung verschiedener Calcium-Quellen und Senken auf die Calcium-Signale auswirken. Interessanterweise bestätigt das 3D-Modell unter Annahme einer physiologischen Zellstruktur und geblockten SERCA-Pumpen das Hauptresultat des einfachen eindimensionalen Modells: die Position der Mitochondrien relativ zur IS kontrolliert die lokalen und globalen Calcium-Signale in T-Zellen. Auffällig ist eine sehr starke Abhängigkeit der globalen / zytosolischen Calciumkonzentrationen vom Abstand der Mitochondrien zur IS. Vergrößert man beispielsweise den Abstand der Mitochondrien zur IS von 100 nm auf 500 nm, so fällt die stationäre zytosolische Calciumkonzentrationen von 900 nM auf einen Wert von weniger als 300 nM ab. Da die T-Zell-Aktivierung unterhalb von 300 nM nicht mehr optimal ablaufen kann, lässt das Modell die Schlussfolgerung zu, dass die Mitochondrienbewegung hin zur IS von immenser Bedeutung für die erfolgreiche Immunabwehr ist. Daneben trifft das Modell auch die Vorhersage, dass eine inhomogene PMCA-Pumpenverteilung innerhalb der Zellmembran not-

wendig ist, um hohe zytosolische Calciumkonzentrationen aufrechterhalten zu können. Bemerkenswerterweise werden die stärksten Calcium-Signale bei einer Anhäufung von PMCA-Pumpen in der Umgebung der IS gemessen, genau wie dies kürzlich experimentell beobachtet wurde [13]. Grund hierfür ist eine Art Wettbewerb zwischen PMCA-Pumpen und Mitochondrien um das ins Zytosol einströmende Calcium. Je näher sich die Mitochondrien an der IS und somit am Ort der PMCA-Akkumulation befinden, desto mehr Calcium nehmen sie dort auf, verteilen es in weiter entfernte Regionen des Zytosols und reduzieren gleichzeitig die den CRAC-Kanal inhibierende Calcium-Mikrodomäne. Dieser Effekt des Wettbewerbs addiert sich mit dem bereits erläuterten und auch in 3D vorhandenen Effekt der Randbedingungen. Analog zum 1D-Modell wird auch im dreidimensionalen Szenario für eine PMCA-Pumpenakkumulation an dem der IS gegenüber liegenden Zellpol, eine umso höhere Calciumkonzentrationen gemessen, je näher sich die Mitochondrien an der IS befinden. An dieser Stelle möchte ich hervorheben, dass die Modellergebnisse erstaunlich robust gegenüber Änderungen der Systemparameter sind, und dass das Modell zeigt, dass kein direkter Inhibierungsmechanismus des CRAC-Kanals notwendig ist, um ein hohes Calcium-Signal aufrecht zu erhalten. Vielmehr ist die Reduzierung der Calcium-Mikrodomäne eine Konsequenz der Mitochondrienbewegung zur IS und der daraus resultierenden mitochondrialen Calcium-Aufnahme und keineswegs eine Voraussetzung dafür. Die bisherigen Ergebnisse ermutigen dazu, experimentell zu überprüfen, ob die PMCA-Pumpenakkumulation ein essentieller Prozess für die T-Zell-Aktivierung ist oder nicht. Allerdings ist die Entwicklung eines solchen experimentellen Setups nur schwer zu realisieren, da man dazu die PMCA-Pumpen immobilisieren müsste. Anschließend wäre zu überprüfen, ob die immobilen PMCA-Pumpen ihre Funktion weiterhin korrekt ausüben, und ob man dadurch nicht gleichzeitig weitere für die T-Zell-Aktivierung notwendige Proteine innerhalb der Zellmembran in ihrer Bewegung hemmt. Fatal wäre z.B. die Einschränkung einer Diffusion von Orai, was einen Einbruch des CRAC-Kanal-Stroms zur Folge hätte und somit eine T-Zell-Aktivierung unmöglich machen würde.

Mit Hilfe des 3D-Reaktions-Diffusions Modells wurde in dieser Arbeit auch ein zweites Szenario untersucht, das an die physiologische Situation in Zellen angelehnt ist und aktive SERCA-Pumpen sowie eine Calcium-Freisetzung durch  $IP_3$ -Kanäle des ER modelliert. Die Resultate für aktive SERCA-Pumpen unterscheiden sich qualitativ nicht von den zuvor diskutierten Resultaten (geblockte SERCAs), falls man von einer dauerhaften  $IP_3$ -Produktion ausgeht. Die Ergebnisse ändern sich jedoch drastisch, sobald man einen transienten  $IP_3$ -Stimulus annimmt. In diesem Fall hilft das Modell dabei, eine bisher ungelöste Frage besser zu verstehen: wie schaffen es T-Zellen, ein starkes Calcium-Signal über mehrere Stunden aufrecht zu erhalten, wenn teilweise davon berichtet wird, dass der  $IP_3$ -Stimulus nur ca. 10 Minuten anhält und danach eine Wiederauffüllung des ER einsetzen sollte, die die Inaktivierung des CRAC-Kanals zur Folge hätte? Das Modell erlaubt hier die interessante Vorhersage, dass auch in Abwesenheit eines  $IP_3$ -Stimulus starke globale Calcium-Signale aufrechterhalten werden können, falls zwei Konditionen gleichzeitig erfüllt sind. Zum einen müssen sich die Mitochondrien näher als ca. 300 nm an der IS befinden und zum anderen müssen die SERCA-Pumpen des ER in der Nähe

der IS akkumuliert sein. Für *Paramecium*<sup>24</sup> Zellen, wurde schon von einer solchen Clustering bzw. Oligomerisation der SERCA-Pumpen berichtet [164]. Des Weiteren gibt es auch Hinweise darauf, dass es zu Anhäufungen der SERCA-Pumpen in der Nähe von Mitochondrien kommt [165, 166], was mit der Modellannahme einer SERCA-Clustering in der Nähe der IS korrespondiert. In diesem Fall gewinnen die Mitochondrien nicht nur den Wettbewerb gegen die PMCA-Pumpen und verhindern einen Transport der Calcium-Ionen in den extrazellulären Raum, sondern sie gewinnen auch den Wettbewerb gegen die SERCA-Pumpen und unterbinden dadurch die Wiederauffüllung des ER. Als Konsequenz bleibt der speichergesteuerte CRAC-Kanal aktiv und sorgt für einen konstanten Calcium-Einstrom in die Zelle und dadurch für robuste Calcium-Signale. Auch hier wäre eine experimentelle Überprüfung der Modellvorhersage wünschenswert. Allerdings stößt man bei der Umsetzung an die Grenzen der möglichen optischen Auflösung, da das Modell einen Abstand der Mitochondrien zur IS von weniger als 300 nm als entscheidenden Parameter benennt.

Neben der Untersuchung der T-Zell-Polarisierung habe ich in meiner Arbeit auch den Einfluss der Struktur des Mitochondriennetzwerkes auf die resultierenden Calcium-Signale untersucht. Dazu habe ich eine zweidimensionale Version des T-Zell-Modells entwickelt und die stationären Calcium-Signale für verschieden stark vernetzte Mitochondrienstrukturen analysiert. Die Resultate dieses 2D-Modells lassen die Schlussfolgerung zu, dass auch die Struktur des Mitochondriennetzwerkes einen großen Einfluss auf die entstehenden Calcium-Signale ausübt. Eine Veränderung der Netzwerkstruktur hin zu robusteren Formen, z.B. durch eine Fusion der Mitochondrien, kann zu einer Erhöhung des Calcium-Signals um bis zu 50% führen (bei sonst gleichen Systemparametern). Insgesamt legen diese Untersuchungen nahe, die selbst gesteuerte Mitochondrienbewegung sowie die Möglichkeit der Fusion und Fission von Mitochondrien in die zukünftige 3D-Modellierung einzubeziehen.

Zu guter Letzt wurde im Rahmen dieser Dissertation auch ein stochastisches 2D-Modell zur Bildung der Orai1/STIM1-Kanäle (CRAC-Kanäle) studiert. Dieses Modell lässt zwei mögliche Mechanismen erkennen, um die von Hoover und Lewis [25] gemessenen CRAC-Ströme zu erklären: i) die Annahme einer negativen Kooperativität des STIM1-Dimer Binde- und Ablösemechanismus oder ii) die Möglichkeit zum „Hopping“, ein Prozess bei dem bereits an Orai1-Tetramer gebundene STIM1-Dimere per „Hopping“ auf frei diffundierende Orai1-Tetramere übergehen können. Beide Mechanismen führen dazu, dass bei Orai1-Überexpression der sehr schwach zum CRAC-Strom beitragende Kanalzustand OS<sub>1</sub> dominiert und so die Nullströme für Orai1-Überexpression erklärt werden können. In bestimmten Parameterbereichen sagt das Modell Oszillationen in den CRAC-Strömen voraus, und dadurch bedingt, auch Oszillationen in der zytosolischen Calciumkonzentration. Bisher werden Calcium-Oszillationen meist durch speichergesteuerte Phänomene oder durch inhibierende Mechanismen der Kanäle erklärt. Hier konnte gezeigt werden, dass alleine die Eigenschaften der STIM1 / Orai1 - Kanalbildung ausreichen, um Oszillationen in der Calciumkonzentration zu beobachten und dass dazu keine weiteren Feedback-Mechanismen benötigt werden. Des Weiteren habe ich überprüft, welche Aus-

---

<sup>24</sup>Pantoffeltierchen

wirkungen das Vorkommen von Orai1 als Hexamer [136] auf die Modellergebnisse hat. Es hat sich herausgestellt, dass die wesentlichen Aussagen des Modells bestehen bleiben, wenn man in der Zellmembran anstatt diffundierender Orai1-Tetramere die Diffusion von Orai1-Hexameren voraussetzt. Mit Hilfe des Modells wurde auch das Verhalten der von Kilch et al. [26] als DQ bezeichneten STIM-Mutante untersucht. Als Ergebnis konnten die experimentell beobachteten DQ-Mutanten-Ströme qualitativ richtig reproduziert werden und eine im Gegensatz zum Wildtypen verstärkte STIM1-Oligomerisation als dafür verantwortlicher Prozess benannt werden.

In dieser Dissertation wurden verschiedene Modelle präsentiert und die jeweiligen Ergebnisse ausführlich diskutiert. Durch Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit und der entsprechenden Resultate [26, 31] wurden die aktuellen Modelle etabliert und der Grundstein für weitere Untersuchungen gelegt. Ein Ziel der zukünftigen Forschung sollte die Kombination des deterministischen 3D-T-Zell Modells und des stochastischen 2D-Modells zur CRAC-Kanal-Formation sein. Somit würde ein noch realistischeres Modell zur Verfügung stehen, mit dessen Hilfe auch die Korrelation zwischen der räumlichen Anordnung der verschiedenen Zell-Organellen und der Bildung der CRAC-Kanäle studiert werden könnte. Zusätzlich dazu wäre eine realistischere Modellierung der Mitochondrien wünschenswert. Dadurch könnte untersucht werden, ob die selbst gesteuerte Mitochondrienbewegung, die Fusion / Fission der Mitochondrien oder deren Calcium-Umverteilung weitere neue Eigenschaften der T-Zell-Aktivierung und Polarisierung zu Tage fördern. Zukünftige Studien der Modelle sollten auch berücksichtigen, dass in den meisten Zellen neben Orai1 auch Orai3 an der Formation des CRAC-Kanals beteiligt sein kann. Es wird vermutet, dass CRAC-Kanäle, die aus mindestens einem Orai3-Protein aufgebaut sind, eine weitaus schwächere Inhibierung unter oxidativem Stress erfahren. Somit könnte unter Berücksichtigung von Orai3-Proteinen die physiologische Rolle des CRAC-Kanals in beispielsweise entzündetem Gewebe analysiert werden.

## Literaturverzeichnis

- [1] Michael Berridge, Peter Lipp, and Martin Bootman. Calcium signalling. *Current biology*, 9(5):R157–R159, 1999.
- [2] Michael J. Berridge, Martin D. Bootman, and Roderick H. Llewelyn. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7):517–529, 2003.
- [3] Michael J. Berridge, Peter Lipp, and Martin D Bootman. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1):11–21, 2000.
- [4] JP Ozil and K Swann. Stimulation of repetitive calcium transients in mouse eggs. *The Journal of physiology*, 483(Pt 2):331–346, 1995.
- [5] Michael J Berridge. Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays*, 17(6):491–500, 1995.
- [6] Michael J Berridge. Neuronal calcium signaling. *Neuron*, 21(1):13–26, 1998.
- [7] MS Perin, VA Fried, GA Mignery, R Jahn, and TC Südhof. Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase c. *Nature*, 345(6272):260, 1990.
- [8] J Kevin Foskett, Carl White, King-Ho Cheung, and Don-On Daniel Mak. Inositol trisphosphate receptor  $\text{Ca}^{2+}$  release channels. *Physiological reviews*, 87(2):593–658, 2007.
- [9] W.W. Shen, M. Frieden, and N. Demaurex. Local cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations are required for stromal interaction molecule 1 (STIM1) de-oligomerization and termination of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Journal of Biological Chemistry*, 286(42):36448–36459, 2011.
- [10] F.M. Mullins, C.Y. Park, R.E. Dolmetsch, and R.S. Lewis. STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation of CRAC channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36):15495–15500, 2009.

- [11] I. Derler, M. Fahrner, M. Muik, B. Lackner, R. Schindl, K. Groschner, and C. Romanin. A  $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  (CRAC) modulatory domain (CMD) within STIM1 mediates fast  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation of ORAI1 channels. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37):24933–24938, 2009.
- [12] M. Falcke. Reading the patterns in living cells — the physics of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *Advances in physics*, 53(3):255–440, 2004.
- [13] Ariel Quintana, Mathias Pasche, Christian Junker, Dalia Al-Ansary, Heiko Rieger, Carsten Kummerow, Lucia Nuñez, Carlos Villalobos, Paul Meraner, Ute Becherer, et al. Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation. *The EMBO journal*, 30(19):3895–3912, 2011.
- [14] M. Prakriya, C.R. Solaro, and C.J. Lingle.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevations detected by BK channels during  $\text{Ca}^{2+}$  influx and muscarine-mediated release of  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores in rat chromaffin cells. *The Journal of neuroscience*, 16(14):4344–4359, 1996.
- [15] W.M. Roberts. Spatial calcium buffering in saccular hair cells. *Letters to Nature*, 363:74–76, 1993.
- [16] MB Cannell, H. Cheng, and WJ Lederer. The control of calcium release in heart muscle. *Science*, 268(5213):1045–1049, 1995.
- [17] R.E. Dolmetsch, U. Pajvani, K. Fife, J.M. Spotts, and M.E. Greenberg. Signaling to the nucleus by an l-type calcium channel-calmodulin complex through the map kinase pathway. *Science*, 294(5541):333–339, 2001.
- [18] Y Yao, J Choi, and I Parker. Quantal puffs of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  evoked by inositol trisphosphate in xenopus oocytes. *The Journal of Physiology*, 482(Pt 3):533–553, 1995.
- [19] Martin D Bootman and Michael J Berridge. The elemental principles of calcium signaling. *Cell*, 83(5):675–678, 1995.
- [20] Peter Lipp and Ernst Niggli. A hierarchical concept of cellular and subcellular  $\text{Ca}^{2+}$ -signalling. *Progress in biophysics and molecular biology*, 65(3):265–296, 1996.
- [21] Peter Lipp, David Thomas, Michael J Berridge, and Martin D Bootman. Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *The EMBO journal*, 16(23):7166–7173, 1997.
- [22] G. Reither, M. Schaefer, and P. Lipp. PKC $\alpha$ : a versatile key for decoding the cellular calcium toolkit. *The Journal of cell biology*, 174(4):521–533, 2006.
- [23] Carsten Kummerow, Christian Junker, Karsten Kruse, Heiko Rieger, Ariel Quintana, and Markus Hoth. The immunological synapse controls local and global calcium signals in T lymphocytes. *Immunological reviews*, 231(1):132–147, 2009.

- [24] Stefan Feske, Yousang Gwack, Murali Prakriya, Sonal Srikanth, Sven-Holger Puppel, Bogdan Tanasa, Patrick G Hogan, Richard S Lewis, Mark Daly, and Anjana Rao. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090):179–185, 2006.
- [25] P.J. Hoover and R.S. Lewis. Stoichiometric requirements for trapping and gating of  $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  (CRAC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(32):13299–13304, 2011.
- [26] T. Kilch, D. Alansary, M. Peglow, K. Doerr, G. Rychkov, H. Rieger, C. Peinelt, and B.A. Niemeyer. Mutations of the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing stromal interaction molecule STIM1 regulate  $\text{Ca}^{2+}$  influx by altered oligomerization of STIM1 and by destabilization of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel Orai1. *Journal of Biological Chemistry*, 288:1653–1664, 2013.
- [27] Christine Schmeitz, Esteban Abelardo Hernandez-Vargas, Ralf Fliegert, Andreas H Guse, and Michael Meyer-Hermann. A mathematical model of t lymphocyte calcium dynamics derived from single transmembrane protein properties. *Frontiers in immunology*, 4, 2013.
- [28] M. Marhl, S. Schuster, and M. Brumen. Mitochondria as an important factor in the maintenance of constant amplitudes of cytosolic calcium oscillations. *Biophysical chemistry*, 71(2):125–132, 1998.
- [29] V. Grubelnik, A. Zahle Larsen, U. Kummer, L. Folke Olsen, and M. Marhl. Mitochondria regulate the amplitude of simple and complex calcium oscillations. *Biophysical chemistry*, 94(1):59–74, 2001.
- [30] S. Schuster, M. Marhl, and T. Höfer. Modelling of simple and complex calcium oscillations. *European Journal of Biochemistry*, 269(5):1333–1355, 2002.
- [31] Martin Peglow, Barbara Niemeyer, Markus Hoth, and Heiko Rieger. Interplay of channels, pumps and organelle location in calcium microdomain formation. *New journal of physics*, 15(5):055022, 2013.
- [32] Delphine Bichet, Friederike A Haass, and Lily Yeh Jan. Merging functional studies with structures of inward-rectifier  $\text{K}^+$  channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(12):957–967, 2003.
- [33] N Maeda, T Kawasaki, S Nakade, N Yokota, T Taguchi, M Kasai, and K Mikoshiba. Structural and functional characterization of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor channel from mouse cerebellum. *Journal of Biological Chemistry*, 266(2):1109–1116, 1991.
- [34] Michelle Ferreri-Jacobia, Don-On Daniel Mak, and J Kevin Foskett. Translational mobility of the type 3 inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor  $\text{Ca}^{2+}$  release channel in

- endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5):3824–3831, 2005.
- [35] CA Ross, J Meldolesi, TA Milner, T Satoh, S Supattapone, and SH Snyder. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar purkinje neurons. *Nature*, 339(6224):468–470, 1989.
- [36] David Thomas, Peter Lipp, Michael J Berridge, and Martin D Bootman. Hormone-evoked elementary  $\text{Ca}^{2+}$  signals are not stereotypic, but reflect activation of different size channel clusters and variable recruitment of channels within a cluster. *Journal of Biological Chemistry*, 273(42):27130–27136, 1998.
- [37] Jonathan S Marchant and Ian Parker. Role of elementary  $\text{Ca}^{2+}$  puffs in generating repetitive  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. *The EMBO Journal*, 20(1):65–76, 2001.
- [38] Darren Boehning, Suresh K Joseph, Don-On Daniel Mak, and J Kevin Foskett. Single-channel recordings of recombinant inositol trisphosphate receptors in mammalian nuclear envelope. *Biophysical journal*, 81(1):117–124, 2001.
- [39] Lucian Ionescu, King-Ho Cheung, Horia Vais, Don-On Daniel Mak, Carl White, and J Kevin Foskett. Graded recruitment and inactivation of single  $\text{Insp3}$  receptor  $\text{Ca}^{2+}$ -release channels: implications for quartal  $\text{Ca}^{2+}$  release. *The Journal of physiology*, 573(3):645–662, 2006.
- [40] Michael Schaefer, Nadine Albrecht, Thomas Hofmann, Thomas Gudermann, and Günter Schultz. Diffusion-limited translocation mechanism of protein kinase C isotypes. *The FASEB Journal*, 15(9):1634–1636, 2001.
- [41] G Solovey, D Fraiman, B Pando, and S Ponce Dawson. Simplified model of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in the presence of one or several clusters of  $\text{Ca}^{2+}$ -release channels. *Physical Review E*, 78(4):041915, 2008.
- [42] J. Kusters, MM Dernison, WPM Van Meerwijk, DL Ypey, APR Theuvenet, and C. Gielen. Stabilizing role of calcium store-dependent plasma membrane calcium channels in action-potential firing and intracellular calcium oscillations. *Biophysical journal*, 89(6):3741, 2005.
- [43] Gary W De Young and Joel Keizer. A single-pool inositol 1, 4, 5-trisphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(20):9895–9899, 1992.
- [44] S Zeller, S Rüdiger, H Engel, J Sneyd, G Warnecke, I Parker, and M Falcke. Modeling of the modulation by buffers of  $\text{Ca}^{2+}$  release through clusters of  $\text{ip}_3$  receptors. *Biophysical journal*, 97(4):992–1002, 2009.
- [45] J Sneyd, K Tsaneva-Atanasova, JIE Bruce, SV Straub, DR Giovannucci, and DI Yule. A model of calcium waves in pancreatic and parotid acinar cells. *Biophysical journal*, 85(3):1392–1405, 2003.

- [46] R. Thul and M. Falcke. Release currents of IP3 receptor channel clusters and concentration profiles. *Biophysical journal*, 86(5):2660–2673, 2004.
- [47] Erin R Higgins, Heiko Schmidle, and Martin Falcke. Waiting time distributions for clusters of ip3 receptors. *Journal of Theoretical Biology*, 259(2):338–349, 2009.
- [48] S Rüdiger, JW Shuai, and IM Sokolov. Law of mass action, detailed balance, and the modeling of calcium puffs. *Physical review letters*, 105(4):048103, 2010.
- [49] George D Dickinson, Divya Swaminathan, and Ian Parker. The probability of triggering calcium puffs is linearly related to the number of inositol trisphosphate receptors in a cluster. *Biophysical Journal*, 102(8):1826–1836, 2012.
- [50] Carine Rosse, Mark Linch, Stéphanie Kermorgant, Angus JM Cameron, Katrina Boeckeler, and Peter J Parker. PKC and the control of localized signal dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2):103–112, 2010.
- [51] A.C. Newton, J.E. Johnson, et al. Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochimica et biophysica acta*, 1376(2):155, 1998.
- [52] Susy C Kohout, Senena Corbalán-García, Alejandro Torrecillas, Juan C Gómez-Fernández, and Joseph J Falke. C2 domains of protein kinase C isoforms  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ : Activation parameters and calcium stoichiometries of the membrane-bound state. *Biochemistry*, 41(38):11411–11424, 2002.
- [53] Eric A. Nalefski and Alexandra C. Newton. Membrane binding kinetics of protein kinase C betaII mediated by the C2 domain. *Biochemistry*, 40(44):13216–13229, 2001.
- [54] Joanne E Johnson, Jennifer Giorgione, and Alexandra C Newton. The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidylserine conferred by the C1 domain. *Biochemistry*, 39(37):11360–11369, 2000.
- [55] Stephen R Bolsover, Juan C Gomez-Fernandez, and Senena Corbalan-Garcia. Role of the  $\text{Ca}^{2+}$  /phosphatidylserine binding region of the C2 domain in the translocation of protein kinase C $\alpha$  to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 278(12):10282–10290, 2003.
- [56] Kiyotaka Nishikawa, Alex Toker, Franz-Josef Johannes, Zhou Songyang, and Lewis C Cantley. Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(2):952–960, 1997.
- [57] Abraham Kupfer, Hannah Kupfer, et al. Imaging immune cell interactions and functions: SMACs and the immunological synapse. In *Seminars in immunology*, volume 15, pages 295–300. Academic Press, 2003.

- [58] Michael L Dustin. T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunological reviews*, 221(1):77–89, 2008.
- [59] The Web site of the National Cancer Institute (USA). (<http://www.cancer.gov> and <http://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=1944>).
- [60] O. Schwartz, M-C. Prévost, and J.M. Panaud. *Institut Pasteur Paris*.
- [61] Tony J Collins, Michael J Berridge, Peter Lipp, and Martin D Bootman. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *The EMBO journal*, 21(7):1616–1627, 2002.
- [62] Muqing Yi, David Weaver, and Gyorgy Hajnoczky. Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *Science Signaling*, 167(4):661, 2004.
- [63] G. Szabadkai and M.R. Duchen. Mitochondria: the hub of cellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *Physiology*, 23(2):84–94, 2008.
- [64] Rosario Rizzuto, Diego De Stefani, Anna Raffaello, and Cristina Mammucari. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(9):566–578, 2012.
- [65] Markus Hoth, Donald C Button, and Richard S Lewis. Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(19):10607–10612, 2000.
- [66] Douglas R Green and Guido Kroemer. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305(5684):626–629, 2004.
- [67] Mariana Ruiz Villarreal. <http://commons.wikimedia.org/wiki/User:LadyofHats>.
- [68] Ivan Bogeski / Arbeitsgruppe Prof. Markus Hoth. *Universität des Saarlandes*.
- [69] Donner F Babcock, James Herrington, Paul C Goodwin, Young Bae Park, and Bertil Hille. Mitochondrial participation in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  network. *The Journal of cell biology*, 136(4):833–844, 1997.
- [70] Rosario Rizzuto, Marisa Brini, Marta Murgia, and Tullio Pozzan. Microdomains with high  $\text{Ca}^{2+}$  close to  $\text{ip}_3$ -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*, 262(5134):744–747, 1993.
- [71] M. Hoth, C.M. Fanger, and R.S. Lewis. Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *The Journal of cell biology*, 137(3):633–648, 1997.

- [72] Ariel Quintana, Eva C Schwarz, Christian Schwindling, Peter Lipp, Lars Kaestner, and Markus Hoth. Sustained activity of calcium release-activated calcium channels requires translocation of mitochondria to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52):40302–40309, 2006.
- [73] A. Quintana, C. Schwindling, A.S. Wenning, U. Becherer, J. Rettig, E.C. Schwarz, and M. Hoth. T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(36):14418–14423, 2007.
- [74] Christian Schwindling, Ariel Quintana, Elmar Krause, and Markus Hoth. Mitochondria positioning controls local calcium influx in T cells. *The journal of immunology*, 184(1):184–190, 2010.
- [75] Fyfe L Bygrave and Angelo Benedetti. What is the concentration of calcium ions in the endoplasmic reticulum? *Cell calcium*, 19(6):547–551, 1996.
- [76] M Montero, M Brini, R Marsault, J Alvarez, R Sitia, T Pozzan, and R Rizzuto. Monitoring dynamic changes in free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells. *The EMBO journal*, 14(22):5467–5475, 1995.
- [77] J Malcolm East. Sarco (endo) plasmic reticulum calcium pumps: recent advances in our understanding of structure/function and biology (review). *Molecular membrane biology*, 17(4):189–200, 2000.
- [78] E Carafoli. The calcium pumping ATPase of the plasma membrane. *Annual review of physiology*, 53(1):531–547, 1991.
- [79] Ray A Fontanilla and Richard Nuccitelli. Characterization of the sperm-induced calcium wave in xenopus eggs using confocal microscopy. *Biophysical journal*, 75(4):2079–2087, 1998.
- [80] James Lechleiter, Steven Girard, Ernest Peralta, and David Clapham. Spiral calcium wave propagation and annihilation in xenopus laevis oocytes. *Science*, 252(5002):123–126, 1991.
- [81] Diana M. Bautista, Markus Hoth, and Richard S. Lewis. Enhancement of calcium signalling dynamics and stability by delayed modulation of the plasma-membrane calcium-ATPase in human T cells. *The Journal of Physiology*, 541(3):877–894, 2002.
- [82] Diana M Bautista and Richard S Lewis. Modulation of plasma membrane calcium-ATPase activity by local calcium microdomains near CRAC channels in human T cells. *The Journal of physiology*, 556(3):805–817, 2004.
- [83] Jonathan Lytton, Marisa Westlin, Scott E Burk, Gary E Shull, and David H MacLennan. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *Journal of Biological Chemistry*, 267(20):14483–14489, 1992.

- [84] Patricia Camacho and James D Lechleiter. Increased frequency of calcium waves in *Xenopus laevis* oocytes that express a calcium-ATPase. *Science*, 260(5105):226–229, 1993.
- [85] Mette Laursen, Maike Bublitz, Karine Moncoq, Claus Olesen, Jesper Vuust Møller, Howard S Young, Poul Nissen, and J Preben Morth. Cyclopiazonic acid is complexed to a divalent metal ion when bound to the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20):13513–13518, 2009.
- [86] A. Quintana, D. Griesemer, E.C. Schwarz, and M. Hoth. Calcium-dependent activation of T-lymphocytes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 450(1):1–12, 2005.
- [87] Shannon K Bromley, W Richard Burack, Kenneth G Johnson, Kristina Somersalo, Tasha N Sims, Cenk Sumen, Mark M Davis, Andrey S Shaw, Paul M Allen, and Michael L Dustin. The immunological synapse. *Annual review of immunology*, 19(1):375–396, 2001.
- [88] Johannes B Huppa, Michael Gleimer, Cenk Sumen, and Mark M Davis. Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nature immunology*, 4(8):749–755, 2003.
- [89] Y. Zhou, P. Meraner, H.T. Kwon, D. Machnes, M. Oh-hora, J. Zimmer, Y. Huang, A. Stura, A. Rao, and P.G. Hogan. STIM1 gates the store-operated calcium channel ORAI1 in vitro. *Nature structural & molecular biology*, 17(1):112–116, 2010.
- [90] J.P. Yuan, W. Zeng, M.R. Dorwart, Y.J. Choi, P.F. Worley, and S. Muallem. SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate orai channels. *Nature cell biology*, 11(3):337–343, 2009.
- [91] C.Y. Park, P.J. Hoover, F.M. Mullins, P. Bachhawat, E.D. Covington, S. Raunser, T. Walz, K.C. Garcia, R.E. Dolmetsch, and R.S. Lewis. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell*, 136(5):876–890, 2009.
- [92] Christopher M Fanger, Markus Hoth, Gerald R Crabtree, and Richard S Lewis. Characterization of T cell mutants with defects in capacitative calcium entry: genetic evidence for the physiological roles of CRAC channels. *The Journal of cell biology*, 131(3):655–667, 1995.
- [93] Stefan Feske, Murali Prakriya, Anjana Rao, and Richard S Lewis. A severe defect in CRAC  $\text{Ca}^{2+}$  channel activation and altered  $\text{K}^+$  channel gating in T cells from immunodeficient patients. *The Journal of experimental medicine*, 202(5):651–662, 2005.
- [94] M Hoth and R Penner. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355(6358):353, 1992.

- [95] A. Zweifach and R.S. Lewis. Rapid inactivation of depletion-activated calcium current ( $I_{CRAC}$ ) due to local calcium feedback. *The Journal of general physiology*, 105(2):209–226, 1995.
- [96] A. Zweifach and R.S. Lewis. Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and-independent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 270(24):14445–14451, 1995.
- [97] Anant B Parekh. Slow feedback inhibition of calcium release-activated calcium current by calcium entry. *Journal of Biological Chemistry*, 273(24):14925–14932, 1998.
- [98] Eva C Schwarz, Carsten Kummerow, Anna S Wenning, Kerstin Wagner, Anne Sappok, Katherina Wagnershauser, Désirée Griesemer, Bettina Strauß, Melodie-Jo Wolfs, Ariel Quintana, et al. Calcium dependence of T cell proliferation following focal stimulation. *European journal of immunology*, 37(10):2723–2733, 2007.
- [99] Peter B. Stathopoulos, Guang-Yao Li, Michael J. Plevin, James B. Ames, and Mitsuhiro Ikura. Stored  $Ca^{2+}$  depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the ef-sam region: An initiation mechanism for capacitive  $Ca^{2+}$  entry. *Journal of Biological Chemistry*, 281(47):35855–35862, 2006.
- [100] Michael D Cahalan. STIMulating store-operated  $Ca^{2+}$  entry. *Nature cell biology*, 11(6):669–677, 2009.
- [101] Minnie M Wu, JoAnn Buchanan, Riina M Luik, and Richard S Lewis.  $Ca^{2+}$  store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *The Journal of cell biology*, 174(6):803–813, 2006.
- [102] J. Liou, M. Fivaz, T. Inoue, and T. Meyer. Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after  $Ca^{2+}$  store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(22):9301–9306, 2007.
- [103] Mary N Teruel and Tobias Meyer. Translocation and reversible localization of signaling proteins: a dynamic future for signal transduction. *Cell*, 103(2):181, 2000.
- [104] Z. Li, L. Liu, Y. Deng, W. Ji, W. Du, P. Xu, L. Chen, and T. Xu. Graded activation of CRAC channel by binding of different numbers of STIM1 to Orai1 subunits. *Cell research*, 21(2):305–315, 2010.
- [105] Shen Yuan L Zhang, Andriy V Yeromin, Xiang H-F Zhang, Ying Yu, Olga Safrina, Aubin Penna, Jack Roos, Kenneth A Stauderman, and Michael D Cahalan. Genome-wide RNAi screen of  $Ca^{2+}$  influx identifies genes that regulate  $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24):9357–9362, 2006.

- [106] Roland Malli, Shamim Naghdi, Christoph Romanin, and Wolfgang F Graier. Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  prevents the subplasmalemmal clustering of STIM1: an intrinsic mechanism to avoid  $\text{Ca}^{2+}$  overload. *Journal of cell science*, 121(19):3133–3139, 2008.
- [107] Maria I Lioudyno, J Ashot Kozak, Aubin Penna, Olga Safrina, Shenyuan L Zhang, Debasish Sen, Jack Roos, Kenneth A Stauderman, and Michael D Cahalan. Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6):2011–2016, 2008.
- [108] Valarie A Barr, Kelsie M Bernot, Sonal Srikanth, Yousang Gwack, Lakshmi Balagopalan, Carole K Regan, Daniel J Helman, Connie L Sommers, Masatsugu Oh-Hora, Anjana Rao, et al. Dynamic movement of the calcium sensor STIM1 and the calcium channel Orai1 in activated T-cells: puncta and distal caps. *Molecular biology of the cell*, 19(7):2802–2817, 2008.
- [109] Diane TW Chang, Anthony S Honick, and Ian J Reynolds. Mitochondrial trafficking to synapses in cultured primary cortical neurons. *The Journal of neuroscience*, 26(26):7035–7045, 2006.
- [110] Martin Falcke, Lev Tsimring, and Herbert Levine. Stochastic spreading of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Physical Review E*, 62(2):2636, 2000.
- [111] JW Shuai and P Jung. Selection of intracellular calcium patterns in a model with clustered  $\text{Ca}^{2+}$  release channels. *Physical Review E*, 67(3):031905, 2003.
- [112] Erin R Higgins, Mark B Cannell, and James Sneyd. A buffering serca pump in models of calcium dynamics. *Biophysical journal*, 91(1):151–163, 2006.
- [113] Kojiro Yano, O Petersen, and A Tepikin. Dual sensitivity of sarcoplasmic/endoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase to cytosolic and endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  as a mechanism of modulating cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. *Biochemical Journal*, 383:353–360, 2004.
- [114] Geneviève Dupont and Albert Goldbeter. 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(4):311–322, 1993.
- [115] Aurélien Alfonsi, Eric Cancès, Gabriel Turinici, Barbara Di Ventura, and Wilhelm Huisinga. Adaptive simulation of hybrid stochastic and deterministic models for biochemical systems. In *ESAIM: Proceedings*, volume 14, pages 1–13, 2005.
- [116] S Rüdiger, JW Shuai, W Huisinga, Ch Nagaiah, G Warnecke, I Parker, and M Falcke. Hybrid stochastic and deterministic simulations of calcium blips. *Biophysical journal*, 93(6):1847–1857, 2007.
- [117] Comsol Multiphysics. <http://www.comsol.com/>.

- [118] Johan Elf and Måns Ehrenberg. Spontaneous separation of bi-stable biochemical systems into spatial domains of opposite phases. *Systems biology*, 1(2):230–236, 2004.
- [119] D.T. Gillespie. A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions. *Journal of computational physics*, 22(4):403–434, 1976.
- [120] D.T. Gillespie. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *The journal of physical chemistry*, 81(25):2340–2361, 1977.
- [121] M.A. Gibson and J. Bruck. Efficient exact stochastic simulation of chemical systems with many species and many channels. *The journal of physical chemistry A*, 104(9):1876–1889, 2000.
- [122] Mark EJ Newman and Gerard T Barkema. Monte carlo methods in statistical physics. *Oxford: Clarendon Press*, 1, 1999.
- [123] Michael Kolonko. *Stochastische Simulation: Grundlagen, Algorithmen und Anwendungen*. Springer DE, 2008.
- [124] Johan Elf, Andreas Doncic, and Mans Ehrenberg. Mesoscopic reaction-diffusion in intracellular signaling. In *SPIE's First International Symposium on Fluctuations and Noise*, pages 114–124. International Society for Optics and Photonics, 2003.
- [125] Yasushi Sako and Akihiro Kusumi. Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *The Journal of cell biology*, 125(6):1251–1264, 1994.
- [126] N.L. Allbritton, T. Meyer, and L. Stryer. Range of messenger action of calcium ion and inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *Science*, 258(5089):1812–1815, 1992.
- [127] A M Mastro, M A Babich, W D Taylor, and A D Keith. Diffusion of a small molecule in the cytoplasm of mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(11):3414–3418, 1984.
- [128] Z. Zhou and E. Neher. Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells. *The Journal of Physiology*, 469(1):245–273, 1993.
- [129] G Orädd, Goran Lindblom, Krister Fontell, and Helena Ljusberg-Wahren. Phase diagram of soybean phosphatidylcholine-diacylglycerol-water studied by x-ray diffraction and <sup>31</sup>P- and pulsed field gradient <sup>1</sup>H-NMR: evidence for reversed micelles in the cubic phase. *Biophysical journal*, 68(5):1856–1863, 1995.
- [130] Lenka Bittova, Robert V Stahelin, and Wonhwa Cho. Roles of ionic residues of the C1 domain in protein kinase C- $\alpha$  activation and the origin of phosphatidylserine specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6):4218–4226, 2001.

- [131] Robert V Stahelin, John D Rafter, Sudipto Das, and Wonhwa Cho. The molecular basis of differential subcellular localization of C2 domains of protein kinase C- $\alpha$  and group IVA cytosolic phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry*, 278(14):12452–12460, 2003.
- [132] Imagej. <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.
- [133] Bin Qu, Dalia Al-Ansary, Carsten Kummerow, Markus Hoth, and Eva C Schwarz. Orai-mediated calcium influx in T cell proliferation, apoptosis and tolerance. *Cell calcium*, 50(3):261–269, 2011.
- [134] Andrea Maul-Pavicic, Samuel CC Chiang, Anne Rensing-Ehl, Birthe Jessen, Cyril Fauriat, Stephanie M Wood, Sebastian Sjöqvist, Markus Hufnagel, Ilka Schulze, Thilo Bass, et al. Orai1-mediated calcium influx is required for human cytotoxic lymphocyte degranulation and target cell lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(8):3324–3329, 2011.
- [135] Aubin Penna, Angelo Demuro, Andriy V Yeromin, Shenyuan L Zhang, Olga Safirina, Ian Parker, and Michael D Cahalan. The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature*, 456(7218):116–120, 2008.
- [136] Xiaowei Hou, Leanne Pedi, Melinda M. Diver, and Stephen B. Long. Crystal structure of the Calcium Release-Activated Calcium Channel Orai. *Science*, 338(6112):1308–1313, 2012.
- [137] R.S. Lewis. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annual review of immunology*, 19(1):497–521, 2001.
- [138] Sidney Redner. *A guide to first-passage processes*. Cambridge University Press, 2001.
- [139] Yue-Xian Li and John Rinzel. Equations for  $\text{insp}_3$  receptor-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations derived from a detailed kinetic model: A Hodgkin-Huxley like formalism. *Journal of theoretical Biology*, 166(4):461–473, 1994.
- [140] Rosario Rizzuto, Paolo Bernardi, and Tullio Pozzan. Mitochondria as all-round players of the calcium game. *The Journal of physiology*, 529(1):37–47, 2000.
- [141] François Ichas, Laurence S Jouaville, and Jean-Pierre Mazat. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell*, 89(7):1145–1153, 1997.
- [142] M. Falcke, J.L. Hudson, P. Camacho, and J.D. Lechleiter. Impact of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  cycling on pattern formation and stability. *Biophysical Journal*, 77(1):37–44, 1999.

- [143] Ashley A Rowland and Gia K Voeltz. Endoplasmic reticulum–mitochondria contacts: function of the junction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(10):607–625, 2012.
- [144] J. Shuai, J.E. Pearson, and I. Parker. Modeling  $\text{Ca}^{2+}$  feedback on a single inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor and its modulation by  $\text{Ca}^{2+}$  buffers. *Biophysical journal*, 95(8):3738–3752, 2008.
- [145] S. Rüdiger, C. Nagaiah, G. Warnecke, and JW Shuai. Calcium domains around single and clustered  $\text{ip}_3$  receptors and their modulation by buffers. *Biophysical journal*, 99(1):3–12, 2010.
- [146] J. Sneyd, K. Tsaneva-Atanasova, J.I.E. Bruce, S.V. Straub, D.R. Giovannucci, and D.I. Yule. A model of calcium waves in pancreatic and parotid acinar cells. *Biophysical Journal*, 85(3):1392 – 1405, 2003.
- [147] Martin Falcke, Yun Li, James D Lechleiter, and Patricia Camacho. Modeling the dependence of the period of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  waves on SERCA expression. *Biophysical journal*, 85(3):1474–1481, 2003.
- [148] Divya Swaminathan and Peter Jung. The role of agonist-independent conformational transformation (aict) in  $\text{ip}_3$  subunit cluster behavior. *Cell Calcium*, 49(3):145–152, 2011.
- [149] JW Bassani, R.A. Bassani, and D.M. Bers. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *The Journal of physiology*, 476(2):279–293, 1994.
- [150] A.J. Caride, A.R. Penheiter, A.G. Filoteo, Z. Bajzer, Á. Enyedi, and J.T. Penniston. The plasma membrane calcium pump displays memory of past calcium spikes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43):39797–39804, 2001.
- [151] Gerhard Magnus and Joel Keizer. Model of  $\beta$ -cell mitochondrial calcium handling and electrical activity. I. cytoplasmic variables. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 274(4):C1158–C1173, 1998.
- [152] My-Hanh T Nguyen, Stephen J Dudycha, and M Saleet Jafri. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on cardiac mitochondrial energy production is modulated by  $\text{Na}^+$  and  $\text{H}^+$  dynamics. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(6):C2004–C2020, 2007.
- [153] Ranjan K Dash, Feng Qi, and Daniel A Beard. A biophysically based mathematical model for the kinetics of mitochondrial calcium uniporter. *Biophysical journal*, 96(4):1318–1332, 2009.
- [154] Shi Xiao-Min and Liu Zeng-Rong. An intracellular calcium oscillations model including mitochondrial calcium cycling. *Chinese Physics Letters*, 22(12):3206, 2005.

- [155] AS Verkman et al. Monte carlo analysis of obstructed diffusion in three dimensions: application to molecular diffusion in organelles. *Biophysical journal*, 74(5):2722–2730, 1998.
- [156] Juan Burrone, Guilherme Neves, Ana Gomis, Anne Cooke, and Leon Lagnado. Endogenous calcium buffers regulate fast exocytosis in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *Neuron*, 33(1):101–112, 2002.
- [157] Wei Ji, Pingyong Xu, Zhengzheng Li, Jingze Lu, Lin Liu, Yi Zhan, Yu Chen, Bertil Hille, Tao Xu, and Liangyi Chen. Functional stoichiometry of the unitary calcium release-activated calcium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36):13668–13673, 2008.
- [158] M.J. Berridge. Capacitative calcium entry. *Biochemical Journal*, 312(Pt 1):1, 1995.
- [159] J.J. Torres, LN Cornelisse, EGA Harks, WPM Van Meerwijk, APR Theuvenet, and D.L. Ypey. Modeling action potential generation and propagation in NRK fibroblasts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 287(4):C851–C865, 2004.
- [160] D.M. Bautista, M. Hoth, and R.S. Lewis. Enhancement of calcium signalling dynamics and stability by delayed modulation of the plasma-membrane calcium-ATPase in human T cells. *The Journal of physiology*, 541(3):877–894, 2004.
- [161] Stephen L. Colegrove, Meredith A. Albrecht, and David D. Friel. Dissection of Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  Uptake and Release Fluxes in Situ after Depolarization-Evoked  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  Elevations in Sympathetic Neurons. *The Journal of General Physiology*, 115(3):351–370, 2000.
- [162] David C Chan. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22:79–99, 2006.
- [163] Hsiuchen Chen and David C. Chan. Mitochondrial dynamics—fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases. *Human Molecular Genetics*, 18(R2):R169–R176, 2009.
- [164] Christian Erxleben, Norbert Klauke, Matthias Flötenmeyer, Marie-Pierre Blanchard, Claudia Braun, and Helmut Plattner. Microdomain  $\text{Ca}^{2+}$  activation during exocytosis in paramecium cells. superposition of local subplasmalemmal calcium store activation by local  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *The Journal of cell biology*, 136(3):597–607, 1997.
- [165] Peter B Simpson, Surabhi Mehotra, G David Lange, and James T Russell. High density distribution of endoplasmic reticulum proteins and mitochondria at specialized  $\text{Ca}^{2+}$  release sites in oligodendrocyte processes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(36):22654–22661, 1997.

- [166] CM Misquitta, DP Mack, and AK Grover. Sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves. *Cell Calcium*, 25(4):277–290, 1999.
- [167] Th. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437(1-2):55–75, 1948.
- [168] Irfanview. <http://www.irfanview.de/>.



# Anhang

## A.1 FRET-Mikroskopie

Der Förster- (oder Fluoreszenz-) Resonanzenergietransfer (kurz FRET) ist ein physikalischer Prozess der strahlungsfreien Energieübertragung [167]. Bei diesem Vorgang wird die Energie eines angeregten molekularen Fluophors (Donor) nicht in Form von Photonen auf einen anderen Fluophor (Akzeptor) übertragen sondern durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Die auf den Akzeptor übertragene Energie (dem Donor fehlt nun genau dieser Energiebetrag) kann von ihm als Strahlung abgegeben werden. Makroskopisch beobachtet man beim FRET eine Abnahme der Strahlungsintensität des Donors bei gleichzeitiger Zunahme der Strahlungsintensität des Akzeptors. Der Effekt des FRET hängt entscheidend vom Abstand der beiden Fluophore ab und erlaubt es sowohl inter- als auch intramolekulare Signale in einem Bereich von 1 – 10 nm zu detektieren. Deshalb eignet sich die FRET-Mikroskopie insbesondere zur Auflösung von molekularen Wechselwirkungen bzw. Konformationen. Auf diese Weise kann so auch eine mögliche Proteininteraktion bei der Calcium-Signalgebung mittels FRET-Mikroskopie untersucht werden.

### A.1.1 Effizienz des FRET-Signals

Die Effizienz  $E$  des FRET-Signals ist das Verhältnis aus der Anzahl an Energietransfers und der Anzahl der Donoranregungen. Sie ist besonders sensibel gegenüber dem Abstand  $r$  der beiden Fluophore. Bei der FRET-Mikroskopie liegen die Werte für  $r$  im allgemeinen mit Bereich von 0,5 – 10 nm. Die Effizienz des FRET-Signals nimmt mit der sechsten Potenz des Abstandes  $r$  ab:

$$E = \frac{\frac{R_0^6}{r^6}}{1 + \frac{R_0^6}{r^6}} . \quad (\text{A.1})$$

Hier ist  $R_0$  der Förster-Radius des Donor-Akzeptor-Paars, der Abstand zwischen beiden Fluophoren, bei dem die Energieübertragung zu 50% erfolgt. Um eine möglichst effiziente strahlungsfreie Energieübertragung vom Donor auf den Akzeptor über den

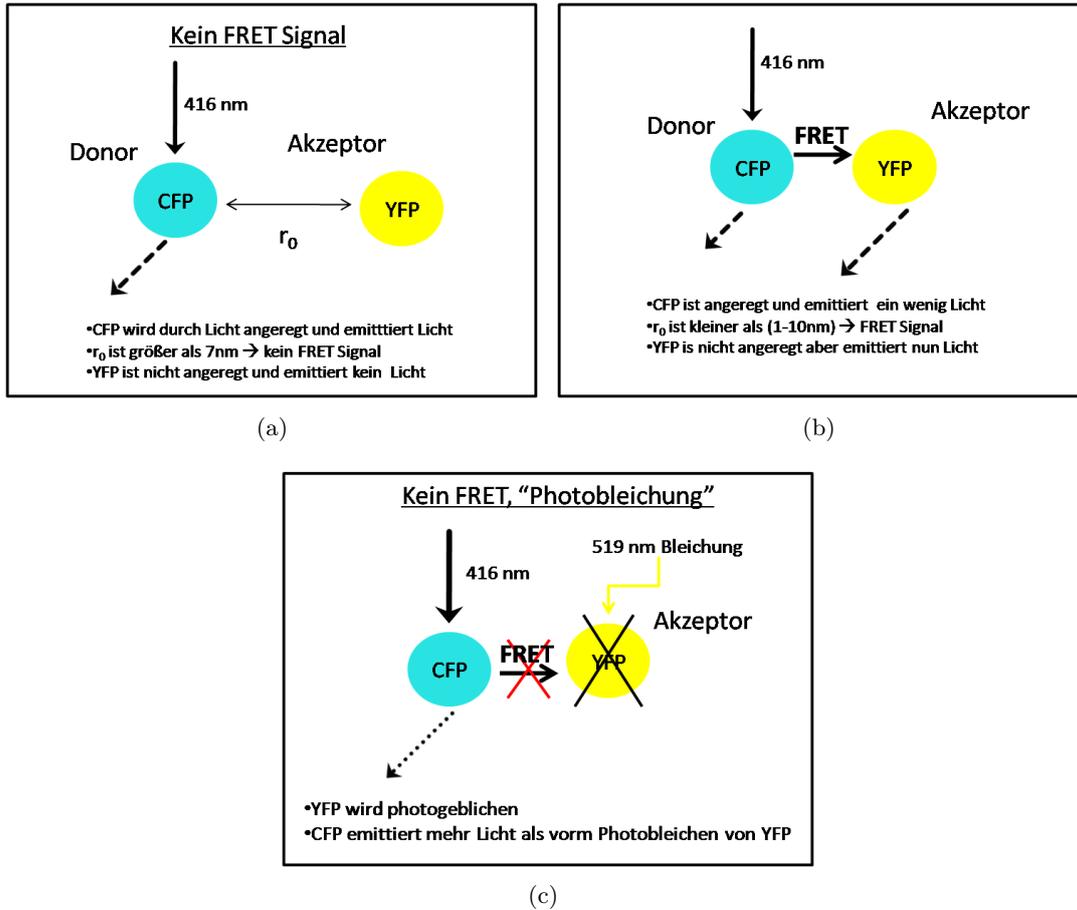


Abbildung A.1: Schematische Darstellung des FRET-Signals sowie Photobleichens.

Förster-Resonanzenergietransfer zu gewährleisten, müssen drei wichtige Kriterien erfüllt sein (siehe auch Abbildung A.1):

1. Der Abstand  $x$  zwischen Donor und Akzeptor sollte nur wenige Nanometer betragen ( $r_0 < 10$  nm).
2. Das Strahlungsemissionsspektrum des Donors sollte mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen.
3. Donor und Akzeptor sollten über parallele elektronische Schwingungsebenen verfügen.

Gerade die Tatsache, dass ein FRET-Signal nur beobachtet werden kann, falls Donor und Akzeptor sich wenige Nanometer entfernt befinden (Kriterium 1), führte dazu, dass die Methode des Förster-Resonanzenergietransfers ein wichtiges Hilfsmittel in der Zellbiologie, Biochemie und Biophysik wurde. Mit ihrer Hilfe kann man Erkenntnisse über Wechselwirkungen zwischen Molekülen, Konformationsänderungen von Komplexen oder

Abstände zwischen Teilchen, z.B. Proteinen, erhalten.

Damit es zum Förster-Resonanzenergietransfer kommen kann, muss das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Anderenfalls kann der Akzeptor die vom Donor abgegebene Energiemenge nicht aufnehmen. Für das häufig als Donor-Akzeptor-Paar verwendete Yellow Fluorescent Protein (YFP) und Cyan Fluorescent Protein (CFP) ist diese Überlappung gegeben.

### A.1.2 Messung des FRET-Signals

Der Förster-Resonanzenergietransfer lässt sich nicht direkt nachweisen, da der Prozess strahlungsfrei abläuft. Allerdings ist wie oben beschrieben makroskopisch eine Abnahme der Strahlungsemission des Donor-Farbstoffes bzw. ein Anstieg in der Strahlungsemission des Akzeptor-Farbstoffes zu beobachten. Diese makroskopischen Veränderungen in der Strahlungsintensität der beiden Farbstoffe können dann z.B. mittels Fluoreszenzmikroskopen dargestellt bzw. gemessen werden. Prinzipiell kann zum Nachweis des Förster-Resonanzenergietransfers entweder die Strahlungsemission des Donors oder aber die Strahlungsübertragung auf den Akzeptor gemessen werden.

Bei einer „direkten“ Messung des FRET-Signals, also der Messung der Strahlungsübertragung auf den Akzeptor, besteht bei vielen bekannten fluoreszierenden Donor-Akzeptor-Paaren das Problem, dass das Anregungs- und Emissionsspektrum des Donors mit dem Emissionsspektrum des Akzeptors überlappen, so auch bei dem häufig als Donor-Akzeptor-Paar verwendeten YFP-CFP. In solchen Fällen ist es schwierig die Quelle der gemessenen Intensitätsveränderung genau zuzuordnen.

Bei Experimenten zur Bestimmung des Förster-Resonanzenergietransfers wird daher häufig die Fluoreszenzmikroskopie dazu benutzt, die Strahlungsemission des Donors zu messen. Auch sie kann wiederum auf zwei verschiedene Weisen bestimmt werden. Im ersten Fall nutzt man die Abnahme der Strahlungsemission des Donors um den Förster-Resonanzenergietransfer zu charakterisieren. Hierzu wird einmal die Strahlungsintensität des Donors in Anwesenheit ( $I_{an}$ ) und in Abwesenheit ( $I_{ab}$ ) des Akzeptors gemessen. Die FRET-Effizienz bestimmt sich dann zu  $E = 1 - \frac{I_{an}}{I_{ab}}$ . Die zweite Möglichkeit, FRET bei gleichzeitiger Anwesenheit von Donor und Akzeptor zu messen, bezeichnet man als Photobleichung (engl.: photobleaching) oder auch „indirekte“ FRET-Messung (siehe Abbildung A.1 c)). Bei der Photobleichung bestrahlt man den entsprechenden Fluophor (hier den Akzeptor) mit Licht seiner Anregungswellenlänge. Die Photobleichung stellt einen photochemischen Prozess dar, der dazu führt, dass der Fluophor (hier Akzeptor) seine Möglichkeit zur Fluoreszenz verliert. Photobleicht man also den Akzeptor, so kommt es zu einer Zunahme der Strahlungsintensität des Donor-Farbstoffs auf einen Wert ohne Resonanzenergietransfer (siehe Abbildung A.1 b)). Diese Differenz ist ein Maß für die Effizienz der Energieübertragung.

### A.1.3 Experimente

Im Rahmen der von Mike Bonny und mir in Homburg am Lehrstuhl von Prof. Lipp durchgeführten Messungen des Förster-Resonanzenergietransfers stellen wir uns die folgende Frage: Gibt es eine spezifische Protein-Protein-Interaktion zwischen Proteinkinase C  $\alpha$  (PKC) Molekülen, die an der Plasmamembran gebunden sind? Dazu verwenden wir PKC-Proteine, die mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind, so dass bei einer Wechselwirkung der zu untersuchenden PKC-Proteine eine Zunahme des Förster-Resonanzenergietransfers zwischen den gekoppelten Farbstoffen beobachtet und gemessen werden kann. Als fluoreszierendes Donor-Akzeptor-Paar kommen die Proteine YFP (yellow fluorescent protein) und CFP (cyan fluorescent protein) zum Einsatz. Die verwendeten HEK-Zellen (human embryonic kidney) exprimieren sowohl mit YFP als auch mit CFP markierte PKC-Proteine, wobei die jeweiligen Konzentrationen an YFP bzw. CFP markierten Proteinen unbekannt sind. Als Messmethode wird das oben beschriebene Photobleichen des Akzeptors, hier des YFP Moleküls, herangezogen. Neben dieser „eigentlichen“ Messung des Förster-Resonanzenergietransfers werden Referenzmessungen von HEK-Zellen durchgeführt, deren PKC-Proteine nur mit einem der beiden Fluophore markiert sind. Diese Referenzmessungen sollen zeigen, dass es nach der Photobleichung nur aufgrund des Förster-Resonanzenergietransfers zu einem Anstieg in der Intensität der Donor-Farbstoffes kommt. Somit können andere Quellen - wie z. B. die Anregung des Donors durch das Photobleichen mit Anregungswellenlänge des Akzeptors - ausgeschlossen werden. Man sollte in diesem Zusammenhang nicht vergessen, dass sich die Spektren des YFP-CFP-Paares überlappen.

### A.1.4 Durchführung und Bildanalyse

Zunächst werden die in der AG Prof. Lipp behandelten HEK-Zellen aus dem Brutschrank genommen und mit Tyrode-Lösung<sup>25</sup> versetzt. Anschließend erfolgt die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zellen, die aufgrund ihrer DNA-Veränderung PKC-Fluophor-Proteine exprimieren. Um eine Protein-Protein-Wechselwirkung der membrangebundenen PKC-Moleküle zu untersuchen wird der Tyrode-Lösung zusätzlich 1  $\mu$ M PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) beigegeben. Die Hinzugabe von PMA aktiviert die PKCs und führt zu ihrer Translokation in Richtung der Zellmembran.

Die vom Mikroskophersteller entwickelte Software speichert die Aufnahmen in einem Stream von mehreren Bilddateien des Dateiformates „tiff“ ab. Diese werden zur Analyse der Aufnahme mit Hilfe der freien Software „Irfanview“ [168] in einzelne Bilddateien beliebigen Bildformats umgewandelt und anschließend mit der ebenfalls freien Software „ImageJ“ [132] analysiert bzw. ausgewertet. Bei Analyse der Bilddateien mittels ImageJ konzentrieren wir uns zunächst auf einige aussagekräftige Bereiche, die sogenannten ROIs (regions of interest), und ermitteln deren Helligkeitsstufe bzw. Intensität zu unterschiedlichen Zeitpunkten (siehe Abbildung A.2). Zur besseren Visua-

---

<sup>25</sup>Tyrode-Lösung ist eine Lösung von Elektrolyten in physiologischer Zusammensetzung in Wasser.

lisierung erhielten die jeweiligen Fluophore eine gelbe (YFP) oder cyan-blaue (CFP) Einfärbung.

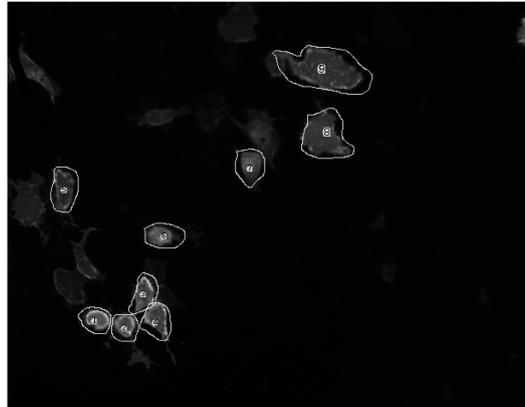


Abbildung A.2: Visualisierung der ROIs. Auswahl der Bildbereiche, die für die Intensitätsanalyse betrachtet werden sollen.

#### A.1.5 Ergebnisse der Referenzmessungen

Um den Einfluss des Photobleichens auf die Messung eines möglichen FRET-Signals ausschließen zu können, führen wir Referenzmessungen durch. Die für diese Referenzmessungen verwendeten HEK-Zellen exprimieren jeweils nur mit einem der beiden Fluophore markierte PKC-Moleküle. Die Experimente mit Zellen, die nur mit CFP markierte PKCs enthalten, werden wie folgt durchgeführt. Zunächst wird zum Zeitpunkt  $t = 0$  eine Aufnahme der Probe erstellt. Hierzu werden die Zellen für die Dauer von 300 ms mit Licht der Wellenlänge von 417 nm bestrahlt. Danach folgt das Photobleichen. Dazu wird die Probe eine Minute lang mit Licht der Wellenlänge von 519 nm bestrahlt. Diese Wellenlänge von 519 nm liegt im Anregungsspektrum des später als Akzeptor verwendeten YFP. Nach Ablauf dieser 60 s erfolgt eine erneute Aufnahme der Zellen. Während eines Zeitraums von 15 min wechseln nun diese beiden Vorgänge des „Bleichens“ und der Bildaufnahme einander ständig ab. Anschließend werden die Intensitäten der aufgenommenen Bilddateien mittels der Software Imagej ermittelt und graphisch gegen die Zeit aufgetragen. Wie in Abbildung A.3 zu erkennen ist, führt die Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge von 519 nm über eine Dauer von 15 min zu einem Abfall der Strahlungsintensität des CFP Farbstoffes auf ca. 90% der Ausgangsintensität. Misst man die zeitliche Änderung der Strahlungsintensität von HEK-Zellen, die beide Fluoreszenzproteine enthalten, so kann ausgeschlossen werden, dass ein Anstieg in der CFP-Strahlungsintensität vom Bleichvorgang des YFP verursacht wird. Ein Anstieg der Donor (CFP) -Strahlungsintensität wäre

also das Resultat eines Förster-Resonanzenergietransfers bzw. FRET-Signals. Auch für

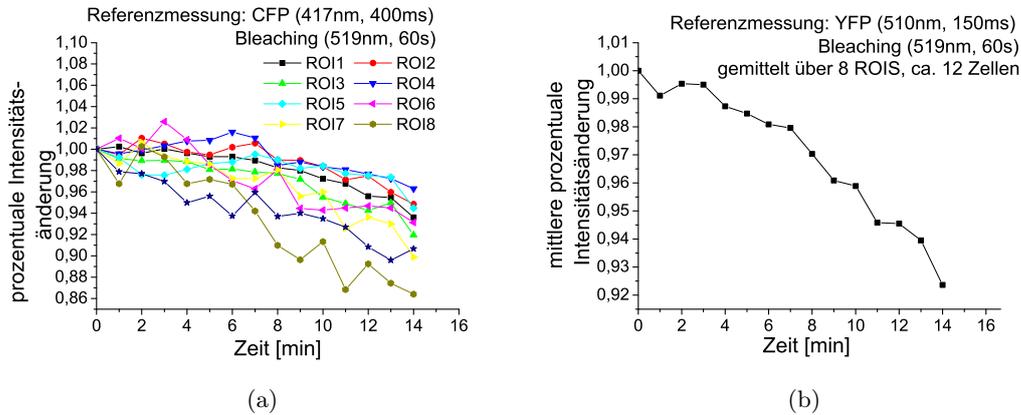


Abbildung A.3: Referenzmessung von HEK-Zellen, die nur mit CFP markierte PKC-Proteine exprimieren. Dargestellt ist die zeitliche Veränderung der Strahlungsintensität des CFP-Farbstoffes in a) für verschiedene ROIs und in b) gemittelt über diese unterschiedlichen Raumbereiche.

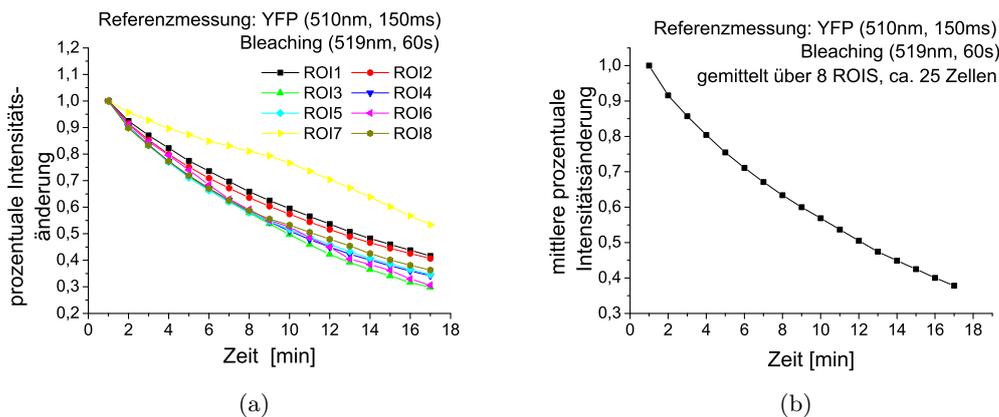


Abbildung A.4: Referenzmessung von HEK-Zellen, die nur mit YFP markierte PKC-Proteine exprimieren. Dargestellt ist die zeitliche Veränderung der Strahlungsintensität des YFP-Farbstoffes in a) für verschiedene ROIs und in b) gemittelt über diese unterschiedlichen Raumbereiche.

Zellen, die ausschließlich mit YFP markierte PKC-Proteine ausschütten, wurden Referenzmessungen durchgeführt. Zunächst wird die Zellprobe zum Zeitpunkt  $t = 0$  für eine Dauer von 250 ms mit Licht der Wellenlänge 510 nm bestrahlt und die entsprechende Bilddatei abgespeichert. Danach folgt für eine Dauer von 60 s das Photobleichen mit der

Wellenlänge 519 nm, ebenso wie bei der Referenzmessung für CFP. Auch hier werden die beiden Prozesse der Bildaufnahme und des Bleichens noch 15 mal wiederholt. Die aufgenommenen Bilddateien werden dann mittels Irfanview und ImageJ bearbeitet und analysiert. Die so erhaltene zeitliche Änderung der Strahlungsintensität des geblichenen PKC-Farbstoffes ist in Abbildung A.4 dargestellt. Im Gegensatz zu der vorigen Referenzmessung mit den ausschließlich YFP exprimierenden Zellproben ist hier ein deutlicher Abfall in der Strahlungsintensität zu sehen. Die Intensität der YFP-Proteine fällt aufgrund des Photobleichens auf 30% des Ausgangswertes ab. Die Referenzmessungen der YFP-Proben sollten der Verifizierung dienen, dass das Photobleichen des Akzeptors YFP keinen Anstieg der Strahlungsintensität des CFP mit sich bringt. Ein wirkliches Photobleichen findet nur bei Referenzmessung der YFP exprimierenden Zellen statt, bei denen das YFP durch das Bestrahlen mit Licht seiner Anregungswellenlänge von 519 nm geblichen wird.

## A.2 Ergänzungen zum Kapitel 6 „Calcium-Signale während der T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Polarisierung“

### A.2.1 Ergebnisse des 1D-Modells für unterschiedliche Mitochondrienlängen

Hier sind die zum Abschnitt 6.2.3 und Abbildung 6.2 korrespondierenden Ergebnisse des 1D-Modells für zwei unterschiedliche Mitochondrienlängen  $l = 2 \mu\text{m}$  bzw.  $l = 3 \mu\text{m}$  gezeigt. Die Ergebnisse unterscheiden sich qualitativ nicht von denen des Base-Case Szenarios ( Mitochondrienlänge  $l = 1 \mu\text{m}$ ). Der Einfluss der Mitochondrienlänge  $l$  kann auch einfach in der Lösung des Modells (siehe Gleichung 6.9) abgelesen werden. Zum besseren Vergleich mit den Resultaten des 3D-Modells, bei dem die Mitochondrienlänge im Base-Case Szenario ca.  $3 \mu\text{m}$  beträgt, werden hier die Ergebnisse im 1D-Fall für ähnlich lange Mitochondrien präsentiert. Die Ergebnisse für eine Mitochondrienlänge von  $l = 2 \mu\text{m}$  sind in Abbildung A.5 zu sehen und die Ergebnisse für eine Mitochondrienlänge von  $l = 3 \mu\text{m}$  sind in Abbildung A.6 dargestellt.

### A.2.2 Erweiterungen des 1D-Modells

Im Folgenden werden Erweiterungen des 1D-Modells der Calcium-Signalgebung in T-Zellen diskutiert, das in Abschnitt 6.2 präsentiert wird. Die erste hier vorgestellte Erweiterung besteht darin, dass sich zusätzlich zu den PMCA-Pumpen am Zellende auch PMCA-Pumpen in direkter Umgebung der IS befinden (siehe Abbildung A.7) und wurde bereits in Quintana et al. [13] vorgestellt. Diese Modellgeometrie ist realistischer und entspricht eher der im 3D-Modell (vergleiche Kapitel 6.4) gewählten Anordnung der Zellorganellen und Pumpen. Die zweite Erweiterung beinhaltet eine  $\text{Ca}^{2+}$ - Diffusion innerhalb der Mitochondrien (siehe Abbildung A.8), ebenfalls analog zum 3D-Modell.

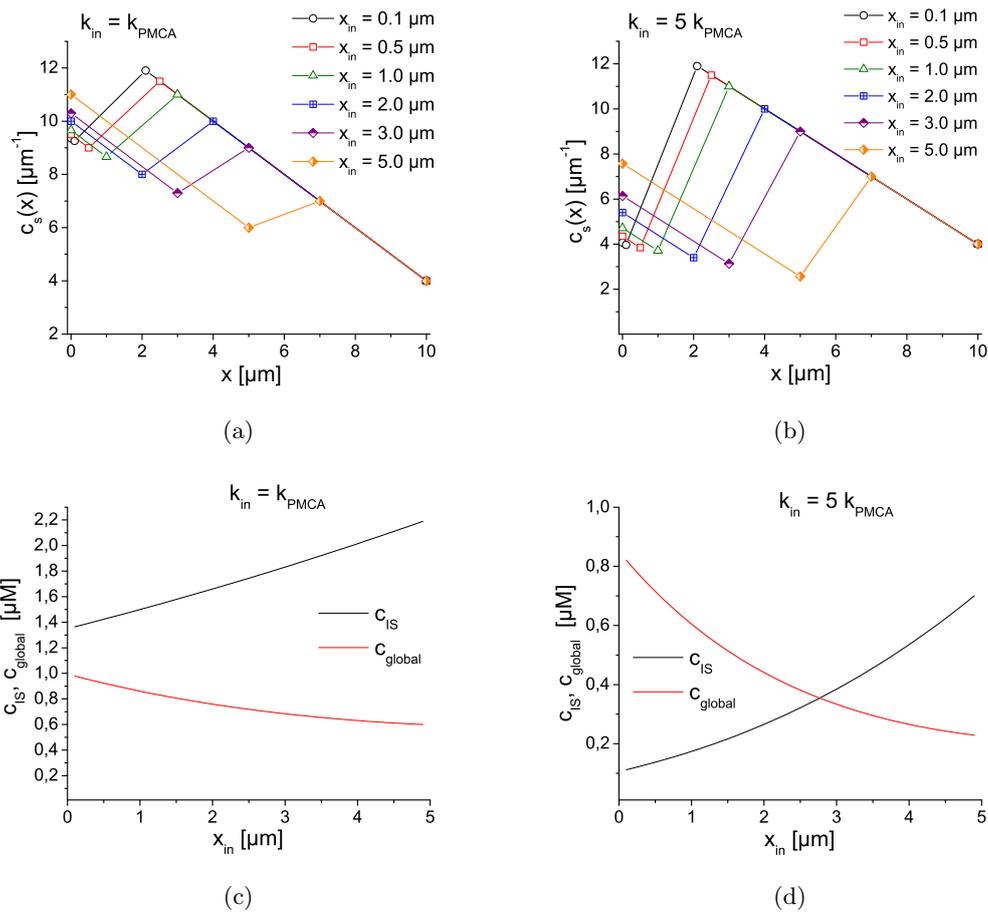


Abbildung A.5: Die verwendeten Parameter unterscheiden sich von denen aus Tabelle 6.1 lediglich durch die Mitochondrienlänge  $l = 2 \mu\text{m}$ . a) - b) Stationäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $c_s(x)$  als Funktion von  $x$  für verschiedene Mitochondrienpositionen  $x_{in}$  und verschiedene mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmeraten  $k_{in}$ . d) - e) Vergleich der stationären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (lokal) an der Immunologischen Synapse  $c_{IS} = c_0$  und der gemittelten globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $c_{global}$  als Funktion des Abstandes  $x_{in}$  zwischen IS und Mitochondrien für verschiedene mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmeraten  $k_{in}$ .

Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Diffusion ersetzt die im ursprünglichen 1D-Modell doch recht stark vereinfachte Annahme, dass die gesamte Menge an Calcium, die von den Mitochondrien an der Position  $x_{in}$  aufgenommen wird, instantan an der Position  $x_{out}$  wieder freigesetzt wird. Wie man anhand der Abbildungen A.7 und A.8 sehen kann, zeigen die beiden Versionen qualitativ die gleichen Resultate wie die etwas einfachere Version des Modells aus dem Haupttext (vergleiche Abbildung 6.2). Man erhält immer das Ergebnis, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unabhängig von der Parameterwahl an der IS (nahe an  $x = 0$ ) mit wachsendem Abstand der Mitochondrien zur IS ( $x_{in}$ ) ansteigt und gleichzeitig die

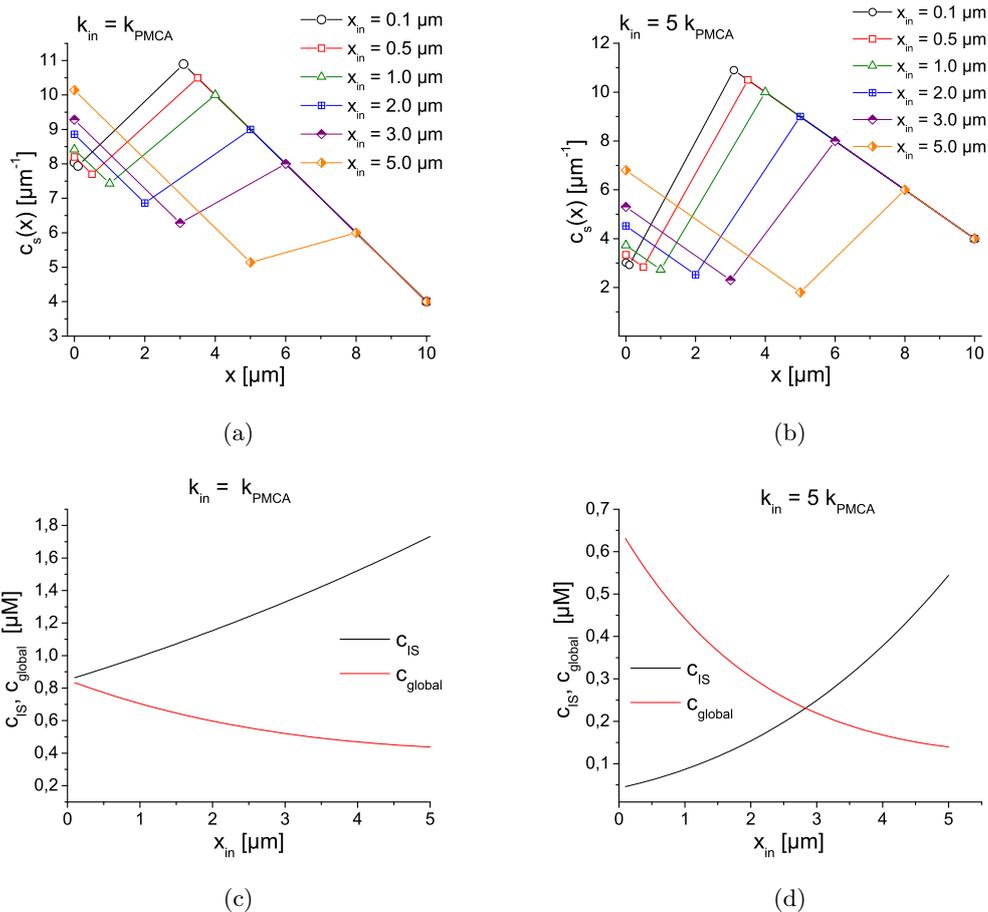


Abbildung A.6: Die verwendeten Parameter unterscheiden sich von denen aus Tabelle 6.1 lediglich durch die Mitochondrien Länge  $l = 3 \mu m$ . a) - b) Stationäre  $Ca^{2+}$ -Konzentration  $c_s(x)$  als Funktion von  $x$  für verschiedene Mitochondrienpositionen  $x_{in}$  und verschiedene mitochondriale  $Ca^{2+}$ -Aufnahmeraten  $k_{in}$ . d) - e) Vergleich der stationären  $Ca^{2+}$ -Konzentration (lokal) an der Immunologischen Synapse  $c_{IS} = c_0$  und der gemittelten globalen  $Ca^{2+}$ -Konzentration  $c_{global}$  als Funktion des Abstandes  $x_{in}$  zwischen IS und Mitochondrien für verschiedene mitochondriale  $Ca^{2+}$ -Aufnahmeraten  $k_{in}$ .

gemittelte  $Ca^{2+}$ -Konzentration innerhalb der Zelle mit wachsendem  $x_{in}$  abnimmt. Somit ist die essentielle Aussage / Vorhersage aller Modell-Versionen gleich: Die Bewegung der Mitochondrien hin zur IS bei aktivierten CRAC-Kanälen ist hinreichend dafür, dass die globale  $Ca^{2+}$ -Konzentration der Zelle ansteigt. Die mathematischen Lösungen der beiden Modellvarianten werden im Folgenden beschrieben, wobei nicht auf alle Details eingegangen wird, da viele Schritte analog zu dem im Haupttext (vgl. Abschnitt 6.2) beschriebenen Lösungsweg sind. In allen Modell-Versionen bezeichnet die Variable  $x$  den Abstand von der IS,  $L$  die Länge der eindimensionalen Zelle und  $l = x_{out} - x_{in}$  die

Länge der Mitochondrien. Dabei sind  $x_{\text{in}}$  und  $x_{\text{out}}$  die beiden Orte, an denen die Mitochondrien das zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  aufnehmen bzw. wieder abgeben.  $k_{\text{CRAC}}$ ,  $k_{\text{PMCA}}$  und  $k_{\text{PMCA}_{\text{IS}}}$  sind die Stärken der CRAC-Kanäle und PMCA-Pumpen an der IS und am hinteren Ende der Zelle.  $k_{\text{in}}$  bezeichnet die Stärke der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und Freisetzung.

## 1. PMCA-Pumpe auch in der Umgebung der IS

Dieses Modell-Szenario ist in Abbildung A.7 dargestellt, und die entsprechende Situation wird mathematisch durch folgende Gleichungen beschrieben:

$$\begin{aligned} \frac{\partial c(x, t)}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 c(x, t)}{\partial x^2} - k_{\text{PMCA}_{\text{IS}}} c(x_0, t) \delta(x - x_0) - k_{\text{in}} c(x_{\text{in}}, t) \delta(x - x_{\text{in}}) \\ &\quad + k_{\text{in}} c(x_{\text{in}}, t) \delta(x - x_{\text{out}}), \end{aligned} \quad (\text{A.2})$$

mit Randbedingungen

$$Dc'_s(x=0) = \left. \frac{dc_s}{dx} \right|_{x=0} = -k_{\text{CRAC}}, \quad (\text{A.3})$$

$$Dc'_s(x=L) = \left. \frac{dc_s}{dx} \right|_{x=L} = +k_{\text{PMCA}} c_s(x=L).$$

Man ist wiederum an der stationären Lösung des Problems  $c_s(x) = \lim_{t \rightarrow \infty} c(x, t)$  interessiert. Es gilt  $c''_s(x) = 0$  für  $x \neq x_{\text{in}}, x_{\text{out}}$ , was bedeutet, dass  $c_s(x)$  stückweise linear (wie in Abbildung A.7 angedeutet) und natürlich stetig ist. An den Stellen  $x = x_{\text{in}}$  und  $x = x_{\text{out}}$  besitzt die zweite Ableitung von  $c_s(x)$  einen Delta-Funktions-Anteil

$$\begin{aligned} Dc''_s(x) &= +k_{\text{in}} c_s(x_{\text{in}}) \delta(x - x_{\text{in}}) - k_{\text{PMCA}_{\text{IS}}} c_s(x_0) \delta(x - x_0) \\ &\quad - k_{\text{in}} c_s(x_{\text{in}}) \delta(x - x_{\text{out}}), \end{aligned} \quad (\text{A.4})$$

was bedeutet, dass die erste Ableitung an folgenden Stellen einen Sprung aufweist

$$\Delta c'_s(x_{0,\text{in},\text{out}}) = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \int_{x_{0,\text{in},\text{out}} - \epsilon}^{x_{0,\text{in},\text{out}} + \epsilon} dx c''_s(x) = \begin{cases} c_s(x_0) k_{\text{PMCA}_{\text{IS}}}/D & \text{für } x = x_0 \\ c_s(x_{\text{in}}) k_{\text{in}}/D & \text{für } x = x_{\text{in}} \\ -c_s(x_{\text{in}}) k_{\text{in}}/D & \text{für } x = x_{\text{out}}. \end{cases} \quad (\text{A.5})$$

Wie in Abbildung A.7 zu sehen, gelten folgende Bezeichnungen:  $c_{\text{IS}} = c_s(x = x_{\text{IS}})$ ,  $c_0 = c_s(x = 0)$ ,  $c_1 = c_s(x = x_{\text{in}})$ ,  $c_2 = c_s(x = x_{\text{out}})$  und  $c_3 = c_s(x = L)$ . Zusätzlich dazu werden die Steigungen der Abschnitte zu  $\Delta_{\text{IS}} = (c_{\text{IS}} - c_0)/x_0$ ,  $\Delta_0 = (c_0 - c_1)/(x_{\text{in}} - x_0)$ ,  $\Delta_1 = (c_2 - c_1)/l$  und  $\Delta_2 = (c_2 - c_3)/(L - x_{\text{out}})$  definiert.

Aus den Randbedingungen (Gleichung A.3)

$$\begin{aligned} \Delta_{\text{IS}} &= k_{\text{CRAC}}/D, \\ \Delta_2 &= c_3 k_{\text{PMCA}}/D, \end{aligned} \quad (\text{A.6})$$

und aus den Sprungbedingungen (Gleichung A.5)

$$\begin{aligned}
 D\Delta_{IS} - D\Delta_0 &= c_0 k_{PMCA_{IS}} \\
 D\Delta_0 + D\Delta_1 &= c_1 k_{in} \\
 D\Delta_1 + D\Delta_2 &= c_1 k_{in} ,
 \end{aligned} \tag{A.7}$$

erhält man direkt  $\Delta_2 = \Delta_0$  was auch bereits in Abbildung A.7 a) angedeutet ist. Das Lösen des Gleichungssystems mit Linearer Algebra liefert die Modell Lösung

$$\begin{aligned}
 \Delta_0 &= \Delta_2 = \frac{k_{CRAC}}{k_{PMCA_{IS}}} \frac{1}{\beta_0 - \beta_1 \gamma_0 / \gamma_1} \\
 \Delta_1 &= \Delta_0 \frac{\gamma_0}{\gamma_1} \\
 \Delta_{IS} &= \frac{k_{CRAC}}{D} \\
 c_3 &= \frac{D}{k_{in}} (\Delta_0 + \Delta_1) + \Delta_1 l - \Delta_0 (L - x_{out}) \\
 c_2 &= \frac{D}{k_{in}} (\Delta_0 + \Delta_1) + \Delta_1 l \\
 c_1 &= \frac{D}{k_{in}} (\Delta_0 + \Delta_1) \\
 c_0 &= \frac{k_{CRAC}}{k_{PMCA_{IS}}} - \Delta_0 \frac{D}{k_{PMCA_{IS}}} \\
 c_{IS} &= c_0 + \frac{k_{CRAC}}{D} x_{in} ,
 \end{aligned} \tag{A.8}$$

wobei

$$\begin{aligned}
 \beta_0 &= x_{in} - x_0 + D/k_{in} + D/k_{PMCA_{IS}} \\
 \beta_1 &= D/k_{in} \\
 \gamma_0 &= -(L - x_{out}) + D/k_{in} - D/k_{PMCA_{IS}} \\
 \gamma_1 &= D/k_{in} + l ,
 \end{aligned}$$

gilt. Die Ergebnisse dieses Modells sind für verschiedene Mitochondrienpositionen  $x_{in}$  und verschiedene Werte des Parameter  $k_{in}$  (Stärke der mitochondrialen  $Ca^{2+}$ -Aufnahme und Freisetzung) in Abbildung A.7 b)-e) gezeigt.

## 2. $Ca^{2+}$ -Diffusion innerhalb der Mitochondrien

Dieses Modell-Szenario ist in Abbildung A.8 dargestellt und die entsprechende Situation wird mathematisch durch folgende Gleichungen beschrieben:

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial c_1(x, t)}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 c_1(x, t)}{\partial x^2} - k_{in} c_1(x_{in}, t) \delta(x - x_{in}) \\
 &\quad + k_{in} c_2(x_{in}, t) \delta(x - x_{out}) , \\
 \frac{\partial c_2(x, t)}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 c_2(x, t)}{\partial x^2} + k_{in} c_1(x_{in}, t) \delta(x - x_{in}) \\
 &\quad - k_{in} c_2(x_{in}, t) \delta(x - x_{out}) ,
 \end{aligned} \tag{A.9}$$

wobei  $c_1$  die  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Zytosol und  $c_2$  die  $Ca^{2+}$ -Konzentration innerhalb der Mitochondrien bezeichnet. Die  $Ca^{2+}$ -Aufnahme der Mitochondrien an der Stelle  $x_{in}$  hängt von der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration an diesem Ort  $c_1(x = x_{in})$  ab. Die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung durch die Mitochondrien an der Position  $x_{out}$  hingegen hängt von der

mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an der Stelle  $c_2(x = x_{\text{out}})$  ab.  
Die Randbedingungen ergeben sich zu

$$\begin{aligned} Dc'_{s1}(x=0) &= \left. \frac{dc_{s1}}{dx} \right|_{x=0} = -k_{\text{CRAC}} \\ Dc'_{s1}(x=L) &= \left. \frac{dc_{s1}}{dx} \right|_{x=L} = -k_{\text{PMCA}}c_{s1}(x=L) \end{aligned} \quad (\text{A.10})$$

$$\begin{aligned} Dc'_{s2}(x=x_{\text{in}}) &= \left. \frac{dc_{s2}}{dx} \right|_{x=x_{\text{in}}} = -k_{\text{in}}c_I \\ Dc'_{s2}(x=x_{\text{out}}) &= \left. \frac{dc_{s2}}{dx} \right|_{x=x_{\text{out}}} = -k_{\text{in}}c_{II} . \end{aligned}$$

Man ist wiederum an der stationären Lösung des Problems  $c_{s1,2}(x) = \lim_{t \rightarrow \infty} c_{1,2}(x, t)$  interessiert. Es gilt  $c''_{s1,2}(x) = 0$  für  $x \neq x_{\text{in}}, x_{\text{out}}$ , was bedeutet, dass  $c_{s1,2}(x)$  stückweise linear (wie in Abbildung A.8 angedeutet) und natürlich stetig ist. An den Stellen  $x = x_{\text{in}}$  und  $x = x_{\text{out}}$  besitzt die zweite Ableitung von  $c_{s1,2}(x)$  einen Delta-Funktions-Anteil

$$\begin{aligned} Dc''_{s1}(x) &= +k_{\text{in}}c_{s1}(x_{\text{in}}, t)\delta(x - x_{\text{in}}) \\ &\quad -k_{\text{in}}c_{s2}(x_{\text{in}}, t)\delta(x - x_{\text{out}}) \\ Dc''_{s2}(x) &= -k_{\text{in}}c_{s1}(x_{\text{in}}, t)\delta(x - x_{\text{in}}) \\ &\quad +k_{\text{in}}c_{s2}(x_{\text{in}}, t)\delta(x - x_{\text{out}}) , \end{aligned} \quad (\text{A.11})$$

was bedeutet, dass die erste Ableitung an folgenden Stellen einen Sprung aufweist

$$\begin{aligned} \Delta c'_{s1}(x_{\text{in}, \text{out}}) &= \begin{cases} c_s(x_{\text{in}})k_{\text{in}}/D & \text{für } x = x_{\text{in}} \\ -c_s(x_{\text{in}})k_{\text{in}}/D & \text{für } x = x_{\text{out}} . \end{cases} \\ \Delta c'_{s2}(x_{\text{in}, \text{out}}) &= \begin{cases} -c_s(x_{\text{in}})k_{\text{in}}/D & \text{für } x = x_{\text{in}} \\ +c_s(x_{\text{in}})k_{\text{in}}/D & \text{für } x = x_{\text{out}} . \end{cases} \end{aligned} \quad (\text{A.12})$$

Mit Hilfe der Randbedingungen (Gleichung A.10) sowie der Sprungbedingungen (Gleichung A.12) erhält man wieder unter Verwendung von ein wenig Linearer Algebra die Modell-Lösung als:

$$\begin{aligned} c_3 &= k_{\text{CRAC}}/k_{\text{PMCA}} \\ c_2 &= k_{\text{CRAC}}/k_{\text{PMCA}} + k_{\text{CRAC}}(L - l - x_{\text{in}})/D \\ c_1 &= \frac{k_{\text{CRAC}}/k_{\text{PMCA}} + k_{\text{CRAC}}(L - x_{\text{in}})/D}{1 + k_{\text{in}}L/D} \\ c_0 &= \frac{k_{\text{CRAC}}/D}{1 + k_{\text{in}}l/D} (L + D/k_{\text{PMCA}} + x_{\text{in}}k_{\text{in}}l/D) \\ c_I &= c_1 \\ c_{II} &= \frac{(D + k_{\text{PMCA}}L - x_{\text{in}})k_{\text{CRAC}}}{k_{\text{PMCA}}D} . \end{aligned} \quad (\text{A.13})$$

Die Ergebnisse dieses Modells sind für verschiedene Mitochondrienpositionen  $x_{\text{in}}$  und verschiedene Werte des Parameter  $k_{\text{in}}$  (Stärke der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und Freisetzung) in Abbildung A.8 b)-e) gezeigt.

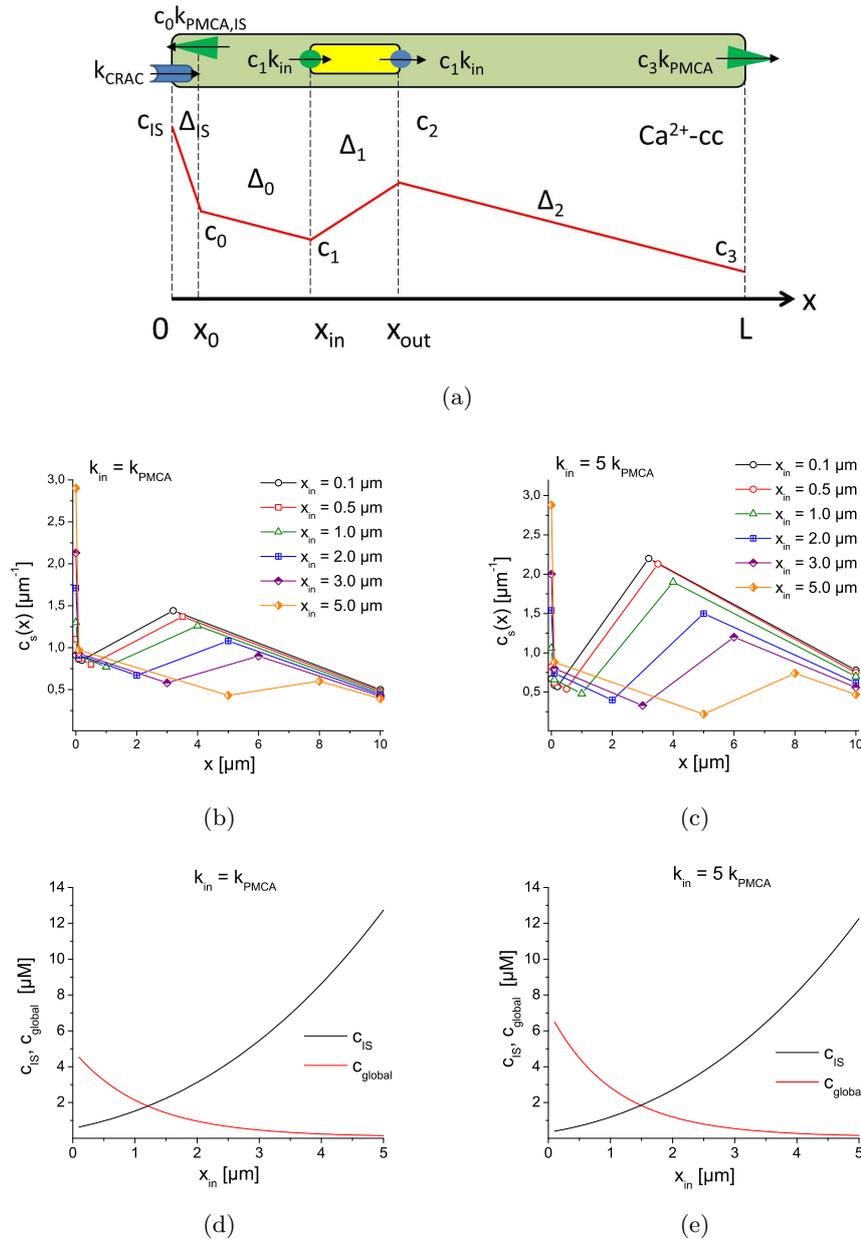
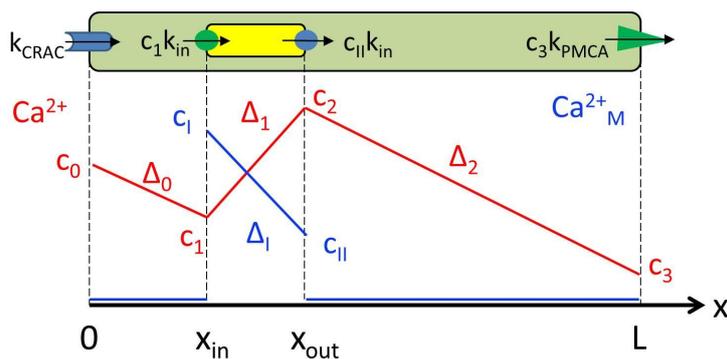
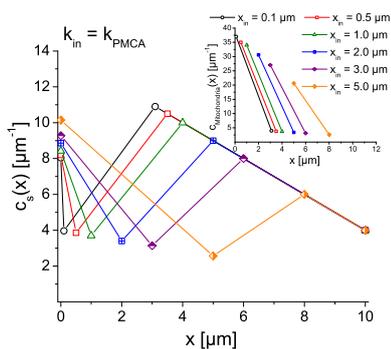


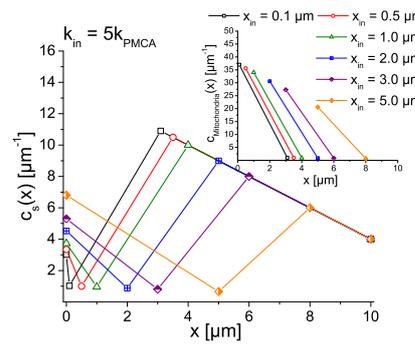
Abbildung A.7: a) **Oben:** Skizze des eindimensionalen Modells: das Zytosol ist hell-grün, die Mitochondrien gelb,  $\text{Ca}^{2+}$ -Quellen (CRAC und Mitochondrien) blau,  $\text{Ca}^{2+}$ -Senken (Mitochondrien und PMCA) grün. **Unten:** Ortsabhängigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die Steigungen der linearen Abschnitte sind durch  $\Delta_0$ ,  $\Delta_1$ , und  $\Delta_2$  gekennzeichnet (Die mathematische Lösung dieses Modells ist in Abschnitt A.2.2 zu finden). Die verwendeten Parameter unterscheiden sich von denen aus Tabelle 6.1 lediglich durch die Mitochondrienlänge  $l = 3 \mu\text{m}$ . b) - c) Stationäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $c_s(x)$  als Funktion von  $x$  für verschiedene Mitochondrienpositionen  $x_{\text{in}}$  und verschiedene mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmeraten  $k_{\text{in}}$ . d) - e) Vergleich der stationären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an der Immunologischen Synapse,  $c_{\text{IS}} = c_0$  und der gemittelten globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $c_{\text{global}}$  als Funktion des Abstandes  $x_{\text{in}}$  zwischen IS und Mitochondrien für verschiedene mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmeraten  $k_{\text{in}}$ .



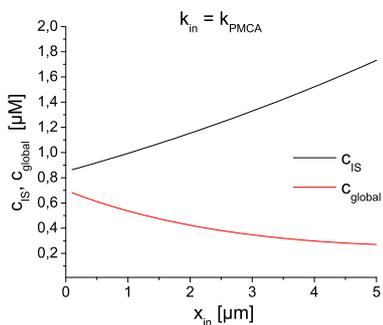
(a)



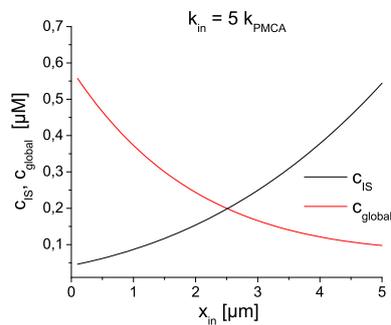
(b)



(c)



(d)



(e)

Abbildung A.8: a) **Oben:** Skizze des 1D-Modells unter Annahme einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Diffusion innerhalb der Mitochondrien: das Zytosol ist hell-grün, die Mitochondrien gelb,  $\text{Ca}^{2+}$ -Quellen (CRAC und Mitochondrien) blau,  $\text{Ca}^{2+}$ -Senken (Mitochondrien und PMCA) grün. **Unten:** Ortsabhängigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (rot, Zytosol; blau, innerhalb der Mitochondrien). Die Steigungen der linearen Abschnitte sind durch  $\Delta_0$ ,  $\Delta_1$ , und  $\Delta_2$  gekennzeichnet (Die math. Lösung dieses Modells ist in Abschnitt A.2.2 zu finden). Die verwendeten Parameter unterscheiden sich von denen aus Tabelle 6.1 lediglich durch die Mitochondrienlänge  $l = 3 \mu\text{m}$ . b) - c) Stationäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $c_s(x)$  als Funktion von  $x$  für verschiedene Mitochondrienpositionen  $x_{\text{in}}$  und verschiedene mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmeraten  $k_{\text{in}}$ . d) - e) Vergleich der stationären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an der Immunologischen Synapse,  $c_{\text{IS}} = c_0$  und der gemittelten globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $c_{\text{global}}$  als Funktion des Abstandes  $x_{\text{in}}$  zwischen IS und Mitochondrien für verschiedene mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmeraten  $k_{\text{in}}$ .

### A.2.3 3D-T-Zell Würfelgeometrie. Effekt der Randbedingung und des Wettbewerbs

Die Erhöhung der globalen Calciumkonzentration in T-Zellen ist das Zusammenspiel zweier verschiedener Mechanismen, die beide von der räumlichen Anordnung der Zellorganellen abhängen, und die sich im Falle der T-Zell-Polarisierung additiv verstärken. Der erste Mechanismus ist der Effekt der Randbedingung, der in Kapitel 6.3 im Rahmen des 1D Random Walk Modells ausführlich diskutiert wird. Er sorgt dafür, dass die globale Calciumkonzentration umso höher ist, je größer die Entfernung zwischen dem Ort der Calcium-Freisetzung durch die Mitochondrien und der Position der absorbierenden PMCA-Pumpen ist. Der zweite Mechanismus zeigt sich als der Wettbewerb zwischen den Mitochondrien und den PMCA-Pumpen um das durch den CRAC-Kanal einströmende Calcium. Gewinnen die Mitochondrien diesen Wettbewerb, wird mehr Calcium ins Zytosol umverteilt; gewinnen die PMCA-Pumpen, wird mehr Calcium direkt wieder in den extrazellulären Raum nach außen abgepumpt. Es gibt zwei Faktoren, die den Ausgang dieses Wettstreits beeinflussen. Dies ist zum einen das Verhältnis der Calciumaufnahme-raten von Mitochondrien und PMCA-Pumpen. Zum anderen ist dies der Abstand zwischen Mitochondrien und CRAC-Kanal. Die Mitochondrien werden begünstigt, wenn sie sich näher an der IS befinden als die PMCA-Pumpen und genauso umgekehrt. Um meine Aussage, dass diese beiden Effekte im 3D-Modell gemeinsam zur Erhöhung der globalen Calciumkonzentration beitragen, zu überprüfen und zu visualisieren habe ich ein vereinfachtes 3D-T-Zell Modell untersucht. Als Modellgeometrie habe ich die in Abbildung A.9 zu sehende Würfelgeometrie gewählt, die ein Volumen von  $(8 \mu\text{m})^3$  besitzt. Ich nehme an, dass 50% der PMCA-Pumpen in einem Band in der x-y Ebene (blaue Fläche in Abbildung A.9) akkumuliert sind. Dieses Band besitzt eine Höhe bzw. z-Ausdehnung von  $1 \mu\text{m}$ . Die restlichen 50% der PMCA-Pumpen sind wiederum homogen in der Zellmembran verteilt. Des Weiteren modelliere ich keinen Zellkern sowie keinen mobilen Calcium-Puffer im Zytosol und betrachte nur ein einziges großes, zylinderförmiges Mitochondrium mit Radius  $r_{\text{Mito}} = 1 \mu\text{m}$ . Das Mitochondrium ist während der Simulationen stationär bzw. immobil und befindet sich in einem „optimalen“ Abstand von  $0,1 \mu\text{m}$  zu dem CRAC-Kanal-Cluster. Alle Modellgleichungen und Modellparameter sind äquivalent zu dem in Kapitel 6.4 vorgestellten 3D Base-Case Szenario gewählt. Lediglich die beiden Parameter für die PMCA-Pumpstärke mussten auf die neue Geometrie angepasst werden und sind im Vergleich zu der Standardkonfiguration abgeändert.

Anstatt die Calcium-Signale in Abhängigkeit der Mitochondrien-Position zu untersuchen, möchte ich mit Hilfe dieser Modellgeometrie den Einfluss der PMCA-Pumpenposition studieren und das Zusammenspiel der beiden oben beschriebenen Mechanismen aufzeigen. Dazu habe ich in meinen Computersimulationen die stationäre Calciumkonzentration in Abhängigkeit der PMCA-Pumpenposition  $z_{\text{PMCA}}$  (siehe Abbildung A.9) berechnet. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Abbildung A.9 b) zu sehen. Der dort abgebildete Verlauf bestätigt die von mir oben formulierte These, dass die beiden Mechanismen sich additiv verstärken. Für kleine Werte von  $z_{\text{PMCA}}$  ist die globale Calciumkonzentration maximal, nimmt dann für größere Abstände der PMCA-Pumpen zum CRAC-Kanal ab, bis die globale Calciumkonzentration ihr Minimum schließlich

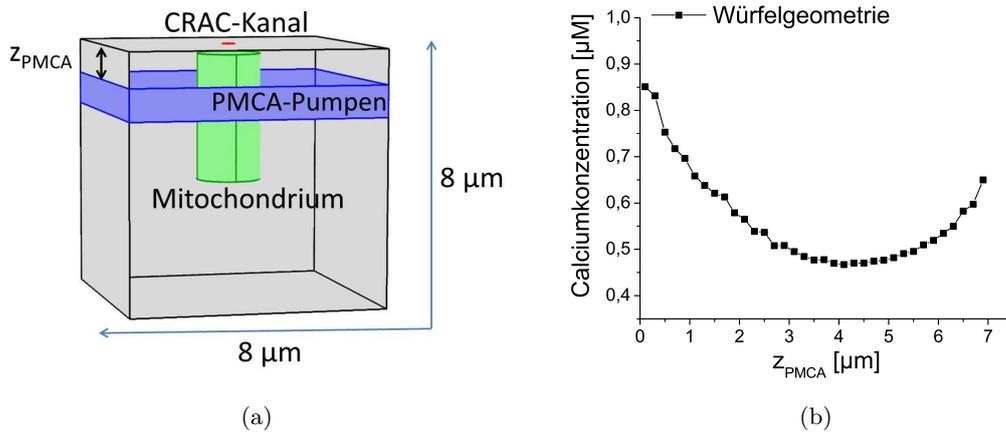


Abbildung A.9: Dreidimensionales T-Zell Modell und Einfluss der PMCA-Pumpenposition. a) Modellgeometrie des hier vorgestellten Systems, mit dessen Hilfe der Einfluss der PMCA-Pumpenposition auf die globalen Calcium-Signale untersucht wird. PMCA-Pumpen sind blau, das CRAC-Kanal Cluster rot, das Mitochondrium grün und der Abstand zwischen den PMCA-Pumpen und der oberen Würfelfläche wird als  $z_{PMCA}$  bezeichnet. Folgende Parameter unterscheiden sich von den Werten der Standardkonfiguration aus Kapitel 6.4:  $k_{PMCA} = 1 \cdot 10^{-7} [mol/(m^2s)]$ ,  $A_{PM}/A_{Band} = 70$ ,  $A_M = 3 \cdot 10^{-12} m^2$ . b) Globale Calciumkonzentration als Funktion des Abstands der PMCA-Pumpen zur oberen Würfelfläche,  $z_{PMCA}$ .

bei einem Wert von ca.  $z_{PMCA} = 4 \mu m$  erreicht. Bei weiterer Erhöhung des Abstandes der PMCA-Pumpen zur oberen Würfelfläche steigt das globale Calcium-Signal wieder an.

Diese Abhängigkeit der globalen Calciumkonzentration von der Position der PMCA-Pumpen-Akkumulation kann man sich anhand der Modellgeometrie wie folgt klar machen: Das immobile Mitochondrium nimmt einströmendes Calcium auf und lässt es in der Mitte der Zelle an der Position  $z = 4 \mu m$  wieder ins Zytosol frei. Der Abstand der PMCA-Pumpen zum Ort der Calcium-Freisetzung durch das Mitochondrium ist zweimal maximal: nämlich dann, wenn sich die PMCA-Pumpen ganz oben oder ganz unten in der Zelle befinden, also für  $z_{PMCA} = 0, 1 \mu m$  bzw.  $z_{PMCA} = 7 \mu m$ . Zunächst, für sehr kleine Werte von  $z_{PMCA}$ , sind die beiden Effekte (Wettbewerb zwischen Mitochondrium und PMCA-Pumpen und Effekt der Randbedingung) maximal. Das Mitochondrium befindet sich nahe am CRAC-Kanal und gewinnt dort den Wettbewerb gegen die PMCA-Pumpen; gleichzeitig ist der Abstand zwischen der Position der Calcium-Freisetzung durch die Mitochondrien und den PMCA-Pumpen maximal. Verschiebt man nun das Band der PMCA-Pumpenakkumulation in negative  $z$ -Richtung, so wirkt sich der Effekt der Randbedingung immer weniger stark auf eine Erhöhung der Calciumkonzentration aus. Der Grund dafür ist, wie in Kapitel 6.3 gezeigt wird, dass sich die PMCA-Pumpen

in Richtung der Zellmitte bewegen und somit der Abstand zwischen der Position der Calcium-Freisetzung und der Position der PMCA-Pumpen verringert wird. Der Effekt des Wettbewerbs ist weiterhin vorhanden, wird aber auch kleiner, da das Mitochondrium immobil ist und die PMCA-Pumpen nun das vom Mitochondrium umverteilte Calcium aufnehmen und heraus transportieren können. Die Erhöhung der globalen Calciumkonzentration durch die beiden Effekte wird immer schwächer, bis sie schließlich bei einem Wert von ca.  $z_{PMCA} = 4 \mu m$  minimal ist. In diesem Fall sind die PMCA-Pumpen genau dort lokalisiert, wo das durch das Mitochondrium aufgenommene Calcium ins Zytosol abgegeben wird. Die globale Calciumkonzentration nimmt in Abhängigkeit von  $z_{PMCA}$  ihr Minimum an. Verschiebt man die PMCA-Pumpen weiter in negativer  $z$ -Richtung, so wird der Einfluss des Wettbewerbs zwischen PMCA-Pumpen und Mitochondrium weiterhin kleiner. Im Gegensatz dazu vergrößert sich aber der Einfluss des Effekts der Randbedingung, da der Abstand der PMCA-Pumpen zum Ort der Calcium-Freisetzung ansteigt. Damit verbunden steigt die globale Calciumkonzentration wieder an, bis sie bei einem maximal möglichen Wert  $z_{PMCA} = 7 \mu m$  ein lokales Maximum erreicht. Jedoch ist gut zu erkennen, dass der Wert der Calciumkonzentration für  $z_{PMCA} = 7 \mu m$  nicht so hoch ist, wie das anfängliche Maximum bei  $z_{PMCA} = 0,1 \mu m$ . Dafür verantwortlich ist, dass der Mechanismus des Wettbewerbs zwischen Mitochondrium und PMCA-Pumpen in einen Fall maximal, im anderen Fall minimal ist. Insgesamt tragen beide Effekt also maximal zur Erhöhung der globalen Calciumkonzentration an der Position  $z_{PMCA} = 0,1 \mu m$  bei, weshalb dort das globale Maximum der Kurve zu finden ist.

#### A.2.4 2D-T-Zell Modell: Stationäre zytosolische Calciumkonzentration für verschiedene Mitochondriennetzwerke

Um zu verdeutlichen, wie sich die Struktur des Mitochondriennetzwerkes auf die globalen Calcium-Signale auswirkt, ist hier die stationäre Calciumkonzentration für neun unterschiedliche Mitochondriennetzwerke abgebildet. Die für diese neun Netzwerke resultierenden Calciumkonzentrationen wurden in Kapitel 6.5 des Hauptteils untersucht und diskutiert; die Resultate sind in Abbildung 6.20 b) des Hauptteils dargestellt. Die in Abbildung A.10 gezeigten stationären räumlichen Konzentrationsprofile haben alle gemeinsam, dass der geringste Abstand des Netzwerkes zur Immunologischen Synapse  $y_{Mito}$   $0,1 \mu m$  beträgt. Obwohl der Abstand  $y_{Mito}$  für alle neun Geometrien gleich ist, kann man gut erkennen, wie es die verschiedenen Strukturen mal gut, mal weniger gut schaffen, das durch den CRAC-Kanal einströmende Calcium, im Zytosol zu verteilen. Je besser sie diese Umverteilung bewerkstelligen, umso stärker ist das sich einstellende stationäre, globale Calcium-Signal  $c_{Gesamt}$  (vgl. Abbildung 6.20 b)).

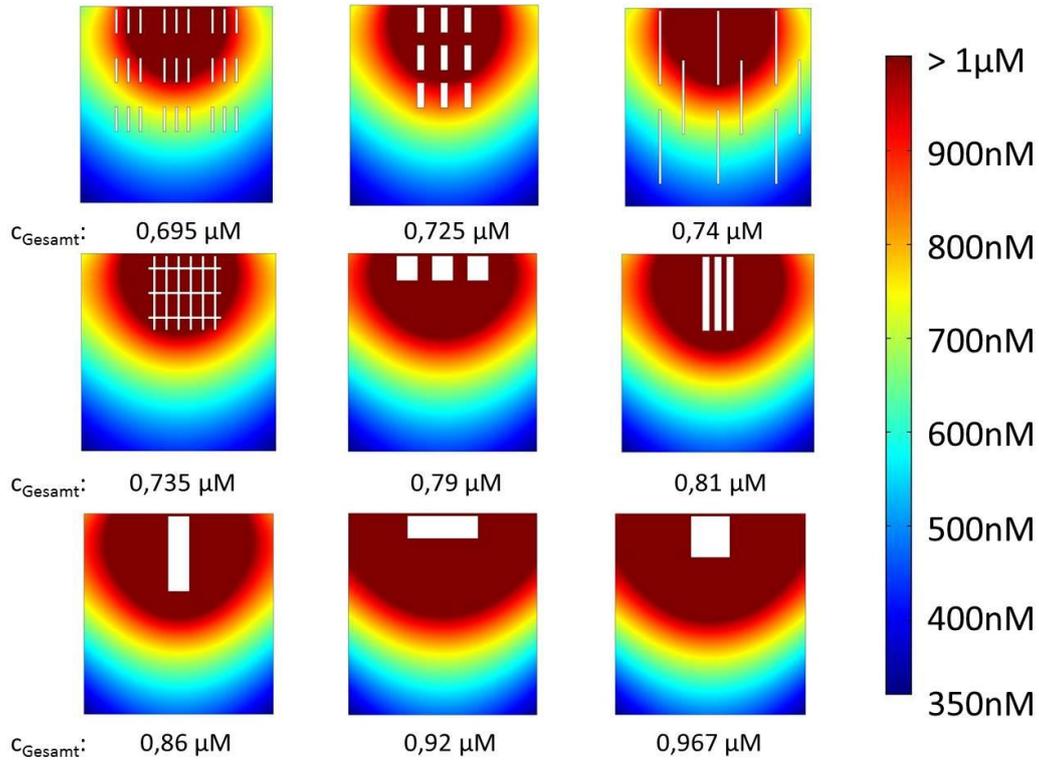


Abbildung A.10: Stationäre Calciumkonzentration für verschiedene Mitochondriennetzwerke, die mit Hilfe des 2D-Modells aus Abschnitt 6.5 berechnet wurden. Die hier abgebildeten Konzentrationsverläufe entsprechen den Mitochondriennetzwerken aus Abbildung 6.20 b) des Hauptteils. Die weißen Flächen deuten die Positionen der Mitochondriennetzwerke an, die Farbverläufe die Stärke der räumlichen Calciumkonzentration. Der Farbcode der Konzentration entspricht der rechts gezeigten Skala, die von 350 nM bis  $1 \mu\text{M}$  reicht. Alle Konzentrationen die höher als  $1 \mu\text{M}$  sind, wurden zur besseren Übersicht nicht aufgelöst, und sind dunkelrot dargestellt.  $c_{\text{Gesamt}}$  gibt die gemittelte zytosolische Calciumkonzentration an.

# Danksagung

- Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heiko Rieger, der mir dieses interessante Thema vorgestellt hat. Herr Prof. Rieger war jederzeit bereit, die auftauchenden Probleme und Fragestellungen in sehr angenehmer Arbeitsatmosphäre mit mir zu diskutieren.
- Ganz besonders hervorheben möchte ich den Dank an meine Frau Nadine. Ich danke ihr für die bedingungslose seelische und moralische Unterstützung während meiner Promotion und für das größte Geschenk meines Lebens: unseren Sohn Ben.
- Ich danke meinen Eltern Gerd und Monika Peglow. Ich hatte stets ihr Vertrauen und die Gewissheit ihrer bedingungslosen Unterstützung.
- Danken möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heiko Rieger. Besonderer Dank gilt meinen Freunden André Winter, Karsten Schwarz, Nicolas Lorscheid, Christian Thome sowie Michael Welter, die jederzeit bereit waren, mir bei auftretenden Problemen zu helfen.
- Danken möchte ich auch den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Markus Hoth, Prof. Dr. Peter Lipp, Dr. Barbara Niemeyer und Dr. Christine Peinelt für die fruchtbare und angenehme Kooperation. An dieser Stelle möchte ich auch Mike Bonny aus der AG Kruse für die tolle Zusammenarbeit danken.
- Ausserdem möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Graduiertenkolleg 1276 „Strukturbildung und Transport in komplexen Systemen“ und dem Sonderforschungsbereich 1027 „Physical modeling of non-equilibrium processes in biological systems“ für die sowohl finanzielle Unterstützung bedanken als auch für die Möglichkeit mich als Forscher und Mensch weiterzuentwickeln.
- Last but not least geht mein Dank auch an Frau Susanne Balzert, die Sekretärin und gute Seele der Arbeitsgruppe Rieger. Danke für die vielen kleinen Dinge, die ich sehr zu schätzen weiß.