

Räumliche Aspekte intrazellulärer Signalübertragung und Musterbildung in der Glykolyse

H A B I L I T A T I O N S S C H R I F T

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium habilitatus

(Dr. rer. nat. habil.)

genehmigt durch die

Fakultät für Naturwissenschaften

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dr. rer. nat. Ronny Straube

geb. am 17. September 1975 in Borna

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Klaus Kassner

Prof. Dr. rer. nat. habil. Karsten Kruse

Prof. Dr. rer. nat. habil. Holger Stark

Magdeburg, den 01. Juni 2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	iii
1 Allgemeine Einleitung	1
2 Räumliche Aspekte Intrazellulärer Signalübertragung	5
2.1 Klassifikation intrazellulärer Signalgradienten	5
2.1.1 Einleitung und Aufgabenstellung	5
2.1.2 Diskussion der wichtigsten Ergebnisse	6
2.2 Reaktionsrate auf einer zylindrischen Membran	8
2.2.1 Einleitung und Aufgabenstellung	8
2.2.2 Diskussion der wichtigsten Ergebnisse	9
2.3 Oberflächendiffusion von Rezeptormolekülen in der Gegenwart teilweise absorbierender Gebiete	11
2.3.1 Einleitung und Aufgabenstellung	11
2.3.2 Diskussion der wichtigsten Ergebnisse	12
2.4 Mittlere Verweilzeit in einer Kugel mit kleinen Austrittslöchern auf der Oberfläche	14
2.4.1 Einleitung und Aufgabenstellung	14
2.4.2 Diskussion der wichtigsten Ergebnisse	15
3 Musterbildung in der Glykolyse: Einwärts Rotierende Spiralwellen	17
3.1 Einleitung und Aufgabenstellung	17
3.2 Diskussion der wichtigsten Ergebnisse	18
Literaturverzeichnis	21
Zusammenfassung	29
Danksagung	31
Liste relevanter Publikationen	33

Abkürzungsverzeichnis

ADP Adenosindiphosphat

ATP Adenosintriphosphat

kGLG komplexe Ginzburg-Landau Gleichung

ER endoplasmatisches Retikulum

FRET Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

IP₃R Inositol-1,4,5-Triphosphat Rezeptor

MWC Monod-Wyman-Changeux

PFK Phosphofruktokinase

1 Allgemeine Einleitung

Gegenstand der vorliegenden Arbeiten ist die mathematische Analyse von räumlichen Transportprozessen und raum-zeitlicher Musterbildung in unterschiedlichen biologischen oder biologisch motivierten Systemen auf der Basis von Reaktions-Diffusionsgleichungen der Form

$$\partial_t u = D \Delta_x u + f(u, p). \quad (1.1)$$

In den hier beschriebenen Anwendungen wird u entweder die raum-zeitliche Konzentration einer einzigen ($u \in \mathbb{R}$) oder zweier verschiedener ($u \in \mathbb{R}^2$) Molekülsorten bezeichnen. Im letzteren Fall werden wir die beiden Komponenten $u = (u_I, u_A)$ mit dem Inhibitor (I) und dem Aktivator (A) einer enzymatisch katalysierten Reaktion identifizieren. Die Anzahl der das System charakterisierenden Parameter p in (1.1) ist a priori nicht beschränkt und hängt von der jeweiligen Anwendung ab. Die Stärke der diffusiven Kopplung wird durch die Diffusionsmatrix D beschrieben, welche im Falle $u \in \mathbb{R}$ eine positive reelle Zahl ist. Falls (1.1) ein Aktivator-Inhibitor-System beschreibt, werden wir vereinfachend annehmen, dass D eine Diagonalmatrix $D = \text{diag}(D_I, D_A)$ ist, wobei D_I und D_A die (effektiven) Diffusionskoeffizienten von Inhibitor und Aktivator bezeichnen.

Als Alan Turing im Jahre 1952 seinen mittlerweile berühmten Aufsatz mit dem Titel „The Chemical Basis of Morphogenesis“¹ verfasste [76], konnte noch niemand ahnen, dass sich daraus in der Folgezeit ein neuartiger wissenschaftlicher Forschungszweig – Die Strukturbildung in Nichtgleichgewichts-Systemen – entwickeln würde [33, 38, 53, 58, 62]. Er zeigte, wie ein räumlich homogener, stationärer Zustand durch diffusive Kopplung einer autokatalytischen chemischen Reaktionen destabilisiert werden kann, sodass sich ein räumlich inhomogener, aber zeitlich weiterhin stationärer Zustand einstellt. Die so entstehenden Muster wollte er mit ähnlichen, in der Natur auftretenden Strukturen in Verbindung bringen und somit zum Beispiel das Phänomen der Morphogenese erklären. Turing’s Ideen wurden später von Gierer und Meinhardt aufgegriffen [22] und in Anwendung auf verschiedene biologische Systeme fortgeführt [51]. Dabei spielte das von ihnen propagierte Aktivator-Inhibitor-Prinzip eine grosse Rolle [52] wonach Turing-Muster durch Kombination einer autokatalytischen Reaktion mit einem lang-reichweitigen Inhibierungsmechanismus entstehen können.

In Reaktions-Diffusions-Systemen können neben stationären Turing-Mustern auch eine Vielzahl von Wellenmustern generiert werden (Abbildung 1.1A), die in erster Linie von der Art der nichtlinearen Kinetik $f(u, p)$ in Gleichung (1.1) abhängen. Viele dieser Wellenmuster konnten experimentell sowohl in chemischen [36, 45, 55] als auch in biologischen Systemen [18, 46, 50] beobachtet werden. Demgegenüber wurden Turing-Muster zunächst nur in rein chemischen Systemen gefunden [13, 60]. Das lag zum Teil daran,

¹Die chemische Grundlage der Morphogenese

1 Allgemeine Einleitung

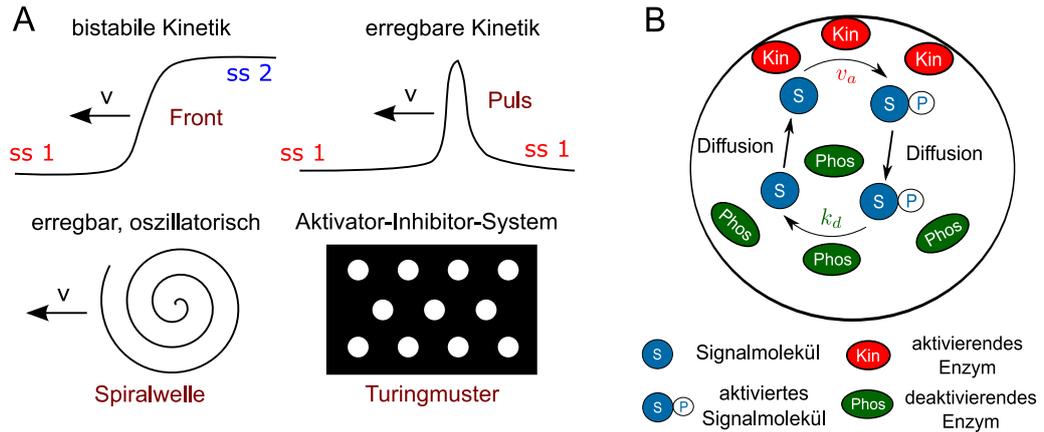


Abbildung 1.1: Musterklassifikation in Reaktions-Diffusions-Systemen mit nichtlinearer Kinetik (A) und Entstehung von intrazellulären Konzentrationsgradienten durch räumliche Segregation von Enzymen (B).

dass es nicht so einfach war, die Forderung nach einer lang-reichweitigen Inhibierung, z.B. durch einen schnell diffundierenden Inhibitor einer autokatalytischen Reaktion, experimentell zu realisieren. Inzwischen hat man in chemischen Systemen verschiedene Wege gefunden, dieses Problem zu lösen [32]; etwa durch Zusatz eines Reagents, welches den Aktivator bevorzugt bindet und dadurch dessen effektiven Diffusionskoeffizient drastisch herab setzt. In biologischen Systemen ist es bisher nicht gelungen Turing-Muster *in vitro*, d.h. unter kontrollierten Bedingungen, zu erzeugen. Es gibt aber erste Hinweise auf molekulare Systeme in lebenden Zellen, welche die Anforderungen zur Ausbildung von Turing-Strukturen erfüllen [56, 69].

Trotz dieser ersten Erfolge bleibt es weiterhin fraglich, ob und in welcher Form der Turing-Mechanismus als allgemeines Prinzip der Musterbildung auf zellulärer Ebene gelten kann, da die Forderung nach einem räumlich homogenen stationären Zustand, aus dem heraus Turing-Muster entstehen sollen, in Zellen nur selten erfüllt ist. Vielmehr spielt die Kompartimentierung eukaryotischer Zellen und die damit verbundene Segregation antagonistischer Enzyme, wie in Abbildung 1.1B gezeigt, eine wichtige Rolle für die Funktionalität zellulärer Signalverarbeitungssysteme [40, 41]. So werden Signale oft lokal erzeugt oder über in Clustern organisierte, membranständige Rezeptormoleküle ins Zellinnere weiter geleitet, um an anderer Stelle wieder abgebaut zu werden. Diese Segregation kann selbst in linearen Reaktionssystemen zur Ausbildung räumlicher Gradienten führen, die hier allein über die Randbedingungen induziert werden [11]. Im Gegensatz dazu ist für das Entstehen raum-zeitlicher Muster in „klassischen“ Reaktions-Diffusions-Systemen (1.1) eine nichtlineare Reaktionskinetik erforderlich. Beide Arten der Strukturbildung werden in der vorliegenden Arbeit untersucht und es ist davon auszugehen, dass beide Mechanismen auch in lebenden Zellen eine Rolle spielen.

Aus mathematischer Sicht führt die Beschreibung zellulärer Transport- und Signaltransduktionsprozesse oftmals auf Reaktions-Diffusionsgleichungen in singular gestörten

Gebieten (Gebiete mit kleinen Löchern im Inneren oder auf dem Rand). Das können zum Beispiel Cluster auf der Zelloberfläche, Poren in der Zellmembran oder intrazelluläre Kompartimente sein, an deren Oberfläche Enzyme lokalisiert sind. Die entsprechenden partiellen Differentialgleichungen sind dann durch entsprechende Bedingungen am Rand der Löcher zu ergänzen. Biologisch motivierte Fragestellungen dieser Art werden im ersten Kapitel *Räumliche Aspekte intrazellulärer Signalübertragung* der vorliegenden Arbeit diskutiert. Die dort besprochenen Probleme führen auf einfache lineare Reaktions-Diffusionsgleichungen. Allerdings sind diese auf singular gestörten Gebieten formuliert, was eine explizite Lösung unmöglich macht. In praktischen Anwendungen sind die Löcher aber immer klein gegenüber zellulären Abmessungen wie dem Zellradius, sodass approximative Lösungen durch asymptotische Methoden gewonnen werden können. Auf diese Weise erhält man explizite Ausdrücke für biologisch relevante Größen in komplizierteren Zell-Geometrien, welche sonst nur durch aufwendige numerische Berechnungen zu bekommen wären. Speziell verwenden wir die Theorie der zur Übereinstimmung gebrachten asymptotischen Entwicklungen („matched asymptotic expansions“), welche ursprünglich zur Lösung hydrodynamischer Probleme entwickelt [39], später aber für singular gestörte Gebiete angepasst wurde [83, 84].

Im zweiten Kapitel *Musterbildung in der Glykolyse* untersuchen wir den molekularen Mechanismus, der zur Ausbildung sogenannter einwärts rotierender Spiralwellen in der Glykolyse führt. Solche Wellen wurden als glykolytische Aktivitätsmuster experimentell in Hefezell-Extrakten beobachtet [A6]. Damit gehört dieses System zum Bereich der „klassischen“ Reaktions-Diffusions-Systeme (Abbildung 1.1A) mit einer oszillatorischen lokalen Kinetik. Die explizite Analyse der das System beschreibenden nichtlinearen partiellen Differentialgleichungen ist im allgemeinen wesentlich schwieriger als die Analyse gut durchmischter Systeme, welche durch gewöhnliche Differentialgleichungen beschrieben werden und für die man eine Reihe von Netzwerk-Topologien kennt, die ein bestimmtes nichtlineares Verhalten, wie Bistabilität oder Oszillationen, hervor rufen können [59, 77]. Für diffusiv gekoppelte Reaktionssysteme kennt man hauptsächlich die in Abbildung 1.1A gezeigte, recht grobe Klassifikation bezüglich der lokalen Kinetik. Demgegenüber weiss man nur sehr wenig wie sich molekulare Details eines bestimmten Reaktionsmechanismus auf die musterbildenden Eigenschaften eines Systems auswirken können. Eine gangbare Strategie für die systematische Untersuchung dieser Fragestellung ist die Normalformanalyse in der Nähe einer raum-zeitlichen Instabilität, wo die Dynamik des Systems durch wesentlich einfacher zu untersuchende Amplitudengleichungen beschrieben wird [33, 62]. Die Schwierigkeit in der Modellierung liegt dann darin, einen biologisch interpretierbaren Reaktionsmechanismus zu konstruieren, der einfach genug ist, um die in den Amplitudengleichung auftretenden Parameter explizit berechnen und diese anschließend zu den entstehenden Mustern in Beziehung setzen zu können.

Die Beiträge der Habilitationsarbeit werden in einzelnen, den Kapiteln zugehörigen Abschnitten vorgestellt. Jeder Abschnitt wird themenspezifisch durch einen Unterabschnitt *Einleitung und Aufgabenstellung* motiviert. Daran anschließend erfolgt jeweils die Darstellung und Diskussion der wichtigsten Ergebnisse. Die für die Arbeit relevanten Publikationen sind im letzten Kapitel aufgelistet und werden mit [A1], [A2], usw. im laufenden Text zitiert.

2 Räumliche Aspekte Intrazellulärer Signalübertragung

2.1 Klassifikation intrazellulärer Signalgradienten

2.1.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Lebende Zellen müssen ständig ihre Umgebung „im Auge“ behalten, um adäquat auf Änderungen extrazellulärer Bedingungen reagieren zu können. Dies geschieht mit Hilfe spezialisierter, die Zellmembran durchspannender Rezeptor-Proteine. Diese besitzen eine in den extrazellulären Bereich gerichtete Empfänger-Domäne, welche eine oder mehrere Bindungsstellen für entsprechende Signalmoleküle der Umgebung besitzen. Die Bindung eines Liganden bewirkt dann zum Beispiel eine Autophosphorylierung des Rezeptor-Proteins an seiner ins Zellinnere gerichteten Transmitter-Domäne, wodurch diese aktiviert wird. In der Folge werden unter Verbrauch von ATP eine oder mehrere Phosphatgruppen auf im Zellinneren befindliche Moleküle übertragen, die dadurch ebenfalls aktiviert werden und somit das extrazelluläre Signal in das Zellinnere weiterleiten. Im einfachsten Fall steuern die so aktivierten Signalmoleküle unmittelbar die Expression entsprechender Gene. Die daraufhin synthetisierten Proteine stellen dann gewissermaßen die „Antwort“ der Zelle auf den ursprünglichen Umweltreiz dar.

Bereits vor über zehn Jahren zeigten Brown und Kholodenko in einem einfachen (sphärisch-symmetrischen) Modell, dass die räumliche Segregation aktivierender und inaktivierender Enzyme zur Ausbildung räumlicher Konzentrationsgradienten der aktivierten Form der Signalmoleküle führen kann [11]. Sie vermuteten, dass die so entstehenden Konzentrationsunterschiede zu einer Schwellwert-basierten Steuerung weiterer Prozesse in der Zelle genutzt werden könnte. In der Folge konnten solche Konzentrationsgradienten mit Hilfe von FRET¹-Techniken experimentell nachgewiesen werden [14, 37, 42] und es ist damit zu rechnen, dass die räumliche Dimension der intrazellulären Signalverarbeitung in der Zukunft weiter an Bedeutung gewinnen wird. Dazu haben wir das in [11] untersuchte Problem auf den Fall N intrazellulärer Kompartimente erweitert (Abbildung 2.1). An der Oberfläche eines jeden Kompartiments seien aktivierende Enzyme (z.B. Kinasen) lokalisiert während im Zytosol das deaktivierende Enzym (z.B. Phosphatase) homogen verteilt ist. Wir interessieren uns dann für die stationäre Konzentrationsverteilung aktivierter Signalmoleküle im Zytosol.

Mathematisch lässt sich das Problem durch das folgende (dimensionslose) Randwert-

¹Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

problem beschreiben [A3]

$$\Delta u = \alpha^2 u, \quad x \in \Omega_1 \setminus \Omega_\varepsilon \quad (2.1)$$

$$\partial_{\hat{n}} u = 0, \quad x \in \partial\Omega_1 \quad (2.2)$$

$$\varepsilon \partial_{\hat{n}} u = v_{aj}(u), \quad x \in \partial\Omega_{\varepsilon\rho_j}, \quad j = 1, \dots, N. \quad (2.3)$$

Hierbei bezeichnet $\Omega_\varepsilon \equiv \cup_{j=1}^N \Omega_{\varepsilon\rho_j}$ die Vereinigung aller N Kompartimente, sodass $\Omega_1 \setminus \Omega_\varepsilon$ in (2.1) dem zytosolischen Bereich entspricht. Der Normalenvektor \hat{n} zeigt ins Äußere dieses Gebietes, also insbesondere ins Innere der Kompartimente (Abbildung 2.1).

Für die Rate, mit der Signalmoleküle lokal aktiviert werden, betrachten wir die zwei Spezialfälle einer Michaelis-Menten-Reaktionskinetik

$$v_{aj}(u) = \begin{cases} \sigma_j, & \text{(A)} \\ \kappa_j(1-u), & \text{(B)} \end{cases} \quad x \in \partial\Omega_{\varepsilon\rho_j}, \quad j = 1, \dots, N. \quad (2.4)$$

Die mit (A) gekennzeichnete Rate entspricht einem gesättigten Enzym. Hier ist die Substratkonzentration (Konzentration nicht aktivierter Moleküle) wesentlich höher als die Michaelis-Menten-Konstante des Enzyms, sodass die Signalmoleküle mit konstanter Rate aktiviert werden. In dem mit (B) bezeichneten Fall ist die Substratkonzentration wesentlich geringer als die Michaelis-Menten-Konstante, sodass die Aktivierungsrate proportional zur Konzentration nicht aktivierter Moleküle ist.

Das Randwertproblem (2.1)-(2.3) enthält drei natürliche Längenskalen. Zum einen wird die Diffusionslänge des aktivierten Signalmoleküls $\lambda_D = \sqrt{D/k_d}$ mit dem Zellradius R in der sogenannten Damköhlerzahl $\alpha = R/\lambda_D$ verglichen. Zum anderen spielt das Verhältnis $\varepsilon = r/R$ zwischen dem Radius r des größten intrazellulären Kompartiments und dem Zellradius R die Rolle eines kleinen Parameters. Der Zellkern ist typischerweise das größte intrazelluläre Kompartiment in eukaryotischen Zellen mit einem Radius von einem Zentel des Zellradius, d.h. $\varepsilon \leq 0.1$. Allgemein lassen wir durch die Definition $r_j = \varepsilon\rho_j R$ unterschiedliche Radien der Kompartimente zu wobei die Zahlen $\rho_j \leq 1$ sind. Bei der Ableitung von Gleichung (2.1) wurde angenommen, dass der Diffusionskoeffizient D des aktivierten Moleküls gleich dem des nicht-aktivierten Moleküls ist. Weiterhin wurde angenommen, dass die Deaktivierung des Signalmoleküls durch ein zytosolisches Enzym proportional zur Konzentration aktivierter Signalmoleküle erfolgt.

2.1.2 Diskussion der wichtigsten Ergebnisse

Mit Hilfe asymptotischer Analysen haben wir drei Skalenbereiche für die beiden Parameter α und ε identifiziert [A3], die zu qualitativ unterschiedlichem Verhalten der stationären Konzentrationsprofile führen (Tabelle 2.1). Neben dem bereits bekannten exponentiell abfallenden Konzentrationsprofil (Regime 2) [11, 40] gibt es zwei weitere interessante Fälle. Im Bereich $R \leq \lambda_D \leq R/\sqrt{\varepsilon}$ (Regime 1) ist die Diffusionslänge des Signalmoleküls größer als der Zellradius. In diesem Bereich fallen die Konzentrationsprofile algebraisch ab, wodurch lang-reichweitige Signalübertragung ermöglicht wird

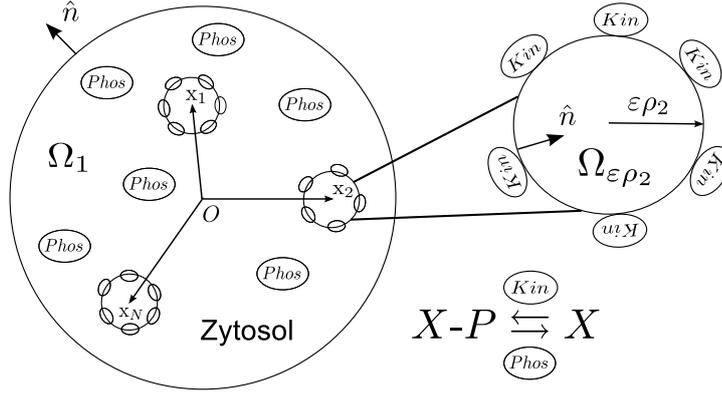


Abbildung 2.1: Zur Entstehung intrazellulärer Signalgradienten beschrieben durch (2.1)-(2.4). Das Signalmolekül X wird durch die Kompartiment lokalisierte Kinase aktiviert ($X-P$) und durch eine zytosolische Phosphatase wieder deaktiviert.

[A3] und [3]. Im Extremfall $\lambda_D \geq R/\sqrt{\varepsilon}$ ist die Konzentration des aktivierten Signalmoleküls annähernd konstant im Zellinneren, sodass eine vereinfachte Beschreibung der Systemdynamik durch gewöhnliche Differentialgleichungen gerechtfertigt ist. Im anderen Grenzfall, wenn die Diffusionslänge vergleichbar mit der Größe der Kompartimente wird (Regime 3), fallen die Lösungen auf einer Längenskala von $1/\alpha = \varepsilon/\alpha_2$ mit $\alpha_2 = O(1)$ ab, sodass der Einfluss der Randbedingung (2.2) verschwindet. Konsequenterweise werden die entsprechenden Konzentrationsprofile durch die Green'sche Funktion der Helmholtz Gleichung (2.1) im unendlich ausgedehnten Raum beschrieben. Demgegenüber beschreiben die explizit in Ref. [A3] spezifizierten Funktionen $R(x; x_j)$ und $G_R(x; x_j)$ aus Tabelle 2.1 den Einfluss der Neumann-Randbedingung (2.2) auf die Lösungen. Wegen der Linearität der Gleichungen können diese einfach durch Superposition konstruiert werden. So erhält man z.B. für die Randbedingung (A) in (2.4) im Regime 2 die Approximation

$$u(x) = \varepsilon \sum_{j=1}^N |\partial\Omega_j| \sigma_j G_H(x; x_j) + O(\varepsilon^2) \quad (2.5)$$

wobei $|\partial\Omega_j| \equiv 4\pi\rho_j^2$ die reskalierte Oberfläche des j ten Kompartiments ist. Ähnliche Ausdrücke erhält man auch für die anderen Skalenbereiche in Tabelle 2.1 in Verbindung mit der entsprechenden Randbedingung in (2.4).

Streng genommen gelten die asymptotischen Entwicklungen nur für den Fall, dass $\varepsilon \ll 1$. Der Vergleich mit numerischen Simulationen hat aber gezeigt, dass die so gewonnenen asymptotischen Lösungen bis zu $\varepsilon = 0.1$ sehr gute Approximationen darstellen [A3]. Die hier entwickelten Methoden können somit als Basis für eine systematische Untersuchung von Signaltransduktionsprozessen in vollständig dreidimensionalen Geometrien dienen. Erste Schritte in dieser Richtung wurden bereits von anderen Autoren unternommen, sind aber zur Zeit noch in Begutachtung [47]. Darüber hinaus lieferte diese

Regime	Green'sche Funktion	Abfall-Verhalten der Lösung
(1) $\sqrt{\varepsilon} \leq \alpha \leq 1$	$G_N = \frac{1}{4\pi x-x_j } + R_N(x; x_j)$	algebraisch
(2) $1 \leq \alpha \leq 1/\varepsilon$	$G_H = \frac{\exp(-\alpha x-x_j)}{4\pi x-x_j } + G_R(x; x_j)$	exponentiell
(3) $\alpha \geq 1/\varepsilon$	$G_F = \frac{\exp(-\alpha_2 x-x_j /\varepsilon)}{4\pi x-x_j }$	lokal exponentiell

Tabelle 2.1: Klassifikation der asymptotischen Lösungen der Gleichungen (2.1)-(2.4) durch die zugeordnete Green'sche Funktion.

asymptotische Analyse neue Einsichten über die Beziehung zwischen Kompartimentgröße und der erforderlichen Enzymaktivität in (2.4), um lokal, d.h. in der Umgebung eines Kompartiments, einen ausreichend hohen Fluss an aktivierten Signalmolekülen zu erzeugen ($\sim O(1)$). Hier konnten wir zeigen, dass dafür das Produkt aus Enzymaktivität und Diffusionszeit $\tau_D = R^2/D$ von der Größenordnung $1/\varepsilon$ sein muss [A3]. Dieser Umstand ist in der Skalierung der Normalableitung in der Randbedingung (2.3) bereits berücksichtigt. Diese Skalierung ist wiederum für die $\sqrt{\varepsilon}$ -Abhängigkeit der unteren Grenze in Regime (1) verantwortlich (Tabelle 2.1).

Schließlich sei noch erwähnt, dass der in Tabelle 2.1 aufgeführte reguläre Teil der Neumann-Funktion R_N für die Einheitskugel die explizite Gestalt ($r_j \equiv |x_j|$)

$$R_N(x; x_j) = \frac{1}{4\pi} \frac{1}{r \left| \frac{x}{r^2} - x_j \right|} + \frac{1}{8\pi} (r^2 + r_j^2) + \frac{1}{4\pi} \log \left(\frac{2}{1 - x \cdot x_j + r \left| \frac{x}{r^2} - x_j \right|} \right) - \frac{7}{10\pi}$$

besitzt [A3], sodass man in Regime (1) und (3) vergleichsweise einfache analytische Ausdrücke für das drei-dimensionale Konzentrationsprofil aktivierter Signalmoleküle in der Gegenwart mehrerer Kompartimente besitzt.

2.2 Reaktionsrate auf einer zylindrischen Membran

2.2.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein dem Zellkern benachbartes Organell eukaryotischer Zellen, das (unter anderem) als Speicher für Kalzium-Ionen (Ca^{2+}) dient. Ca^{2+} ist ein sogenannter "Second Messenger", der oft als Reaktion auf extrazelluläre Reize aktiviert wird. Dabei werden Kalzium-Ionen durch ER-ständige Ionenkanäle (z.B. Inositol-1,4,5-Triphosphat Rezeptoren oder IP_3Ren) in das Zytosol ausgeschüttet, was zu zeitlich periodischen Oszillationen oder zu Wellen-artiger Ausbreitung der Kalzium-Ionen führen kann. Unterschiedliche Reize werden in der Form, der Amplitude und(oder) der Frequenz der Oszillationen und Wellen kodiert [7, 20, 44].

Tateishi et. al. haben beobachtet, dass IP_3Ren Cluster auf der ER-Membran bilden können, was lokal zu einem verstärkten Ausstrom von Ca^{2+} -Ionen führt [74] und so

mit die molekulare Grundlage von spontanen Öffnungen einzelner Ionenkanäle innerhalb eines Clusters, sogenannten „Puffs“, bilden kann [8]. Dazu ist es notwendig, dass die IP₃Ren in den geöffneten Zustand übergehen. Da die Öffnungswahrscheinlichkeit der IP₃Ren von der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration abhängt, besteht die Möglichkeit, dass sich Clusterbildung und die Generierung von Kalziumsignalen gegenseitig beeinflussen. Der mittlere Abstand zwischen verschiedenen Clustern ist ein wichtiger Parameter, der die raum-zeitlichen Aspekte der Kalziumdynamik wie Wellengeschwindigkeit und Oszillationsperiode beeinflusst [20]. Die Arbeit von Tateishi et. al. haben gezeigt, dass die Clusterbildung selbst ein dynamischer Prozess ist, der die Signalausbreitung durch Kalzium-Ionen entscheidend beeinflussen kann. Dieser Umstand wurde in bisherigen Arbeiten aber praktisch nicht berücksichtigt.

Um die Zeitskala abschätzen zu können, auf der das Clustern statt findet und wie diese insbesondere von geometrischen Parametern abhängt, haben wir die Reaktionsrate diffundierender Teilchen auf der ER-Membran unter Berücksichtigung der zylindrischen Geometrie des tubulären ER berechnet [A1]. Dazu wurde die von M. v. Smoluchowski eingeführte Methode benutzt [78], wonach die Reaktionsrate definiert ist als Gesamtfluss der an ein fest gehaltenes Molekül andiffundierenden Teilchen. Dabei wird angenommen, dass eine Reaktion statt findet, sobald sich zwei Moleküle berühren, die Reaktionsrate also durch die Diffusion limitiert ist.

Um die Rechnung zu vereinfachen, haben wir einen Rezeptor in den Koordinatenursprung gelegt (siehe Abbildung 2.2). Die anderen Rezeptoren diffundieren frei auf der Zylinderoberfläche gemäß der Diffusionsgleichung

$$\partial_t u = D\Delta u, \quad (\mathbf{x}, t) \in \Omega_\delta \times R_+. \quad (2.6)$$

Die Zylindergeometrie wird durch periodische Randbedingungen in y -Richtung modelliert. Am Rand des Zylinders geben wir entweder die Konzentration vor ($u = u_B$) oder wir fordern, dass der Fluss verschwindet. Beide Randbedingungen sind physiologisch sinnvoll. Kompliziert wird die Lösung von (2.6) dadurch, dass Ω_δ wieder ein nicht einfach zusammenhängendes Gebiet mit einem kleinen Loch in der Mitte ist. Hierbei entspricht δ dem zweifachen (Kontakt-)Radius eines IP₃R-Kanals. Dieser liegt bei etwa 5-10nm [75]. Die Diffusionslimitierung wird durch die Randbedingung $u = 0$ bei $|\mathbf{x}| = \delta$ realisiert.

2.2.2 Diskussion der wichtigsten Ergebnisse

Im Falle der Null-Fluss-Randbedingung hat die Reaktionsrate die allgemeine (zeitlich) asymptotische Form

$$k(t) \sim Ae^{-\lambda t}, \quad (2.7)$$

d.h. nach hinreichend langer Zeit geht die Reaktionsrate exponentiell gegen Null, da in einem endlichen Gebiet mit Wahrscheinlichkeit Eins alle Teilchen absorbiert werden [64]. Die inverse Zeitskala λ ist proportional zum kleinsten Eigenwert des Laplace-Operators für das betrachtete zylinderförmige Gebiet mit einem kleinen Loch ($\delta \ll L$) in der Mitte

2 Räumliche Aspekte Intrazellulärer Signalübertragung

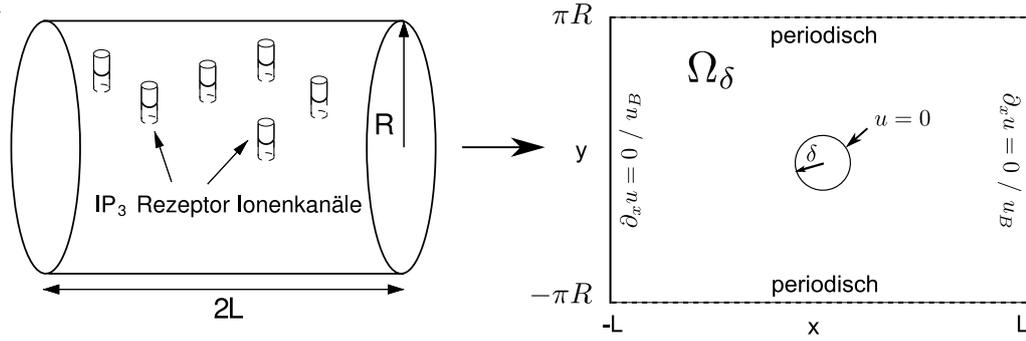


Abbildung 2.2: Zur Berechnung der Reaktionsrate auf einer zylindrischen Membran.

(siehe Abbildung 2.2). Sie hat eine asymptotische Entwicklung der Gestalt [A1]

$$\lambda = \frac{2\pi\nu D}{|\Omega_Z|} [1 - 2\pi\nu R_1 + O(\nu^2)], \quad \nu \equiv \frac{1}{\log \frac{L}{\delta}}. \quad (2.8)$$

Der erste Term hängt nur von der Gesamtfläche $|\Omega_Z| = 4\pi RL$ des betrachteten Gebietes, hier einem Zylindermantel, ab und gilt daher allgemein für endliche zwei dimensionale Gebiete mit einem kleinen kreisrunden Loch. Der zweite Term in der Entwicklung beschreibt den Einfluss der Geometrie über den regulären Teil (R_1) einer dem Problem zugeordneten Green'schen Funktion, welche explizit vom Seitenverhältniss L/R abhängt. Je nachdem ob $L \gg R$ oder $L \ll R$ haben wir verschiedene Darstellungen dieser Funktion gefunden

$$R_1 \approx \frac{1}{2\pi} \left(\frac{L}{6R} - \log \frac{L}{R} \right), \quad R \ll L \quad (2.9)$$

$$R_1 \approx \frac{1}{2\pi} \left(\frac{\pi^2 R}{6L} - \log \pi \right), \quad L \ll R\pi^2. \quad (2.10)$$

Die Amplitude in (2.7) hat ebenfalls eine asymptotische Entwicklung nach Potenzen von ν : Bis auf Terme der Ordnung ν^2 und höher ist sie einfach durch $A = u_0 |\Omega_Z| \lambda$ gegeben, wobei u_0 die Anfangskonzentration der diffundierenden Teilchen (IP_3 Ren) ist.

Für den Fall, dass die Konzentration am Rand des Zylinders (bei $x = \pm L$) konstant gehalten wird ($u = u_B$), stellt sich nach hinreichend langer Wartezeit eine stationäre Reaktionsrate ein, die durch

$$k_s = \frac{2\pi D \nu u_B}{1 + \nu R_s}, \quad R_s \approx \frac{1}{2} \left(\frac{L}{2R} - \log \frac{L}{R} \right), \quad \nu \equiv \frac{1}{\log \frac{L}{\delta}} \quad (2.11)$$

gegeben ist. Die nichtlineare Abhängigkeit von ν deutet bereits darauf hin, dass die asymptotische Reihe in ν aufsummiert werden kann. Das ist in der Tat eine Besonderheit von singular gestörten Eigenwert-Problemen in zwei Dimensionen [84]. Auf ähnliche Art und Weise kann man auch die asymptotischen Reihen für die Amplitude A und den

kleinsten Eigenwert λ in (2.7) und (2.8) aufsummieren [A1], obwohl das Endergebnis etwas komplizierter ist als das in (2.11).

Der Vergleich mit numerischen Simulationen hat gezeigt [A1], dass die asymptotischen Ausdrücke für $k(t)$ und k_s exzellente Approximationen sind, die sogar für sehr große Seitenverhältnisse von bis zu $L/R = 70 \dots 80$ und Lochgrößen von bis zu $\delta/L = 0.1$ nur Abweichungen von weniger als 4 Prozent liefern. Diese Ergebnisse wurden bereits zur Formulierung neuer mathematischer Modelle, wie z.B. zur Beschreibung der Diffusion von Protein-Rezeptoren entlang von dendritischen Zellen ($L/R \gg 1$) [10] oder zur Abschätzung der Clusterrate von IP₃Ren auf der ER-Membran [A1] und [63] benutzt.

2.3 Oberflächendiffusion von Rezeptormolekülen in der Gegenwart teilweise absorbierender Gebiete

2.3.1 Einleitung und Aufgabenstellung

In den letzten Jahren sind durch die Entwicklung neuer Verfahren zur Beobachtung einzelner Moleküle auf Zelloberflächen [65] große Fortschritte bei der Aufklärung von Signalübertragungsvorgängen erreicht worden. Dabei hat sich gezeigt, dass sich die entsprechenden Rezeptoren oftmals zu Clustern zusammen lagern, was z.B. zu einer Signalverstärkung führen kann [35]. Im Falle des Ausstroms von Kalzium-Ionen aus dem ER, welcher durch IP₃-Rezeptor-Ionenkanäle gesteuert wird, scheint das vorherige Clustern der Ionenkanäle eine notwendige Voraussetzung für das Entstehen von „Ca²⁺-Puffs“ zu sein [72]. Auch bei der Aktivierung von T-Zellen des Immunsystems bilden sogenannte T-Zell-Rezeptoren Cluster auf der Zelloberfläche, die durch Bindung an entsprechende Antigene hervorgerufen werden. Für die endgültige Aktivierung der T-Zelle müssen noch weitere Moleküle mit den so erzeugten Clustern aggregieren [87].

Motiviert durch diese Beispiele betrachten wir das folgende allgemeine Problem (Abbildung 2.3): Gegeben seien N stationäre (nicht diffundierende) Cluster fester Größe auf der Oberfläche einer kugelförmigen Zelle. Die Anordnung der Cluster ist beliebig, solange sie mindestens einen Clusterdurchmesser voneinander entfernt sind. Weiterhin soll der Clusterradius $r_j = \varepsilon a_j R$ ($a_j \leq 1$) klein gegenüber dem Zellradius R sein ($\varepsilon \ll 1$), sodass das Verhältnis der beiden Größen wieder als kleiner Parameter dienen kann. Diese Bedingung ist für typische Clustergrößen von 5-10 Molekülen mit einem jeweiligen Durchmesser von etwa 10 nm bei einem Zellradius von mehreren Mikrometern praktisch immer erfüllt. Wir betrachten dann die Diffusion von Molekülen, die sich noch nicht an einen der vordefinierten Cluster angelagert haben. Dabei nehmen wir an, dass die Cluster nicht vollständig absorbierend wirken, sodass sich, je nach lokaler Konzentration in der Nähe eines Clusters, Moleküle anlagern oder wieder abspalten können. Mathematisch läßt sich diese Situation durch eine teilweise absorbierende Randbedingung der Form $\varepsilon \partial_{\hat{n}} u = \kappa_j (b_j - u)$ realisieren. Hierbei dienen die Konstanten b_j als lokale Schwellwerte in dem Sinne, dass wenn $u > b_j$ ($u < b_j$) in der Nähe des j ten Clusters dann adsorbieren (desorbieren) Moleküle an den (von dem) betreffenden Cluster. Weiterhin wollen wir berücksichtigen, dass neu synthetisierte Rezeptormoleküle (mit einer ortsabhängigen

und die Funktion

$$G(x; x_j) = -\frac{1}{2\pi} \log |x - x_j| - \frac{1}{4\pi} (1 - 2 \log 2), \quad x, x_j \in S_2$$

ist die sogenannte Neumann Funktion für die Kugeloberfläche, die durch

$$\Delta_S G = \frac{1}{4\pi} - \delta(x - x_j), \quad \int_{S_2} G ds = 0.$$

eindeutig definiert ist. Die N Konstanten A_j sowie der Mittelwert der stationären Lösung $\bar{u} = \int_{S_2} u_s ds$ sind dann durch ein System von $N + 1$ linearen Gleichungen bestimmt [A4]. Die so gewonnenen Ausdrücke für A_j und \bar{u} sind im allgemeinen hochgradig nichtlineare Funktionen der in (2.14) definierten Eichfunktionen μ_j . d.h. sie enthalten wieder alle logarithmischen Korrekturen der Form μ_j^k analog wie in [84] und [A1].

Für den kleinsten Eigenwert σ in (2.13) kann man eine transzendente Gleichung ableiten, als deren kleinste Wurzel σ auftritt [A4]. Im speziellen Fall von N gleich großen Clustern (Radius εa , mit $a \leq 1$), deren Mittelpunkte mit x_j bezeichnet seien und die vollständig absorbierend sein sollen ($\kappa_j = \infty$ und $b_j = 0$), hat der kleinste Eigenwert eine asymptotische Entwicklung der Form

$$\sigma(\varepsilon) \sim \frac{\mu N}{2} + \mu^2 \left[-\frac{N^2}{4} (2 \log 2 - 1) + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i} \log |x_i - x_j| \right], \quad \mu \equiv -\frac{1}{\log(\varepsilon a)}.$$

Für $N = 1$ stimmt das mit dem bisher bekannten Resultat überein [85]. Für $N > 1$ ist das Resultat neu, und es beschreibt über den logarithmischen Term den Einfluss weiterer Cluster auf die Zeitskala, auf der der stationäre Zustand in (2.12) erreicht wird. Diese Zwei-Term-Approximation liefert gute numerische Ergebnisse für Clustergrößen bis zu $\varepsilon = 0.05$. Dem gegenüber stimmt der numerisch ermittelte Eigenwert mit der Lösung der transzendenten Gleichung noch bis $\varepsilon = 0.2$ hervorragend überein [A4]. Die zugehörige (normierte) Eigenfunktion hat die Gestalt

$$\psi(x) = -2\pi \sum_{j=1}^N \mu_j A_j G_H(x; x_j), \quad G_H(x; x_j) = -\frac{1}{4 \sin(\pi\nu)} P_\nu(-x \cdot x_j).$$

Hier ist P_ν die Legendre-Funktion erster Art mit $\sigma = \nu(\nu + 1)$.

Eine interessante Anwendung der stationären Lösung (2.14) ergibt sich für $M \equiv 1$ in (2.12). In diesem Fall beschreibt $u_s(x)$ die Verteilung für die mittlere erste Ankunftszeit (mean first passage time) eines auf der Kugeloberfläche diffundierenden Teilchens [21], welches bei $x \in S_2$ gestartet ist und schliesslich von einem der N Cluster absorbiert wird. Insbesondere ist \bar{u} die räumlich gemittelte erste Ankunftszeit, die in biologischen Fragestellungen eine wichtige Rolle spielt, z.B. kann deren Inverses als Approximation für die Vorwärtsrate (Assoziationsrate) zwischen dem diffundierenden Teilchen und den Clustern dienen. Im Falle von N gleich großen Clustern erhalten wir

$$\bar{u} \sim \frac{R^2}{D} \left(\frac{2}{N} \log \frac{1}{\varepsilon a} + 2 \log 2 - 1 - \frac{4}{N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j>i} \log |x_i - x_j| \right) \quad (2.15)$$

was wieder für $N = 1$ mit dem bisher bekannten Ergebnis [48, 70] übereinstimmt.

2.4 Mittlere Verweilzeit in einer Kugel mit kleinen Austrittslöchern auf der Oberfläche

2.4.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die Frage nach der mittleren Austrittszeit eines diffundierenden Teilchens aus einem begrenzten drei-dimensionalen Gebiet durch ein kleines Loch an der Oberfläche ist ein klassisches Problem [2], welches zahlreiche Anwendungen hat, z.B. bei der Beschreibung der effektiven Diffusion in porösen Medien [5]. In der Zell-Biologie treten solche „Narrow Escape“ Probleme bei der Beschreibung der Diffusion von Ionen durch Ionenkanäle in der Zellmembran, dem Export von Proteinen aus dem Zellkern oder der Berechnung der Assoziationsrate chemischer Reaktionen in Mikro-Kompartimenten auf [31, 66]. Trotz dieser vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten war man lange Zeit auf numerische Simulationen angewiesen, um die mittlere Verweilzeit eines Brown'schen Teilchens und deren Abhängigkeit von der Geometrie des Gebietes oder der Größe des Loches zu ermitteln.

Erste Versuche, die mittlere Verweilzeit mittels asymptotischer Methoden analytisch zu berechnen, tauchten erst in den letzten Jahren auf. In [28] wurde der führende Term in der Entwicklung $V/4Dr_s$ mit heuristischen Argumenten hergeleitet. Hierbei ist V das Volumen des betrachteten Gebietes, r_s ist der Radius des kleinen Loches an der Oberfläche und D ist der Diffusionskoeffizient des diffundierenden Teilchens. Eine systematischere Analyse wurde in [71] unternommen. Für eine Kugel (Radius R) mit einem kleinen absorbierenden, kreisrunden Loch auf der Oberfläche wurde dort der Ausdruck (bis auf den Faktor $1/\pi$)

$$\frac{V}{4r_s D} \left[1 + \frac{r_s}{\pi R} \log \frac{R}{r_s} + O\left(\frac{r_s}{R}\right) \right] \quad (2.16)$$

hergeleitet, der bereits explizit von der Geometrie des betrachteten Gebietes abhängt.

Als Erweiterung dieser Analyse haben wir die mittlere Verweilzeit (v) für den Fall einer Kugel mit N absorbierenden (nicht notwendigerweise) kreisrunden Löchern auf der Oberfläche betrachtet (Abbildung 2.4), welches durch das dimensionslose² Randwertproblem beschrieben wird [A5]

$$\begin{aligned} \Delta v &= -1, & x \in \Omega_1 \\ \partial_{\hat{n}} v &= 0, & x \in \partial\Omega_r \\ v &= 0, & x \in \partial\Omega_a = \cup_{j=1}^N \partial\Omega_{\varepsilon_j} \end{aligned} \quad (2.17)$$

Hierbei bezeichnet Ω_1 die Einheitskugel im \mathbb{R}^3 , $\partial\Omega_r$ den reflektierenden Anteil der Oberfläche und $\partial\Omega_a$ den absorbierenden Teil der Oberfläche, welcher aus N kleinen ($\sim O(\varepsilon)$) Scheibchen besteht.

²Wir messen v in Einheiten von $\tau_D = R^2/D$.

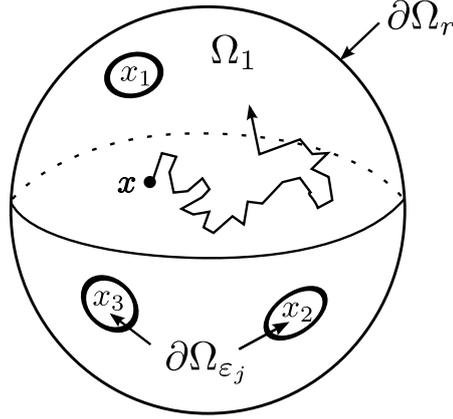


Abbildung 2.4: Geometrische Verhältnisse zur Beschreibung der mittleren Verweilzeit in einer Kugel mit kleinen, absorbierenden Löchern vom Radius $r_{sj} = \varepsilon a_j R$ ($a_j \leq 1$, $\varepsilon \ll 1$) auf der Oberfläche nach Gleichung (2.17).

2.4.2 Diskussion der wichtigsten Ergebnisse

Die asymptotische Lösung von Gleichung (2.17) lässt sich mit Hilfe der durch

$$\Delta G_s = \frac{1}{|\Omega_1|}, \quad \partial_n G_s = \delta(x - x_j), \quad x, x_j \in \partial\Omega_r, \quad \int_{\Omega_1} G_s dx = 0 \quad (2.18)$$

definierten Neumann Funktion konstruieren. Sie hat Singularitäten bei x_j auf der Oberfläche des betrachteten Gebietes. Für die Einheitskugel hat G_s die explizite Form

$$G_s(x; x_j) = \frac{1}{2\pi|x - x_j|} + \frac{1}{8\pi}(1 + |x|^2) + \frac{1}{4\pi} \log \left(\frac{2}{1 - |x| \cos \gamma + |x - x_j|} \right) - \frac{7}{10\pi}.$$

Hierbei ist $|x| \cos \gamma = x \cdot x_j$ und $x_j = (\cos \varphi_j \sin \theta_j, \sin \varphi_j \sin \theta_j, \cos \theta_j)$.

Für den Fall identischer, kreisrunder Scheibchen vom Radius $\varepsilon = r_s/R$ hat die räumlich gemittelte mittlere Verweilzeit die explizite asymptotische Gestalt

$$\bar{v} \sim \frac{|\Omega_1|}{4N\varepsilon} \left[1 + \frac{\varepsilon}{\pi} \log \frac{2}{\varepsilon} + \frac{\varepsilon}{\pi} \left(-\frac{9N}{5} - \log 2 + \frac{3}{2} + \frac{4}{N} H(x_1, \dots, x_N) \right) \right]. \quad (2.19)$$

Die hierbei auftretende Funktion

$$H(x_1, \dots, x_N) = \sum_{i=1}^N \sum_{j>i} \left(\frac{1}{|x_i - x_j|} - \frac{1}{2} \log |x_i - x_j| - \frac{1}{2} \log (2 + |x_i - x_j|) \right) \quad (2.20)$$

hängt explizit von der Anordnung der N absorbierenden Scheibchen auf der Oberfläche der Kugel ab (x_i ist der Mittelpunkt der i ten Scheibe). Bis auf Terme der Ordnung $O(\varepsilon)$

stimmt der Ausdruck in (2.19) für $N = 1$ mit dem bekannten Resultat (2.16) überein. Ausserdem ist offensichtlich, dass die mittlere Verweilzeit für eine gegebene Anzahl N durch diejenige Konfiguration x_1, \dots, x_N minimiert wird, welche die Funktion H in (2.20) minimiert. Ähnliche Optimierungsprobleme treten auch bei der Bestimmung der Gleichgewichtskonfigurationen von Punktladungen auf, welche sich nur auf der Oberfläche einer Kugel bewegen dürfen und dort entweder über reine Coulombkräfte [19] oder über ein logarithmisches Potential [6] miteinander wechselwirken. Das Besondere an dem Ausdruck in (2.20) ist, dass hier beide Formen der Wechselwirkung auftreten: Der Coulomb-Term $\sim 1/|x_i - x_j|$ ist typisch für Diffusionsprobleme in drei Dimensionen während die logarithmischen Terme Ausdruck des quasi zwei-dimensionalen Suchprozesses entlang des reflektierenden Teils der Kugeloberfläche sind.

Mit Hilfe numerischer Optimierungsalgorithmen haben wir für $N = 2 \dots 65$ die jeweiligen Konfigurationen bestimmt, welche H minimieren. Interessanterweise besitzt H ein Minimum bei $N = 9$ während sowohl die Coulomb-Energie als auch die logarithmische Energie ($\sim \log|x_i - x_j|$) allein monotone Funktionen von N sind. Als Anwendung dieser Ergebnisse haben wir die minimale mittlere Verweilzeit als Funktion der Oberflächenbedeckung durch die absorbierenden Scheibchen untersucht [A5]. Dabei zeigt sich, dass sich die minimale Verweilzeit bereits für $N = 30 - 40$ Austrittsfenster kaum noch ändert, d.h. durch Hinzufügen weiterer Fenster lässt sich die Austrittszeit nicht wesentlich verkürzen. Interessanterweise besitzen Zellkerne mehrere Hundert Porenkomplexe in ihrer Membran [86] über die der Austausch von Molekülen mit dem Zytosol erfolgt – also wesentlich mehr als es für ein möglichst schnelles Finden der Poren erforderlich wäre.

Zur Beschreibung zeitabhängiger Diffusionsphänomene haben wir den kleinsten Eigenwert des Laplace-Operators in der Einheitskugel mit N absorbierenden kleinen Scheibchen auf ihrer Oberfläche berechnet [A5]. Im Rahmen der asymptotischen Entwicklung (2.19) gilt $\lambda \sim 1/D\bar{v}$, sodass λ für die minimale mittlere Verweilzeit maximal wird.

3 Musterbildung in der Glykolyse: Einwärts Rotierende Spiralwellen

3.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Bereits 1964 wurden erstmals periodische Oszillationen im Energiestoffwechsel von Hefezellen beim Übergang von aerobem zu anaerobem Wachstum nachgewiesen [15]. Dieselben Oszillationen traten auch in Zell-freien Hefeextrakten auf [16], hier allerdings mit einer längeren Periode. In der Folge haben Untersuchungen in Hefeextrakten entscheidend dazu beigetragen, den für die Oszillationen verantwortlichen Mechanismus aufzuklären. Dafür spielt die Aktivierung des allosterisch regulierten Enzyms Phosphofruktokinase (PFK) durch eines ihrer Produkte Adenosindiphosphat (ADP) offenbar eine übergeordnete Rolle [30, 49].

Auf dieser Grundlage wurde von Sel'kov eines der ersten mathematischen Modelle entwickelt, welches das oszillatorische Verhalten der Glykolyse allein durch die Produktaktivierung der PFK mit Hilfe einer einfachen Hill-Kinetik beschreibt [67]. Ein paar Jahre später wurde von Goldbeter, gestützt durch neuere experimentelle Befunde, ein etwas komplizierterer, von Monod, Wyman und Changeux (MWC) vorgeschlagener Mechanismus [54] zur Beschreibung der allosterischen Regulation der PFK benutzt [26]. Neben der Produktaktivierung der PFK konnte Goldbeter in diesem Modell auch die Inhibierung der PFK durch eines ihrer Substrate Adenosintriphosphat (ATP) und die Kooperativität bei der Substratbindung relativ einfach berücksichtigen. Seither gelten die (anaeroben) glykolytischen Oszillationen als eines der Standardbeispiele für nichtlineares oszillatorisches Verhalten in biologischen Systemen [25, 29]. In der Folge dienten sie als Modellsystem zur Untersuchung generischer Fragestellungen wie der Zell-Zell Synchronisation [17] oder der metabolischen Kontrollanalyse [9].

Die oszillatorischen Eigenschaften glykolytischer Hefeextrakte machen diese zu einem idealen biologischen Modellsystem zur Untersuchung raum-zeitlicher Muster, welche durch diffusive Kopplung hervor gerufen werden. So konnten 1996 erstmals glykolytische Aktivitätswellen in einem geschlossenen Reaktor beobachtet werden [50]. Mit der Entwicklung räumlich offener Reaktoren konnten die so erzeugten Muster dann über einen längeren Zeitraum stabil und durch entsprechende Regelungen im Zufluss des Reaktors gezielt beeinflusst werden [1] und [A2]. Mit Hilfe dieses experimentellen Systems wurden in der Folge neuartige Muster entdeckt [82] und [A6], die bisher nur aus rein chemischen Reaktions-Diffusions-Systemen bekannt waren, darunter einwärts rotierende Spiralwellen (oder Anti-Spiralen) [68, 79] und segmentierte (Dash-) Wellen [80, 81].

Von theoretischer Seite wurde gezeigt, dass einwärts propagierende Wellen generisch

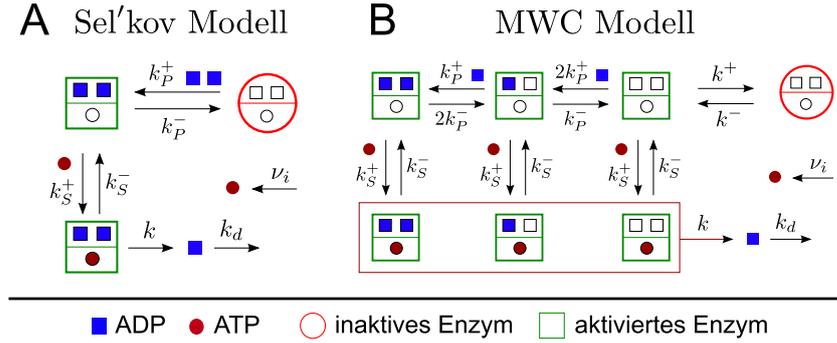


Abbildung 3.1: Verschiedene molekulare Mechanismen der Aktivierung der PFK durch ihr Produkt ADP – gezeigt für zwei ADP-Bindestellen.

in oszillatorischen Medien in der Nähe einer super-kritischen Hopf-Bifurkation auftreten können [12, 27, 57]. In der Nähe einer solchen Bifurkation wird die raum-zeitliche Dynamik eines Reaktions-Diffusions-Systems (1.1) durch die komplexe Ginzburg-Landau Gleichung (kGLG) bestimmt

$$\partial_t A = (1 + ic_1) \nabla_x^2 A + A - (1 + ic_2) |A|^2 A. \quad (3.1)$$

Die komplexe Amplitude $A(x, t)$ beschreibt raum-zeitliche Modulationen um den instabilen, räumlich homogenen stationären Zustand, der durch $f(u_s(p), p) = 0$ charakterisiert ist. Die beiden reellen Parameter c_1 und c_2 hängen in kanonischer Weise von den Parametern des ursprünglichen Systems (1.1) ab, können aber nur für einfache Systeme explizit berechnet werden [43]. Motiviert durch die experimentelle Beobachtung einwärts rotierender Spiralwellen in der Glykolyse und der Tatsache, dass in mehr als 30 Jahren niemand solche Wellen in numerischen Simulationen mit einfachen glykolytischen Modellsystemen wie dem Sel'kov oder dem Goldbeter Modell gefunden hat, haben wir die Bedingungen für das Auftreten einwärts rotierender Spiralwellen in diesen beiden Modellsystemen näher untersucht.

3.2 Diskussion der wichtigsten Ergebnisse

Durch explizite Berechnung der beiden Koeffizienten c_1 und c_3 der kGLG konnten wir zeigen, dass im Sel'kov Modell (Abbildung 3.1A), unabhängig von der Wahl der Parameter, keine einwärts rotierenden Spiralwellen auftreten können. Diese werden zwar durch die kGLG vorher gesagt. Unsere Analysen zeigen jedoch, dass sie im nicht oszillatorischen Bereich jenseits der ebenfalls auftretenden Turing-Hopf-Bifurkation statt finden und somit durch die dort entstehenden Turing-Muster unterdrückt werden [A7]. Im Gegensatz dazu sind für den etwas komplizierteren MWC-Mechanismus (Abbildung 3.1B) neben normalen (auswärts rotierenden) Spiralwellen und Turing-Mustern auch die experimentell beobachteten einwärts rotierenden Spiralwellen möglich. Die berechneten

Phasendiagramme zeigen, dass das Auftreten von Anti-Spiralen in reziproker Weise von der Anzahl der Enzymuntereinheiten n und dem Verhältnis $\delta = D_{ATP}/D_{ADP}$ der Diffusionskoeffizienten von Inhibitor und Aktivator abhängt. Je größer dieses Verhältnis ist, desto geringer kann die Anzahl an PFK Untereinheiten sein, die notwendig sind, damit sich einwärts rotierende Spiralwellen ausbilden können.

Im Hefeextrakt kann eine räumliche Skalentrennung ($\delta > 1$) durch unterschiedlich starke allosterische Wechselwirkungen der PFK-Effektoren ADP und ATP mit den regulatorischen Bindungsstellen der PFK zustande kommen [34, 73]. Durch Vergleich mit numerischen Simulationen auf der Grundlage des vollständigen Goldbeter-Modells gehen wir davon aus, dass die räumliche Skalentrennung im Hefeextrakt im Bereich $\delta = 2 \dots 3$ liegt. Bei diesen geringen Werten sind jedoch mindestens 4-6 Untereinheiten erforderlich, damit Anti-Spiralen entstehen können [A6] – im Einklang mit der Tatsache, dass die Hefe-PFK ein oktamerer Enzym ist, also acht Untereinheiten besitzt. Darüber hinaus erklärt es auch, warum einwärts rotierende Spiralwellen nicht schon in früheren theoretischen Arbeiten auf der Grundlage des Goldbeter-Modells [4, 23, 61, 88] gefunden wurden, da diese durchgängig $n = 2$ (korrekt für PFK in Muskelzellen) verwendet hatten.

Der sequentielle Aktivierungsmechanismus der PFK im MWC-Modell impliziert eine geringere Enzymkooperativität bei der Produktaktivierung als der Hill-Mechanismus im Sel'kov-Modell. Das legt den Verdacht nahe, dass das Entstehen einwärts rotierender Spiralwellen im MWC-Modell mit der geringeren Enzymkooperativität in Verbindung steht. Um die Kooperativität zu quantifizieren haben wir den effektiven Hillkoeffizienten [24] sowohl für das MWC- als auch für das Sel'kov-Modell berechnet und mit dem Auftreten der Anti-Spiralen korreliert [A7]. Dabei zeigte sich, dass diese nur in Bereichen entstehen, in denen die Ableitung des Hillkoeffizienten nach der Aktivatorkonzentration positiv ist. Das ist im Einklang mit der Tatsache, dass die Hillkurve im Sel'kov-Modell eine monoton fallende Funktion der Aktivatorkonzentration und somit die Ableitung immer negativ ist.

Diese Analysen zeigen explizit wie sich verschiedene molekulare Mechanismen der Enzymaktivierung auf die durch diffusive Kopplung entstehenden Muster im System auswirken können. Insbesondere haben wir klar die Bedeutung der Anzahl der Enzymuntereinheiten auf die Musterbildung heraus gearbeitet. Da es die PFK, je nach biologischer Herkunft, als Dimer (Muskel), Tetramer (E.Coli) oder als Oktamer (Hefe) gibt, könnten die Vorhersagen bezüglich der Generierung von Anti-Spiralen und/oder Turing Mustern auch experimentell überprüft werden. Weiterhin deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass für die musterbildenden Eigenschaften in der Glykolyse die Stärke der Enzymkooperativität keine so große Rolle spielt wie für das Entstehen oszillatorischen Verhaltens [24, 25]. Hier sind es vielmehr subtilere Enzymeigenschaften wie die von uns neu eingeführte Sensitivität des Hill-Koeffizienten [A7], welche z.B. mit dem Auftreten einwärts rotierender Spiralwellen korreliert. Schließlich konnten wir zeigen, dass das Auftreten der bisher experimentell nicht beobachteten Turing Muster durch den hohen Oligomerisierungsgrad der Hefe PFK begünstigt wird. Die dafür nötige Skalentrennung δ liegt allerdings um einen Faktor 1.5-2 höher als die für Anti-Spiralen, was man durch stärkere Immobilisierung der PFK oder Zugabe weiterer, vorrangig ADP bindender Enzyme zum Hefeextrakt erreichen könnte.

Literaturverzeichnis

- [1] S. Bagyan, T. Mair, E. Dulos, J. Boissonade, P. DeKepper, and S. C. Müller. Glycolytic oscillations and waves in an open spatial reactor: Impact of feed-back regulation of phosphofruktokinase. *Biophys. Chem.*, 116:67–76, 2005. 17
- [2] J. W. S. Baron Rayleigh. *The Theory of Sound, Vol. 2*. Dover, New York, 2nd edition, 1945. 14
- [3] P. Bastiaens, M. Caudron, P. Niethammer, and E. Karsenti. Gradients in the self-organization of the mitotic spindle. *Trends Cell. Biol.*, 16:125–134, 2006. 7
- [4] D. Battogtokh and J. J. Tyson. Turbulence near cyclic fold bifurcations in birhythmic media. *Phys. Rev. E*, 70:026212, 2004. 19
- [5] A. M. Berezhkovskii, V. Y. Zitserman, and S. Y. Shvartsman. Diffusivity in periodic arrays of spherical cavities. *J. Chem. Phys.*, 118:7146–7147, 2003. 14
- [6] B. Bergersen, D. Boal, and P. Palffy-Muhoray. Equilibrium configurations of particles on the sphere: The case of logarithmic interactions. *J. Phys. A*, 27:2579–2586, 1994. 16
- [7] M. J. Berridge. The AM and FM of calcium signalling. *Nature*, 386:759–760, 1997. 8
- [8] M. J. Berridge. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J. Physiol.*, 499:291–306, 1997. 9
- [9] M. Bier, B. Teusink, B. N. Kholodenko, and H. V. Westerhoff. Control analysis of glycolytic oscillations. *Biophys. Chem.*, 62:15–24, 1996. 17
- [10] P. C. Bressloff, B. A. Earnshaw, and M. J. Ward. Diffusion of protein receptors on a cylindrical dendritic membrane with partially absorbing traps. *SIAM J. Appl. Math.*, 68:1223–1246, 2008. 11
- [11] G. C. Brown and B. N. Kholodenko. Spatial gradients of cellular phospho-proteins. *FEBS Lett.*, 457:452–454, 1999. 2, 5, 6
- [12] L. Bruschi, E. M. Nicola, and M. Bär. Comment on “antispiral waves in reaction-diffusion systems”. *Phys. Rev. Lett.*, 92:089801, 2004. 18

LITERATURVERZEICHNIS

- [13] V. Castets, E. Dulos, J. Boissonade, and P. DeKepper. Experimental evidence of a sustained standing Turing-type nonequilibrium chemical pattern. *Phys. Rev. Lett.*, 64:2953–2956, 1990. [1](#)
- [14] M. Caudron, G. Bunt, P. Bastiaens, and E. Karsenti. Spatial coordination of spindle assembly by chromosome-mediated signaling gradients. *Science*, 309:1373–1376, 2005. [5](#)
- [15] B. Chance, R. W. Estabrook, and A. Gosh. Damped sinusoidal oscillations of cytoplasmic reduced pyridine nucleotide in yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 51:1244–1251, 1964. [17](#)
- [16] B. Chance, B. Hess, and A. Betz. DPNH oscillations in a cell-free extract of *S. carlsbergensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16:182–187, 1964. [17](#)
- [17] S. Danø, M. F. Madsen, and P. G. Sørensen. Quantitative characterization of cell synchronization in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:12732–12736, 2007. [17](#)
- [18] J. M. Davidenko, A. V. Pertsov, R. Salomonsz, W. Baxter, and J. Jalife. Stationary and drifting spiral waves of excitation in isolated cardiac muscle. *Nature*, 355:349–351, 1992. [1](#)
- [19] T. Erber and G. M. Hockney. Equilibrium configurations of N equal charges on a sphere. *J. Phys. A*, 24:1369–1377, 1991. [16](#)
- [20] M. Falcke. Reading the patterns in living cells – the physics of Ca²⁺ signaling. *Adv. Phys.*, 53:255–440, 2004. [8](#), [9](#)
- [21] C. W. Gardiner. *Handbook of Stochastic Methods for Physics, Chemistry and the Natural Sciences*. Springer, Berlin, 2nd edition, 2004. [13](#)
- [22] A. Gierer and H. Meinhardt. A theory of biological pattern formation. *Kybernetik*, 12:30–39, 1972. [1](#)
- [23] A. Goldbeter. Patterns of spatiotemporal organization in an allosteric enzyme model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70:3255–3259, 1973. [19](#)
- [24] A. Goldbeter. On the role of enzyme cooperativity in metabolic oscillations: Analysis of the Hill coefficient in a model for glycolytic oscillations. *Biophys. Chem.*, 6:95–99, 1977. [19](#)
- [25] A. Goldbeter. *Biochemical Oscillations and Cellular Rhythms: The molecular basis of periodic and chaotic behaviour*. Cambridge University Press, Cambridge, 1996. [17](#), [19](#)
- [26] A. Goldbeter and R. Lefever. Dissipative structures for an allosteric model. *Biophys. J.*, 12:1302–1315, 1972. [17](#)

- [27] Y. Gong and D. J. Christini. Antispiral waves in reaction-diffusion systems. *Phys. Rev. Lett.*, 90:088302, 2003. 18
- [28] I. V. Grigoriev, Y. A. Makhnovskii, A. M. Berezhkovskii, and V. Y. Zitserman. Kinetics of escape through a small hole. *J. Chem. Phys.*, 116:9574–9577, 2002. 14
- [29] B. Hess and A. Boiteux. Oscillatory phenomena in biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.*, 40:237–258, 1971. 17
- [30] B. Hess, A. Boiteux, and J. Krüger. Cooperation of glycolytic enzymes. *Adv. Enzyme Regul.*, 7:149–167, 1969. 17
- [31] D. Holcman and Z. Schuss. Stochastic chemical reactions in microdomains. *J. Chem. Phys.*, 122:114710, 2005. 14
- [32] J. Horváth, I. Szalai, and P. DeKepper. An experimental design method leading to chemical Turing patterns. *Science*, 324:772–775, 2009. 2
- [33] R. Hoyle. *Pattern Formation: An Introduction to Methods*. Cambridge University Press, Cambridge, 2006. 1, 3
- [34] A. Hunding and P. G. Sørensen. Size adaption of Turing prepatterns. *J. Math. Biol.*, 26:27–39, 1988. 19
- [35] J. Ichinose, M. Murata, T. Yanagida, and Y. Sako. EGF signalling amplification induced by dynamic clustering of EGFR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 324:1143–1149, 2004. 11
- [36] S. Jakubith, H. H. Rotermund, W. Engel, A. von Oertzen, and G. Ertl. Spatiotemporal concentration patterns in a surface reaction: Propagating and standing waves, rotating spirals, and turbulence. *Phys. Rev. Lett.*, 65:3013–3016, 1990. 1
- [37] P. Kalab, K. Weiss, and R. Heald. Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science*, 295:2452–2456, 2002. 5
- [38] R. Kapral and K. Showalter, editors. *Chemical Waves and Patterns*. Kluwer, Dordrecht, 1995. 1
- [39] J. Kevorkian and J. D. Cole. *Multiple Scale and Singular Perturbation Methods*. Springer, New York, 1996. 3
- [40] B. N. Kholodenko. Cell-signalling dynamics in time and space. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7:165–176, 2006. 2, 6
- [41] B. N. Kholodenko. Spatially distributed cell signaling. *FEBS Lett.*, 583:4006–4012, 2009. 2

- [42] V. S. Kraynov, C. Chamberlain, G. M. Bokoch, M. A. Schwartz, S. Slabaugh, and K. M. Hahn. Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science*, 290:333–337, 2000. 5
- [43] Y. Kuramoto. *Chemical Oscillations, Waves, and Turbulence*. Springer-Verlag, Berlin, 1984. 18
- [44] A. Z. Larsen and U. Kummer. *Information Processing in Calcium Signal Transduction*, pages 153–178. Lecture Notes in Physics. Springer, Berlin Heidelberg New York, 2003. 8
- [45] J. Lauterbach and H. H. Rotermund. Spatio-temporal pattern formation during the catalytic CO-oxidation on Pt(100). *Surface Science*, 311:231–246, 1994. 1
- [46] J. Lechleiter, S. Girard, E. Peralta, and D. Clapham. Spiral calcium waves propagation and annihilation in *Xenopus laevis* oocytes. *Science*, 252:123–126, 1991. 1
- [47] C. Levy and D. Iron. Model of cell signal transduction in a 3-dimensional domain. 2010. Manuskript eingereicht. 7
- [48] J. Linderman and D. A. Lauffenburger. Analysis of intracellular receptor/ligand sorting: Calculation of mean surface and bulk diffusion times within a sphere. *Biophys. J.*, 50:295–305, 1986. 13
- [49] M. F. Madsen, S. Danø, and P. G. Sørensen. On the mechanisms of glycolytic oscillations in yeast. *FEBS J.*, 272:2648–2660, 2005. 17
- [50] T. Mair and S. C. Müller. Travelling NADH and proton waves during oscillatory glycolysis *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 271:627–630, 1996. 1, 17
- [51] H. Meinhardt. *The Algorithmic Beauty of Sea Shells*. Springer, Heidelberg, 1998. 1
- [52] H. Meinhardt and A. Gierer. Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition. *Bioessays*, 22:753–760, 2000. 1
- [53] A. S. Mikhailov. *Foundations of Synergetics I. Distributed Active Systems*. Springer, Berlin, 2nd edition, 1991. 1
- [54] J. Monod, J. Wyman, and J.-P. Changeux. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.*, 6:306–329, 1965. 17
- [55] S. C. Müller, T. Plesser, and B. Hess. The structure of the core of the spiral wave in the Belousov-Zhabotinskii reaction. *Science*, 230:661–663, 1985. 1
- [56] A. Nakamasua, G. Takahashia, A. Kanbea, and S. Kondo. Interactions between zebrafish pigment cells responsible for the generation of Turing patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 106:8429–8434, 2009. 2

- [57] E. M. Nicola, L. Bruschi, and M. Bär. Antispiral waves as sources in oscillatory reaction-diffusion media. *J. Phys. Chem. B*, 108:14733–14740, 2004. 18
- [58] G. Nicolis and Ilya Prigogine. *Self-Organization in Nonequilibrium Systems: From Dissipative Structures to Order through Fluctuations*. Wiley, New York, 1977. 1
- [59] B. Novak and J. J. Tyson. Design principles of biochemical oscillators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9:981–991, 2008. 3
- [60] Q. Ouyang and H. L. Swinney. Transition from a uniform state to hexagonal and striped Turing patterns. *Nature*, 352:610–612, 1991. 1
- [61] C. Pérez-Iratxeta, J. Halloy, F. Morán, J. L. Martiel, and A. Goldbeter. Coexistence of multiple propagating wave-fronts in a regulated enzyme reaction model: link with birhythmicity and multithreshold excitability. *Biophys. Chem.*, 74:197–207, 1998. 19
- [62] L. M. Pismen. *Patterns and Interfaces in Dissipative Dynamics*. Springer, Berlin, 2006. 1, 3
- [63] T. U. Rahman, A. Skupin, M. Falcke, and C. W. Taylor. Clustering of InsP₃ receptors by InsP₃ retunes their regulation by InsP₃ and Ca²⁺. *Nature*, 458:655–659, 2009. 11
- [64] S. Redner. *A Guide to First-Passage Processes*. Cambridge University Press, 2001. 9
- [65] Y. Sako, S. Minoguchi, and T. Yanagida. Single molecule imaging of EGFR signaling on the surface of living cells. *Nat. Cell Biol.*, 2:168–172, 2000. 11
- [66] Z. Schuss, A. Singer, and D. Holcman. The narrow escape problem for diffusion in cellular microdomains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:16098–16103, 2007. 14
- [67] E. E. Sel'kov. Self-oscillations in glycolysis. *Eur. J. Biochem.*, 4:79–86, 1968. 17
- [68] X. Shao, Y. Wu, J. Zhang, H. Wang, and Q. Ouyang. Inward propagating chemical waves in a single-phase reaction-diffusion system. *Phys. Rev. Lett.*, 100:198304, 2008. 17
- [69] S. Sick, S. Reinker, J. Timmer, and T. Schlake. WNT and DKK determine hair follicle spacing through a reaction-diffusion mechanism. *Science*, 314:1447–1450, 2006. 2
- [70] A. Singer, Z. Schuss, and D. Holcman. Narrow escape, part III: Non-smooth domains and Riemann surfaces. *J. Stat. Phys.*, 122:491–509, 2006. 13
- [71] A. Singer, Z. Schuss, D. Holcman, and R. S. Eisenberg. Narrow escape, part I. *J. Stat. Phys.*, 122:437–463, 2006. 14

LITERATURVERZEICHNIS

- [72] I. F. Smith, S. M. Wiltgen, J. Shuai, and I. Parker. Ca^{2+} puffs originate from preestablished stable clusters of inositol triphosphate receptors. *Science Signaling*, 2:ra77, 2009. [11](#)
- [73] D. E. Strier and S. Pance Dawson. Role of complexing agents in the appearance of Turing patterns. *Phys. Rev. E*, 69:066207, 2004. [19](#)
- [74] Y. Tateishi, M. Hattori, T. Nakayama, M. Iwai, H. Bannai, T. Nakamura, T. Michikawa, T. Inoue, and K. Mikoshiba. Cluster formation of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor requires its transition to open state. *J. Biol. Chem.*, 280:6816–6822, 2005. [8](#)
- [75] R. Thul and M. Falcke. Release currents of IP_3 receptor channel clusters and concentration profiles. *Biophys. J.*, 86:2660–2673, 2004. [9](#)
- [76] A. M. Turing. The chemical basis of morphogenesis. *Phil. T. R. Soc. B*, 237:37–72, 1952. [1](#)
- [77] J. J. Tyson, K. C. Chen, and B. Novak. Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr. Op. Cell Biol.*, 15:221–231, 2003. [3](#)
- [78] M. v. Smoluchowski. Versuch einer mathematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloider Lösungen. *Z. Phys. Chem.*, 92:129–168, 1917. [9](#)
- [79] V. K. Vanag and I. R. Epstein. Inwardly rotating spiral waves in a reaction-diffusion system. *Science*, 294:835–837, 2001. [17](#)
- [80] V. K. Vanag and I. R. Epstein. Dash waves in a reaction-diffusion system. *Phys. Rev. Lett.*, 90:098301, 2003. [17](#)
- [81] V. K. Vanag and I. R. Epstein. Segmented spiral waves in a reaction-diffusion system. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 100:14635–14638, 2003. [17](#)
- [82] S. Vermeer. *Spatio-temporal dynamics of glycolysis in an open spatial reactor*. Dissertation, Universität Magdeburg, 2008. [17](#)
- [83] M. J. Ward. Diffusion and bifurcation problems in singularly perturbed domains. *Natural Resource Modeling*, 13:271–302, 2000. [3](#)
- [84] M. J. Ward, W. D. Henshaw, and J. B. Keller. Summing logarithmic expansions for singularly perturbed eigenvalue problems. *SIAM J. Appl. Math.*, 53:799–828, 1993. [3](#), [10](#), [13](#)
- [85] D. Weaver. Diffusion-mediated localization on membrane surfaces. *Biophys. J.*, 41:81–86, 1983. [13](#)

- [86] M. Winey, D. Yarar, T. H. Giddings, Jr., and D. N. Mastronarde. Nuclear pore complex number and distribution throughout the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle by three-dimensional reconstruction from electron micrographs of nuclear envelopes. *Mol. Biol. Cell*, 8:2119–2132, 1997. 16
- [87] T. Yokosuka, K. Sakata-Sogawa, W. Kobayashi, M. Hiroshima, A. Hashimoto-Tane, M. Tokunaga, and M. L. Dustin. Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of ZAP70 and SLP-76. *Nat. Immunol.*, 6:1253–1262, 2005. 11
- [88] L. Zhang, Q. Gao, Q. Wang, H. Wang, and J. Wang. Spiral turbulence developed through the formation of superimposed target waves in an oscillatory reaction-diffusion medium. *Phys. Rev. E*, 74:046112, 2006. 19

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt verschiedene Aspekte der raum-zeitlichen Musterbildung in biologischen oder biologisch motivierten Reaktions-Diffusions-Systemen. Die hierbei auftretenden Muster werden entweder durch die, dem System auferlegten, Randbedingungen oder durch diffusive Kopplung nichtlinearer biochemischer Reaktionen hervorgerufen. Beide Mechanismen spielen für die Modellierung und das grundlegende Verständnis zellulärer Prozesse eine wichtige Rolle.

Im ersten Teil der Arbeit werden Reaktions-Diffusions-Systeme in singular gestörten zwei- oder drei-dimensionalen Gebieten untersucht. Das sind Gebiete mit kleinen Löchern im Innern oder auf dem Rand des Definitionsgebietes. Diese Art Probleme treten in natürlicher Weise bei der Modellierung von zellulären Transport- und Signaltransduktionsprozessen auf, wenn die Zell-Kompartimentierung explizit berücksichtigt wird. Den Löchern entsprechen dann zum Beispiel Cluster auf der Zelloberfläche, Poren oder Ionenkanäle in der Zellmembran oder intrazelluläre Kompartimente, an deren Oberfläche Enzyme lokalisiert sind. Am Rande der Löcher sind der jeweiligen Situation angepasste Bedingungen vorzuschreiben. Insgesamt werden vier verschiedene biologisch motivierte Problemstellungen betrachtet: (i) Die Reaktionsrate diffundierender Teilchen auf einer zylindrischen Oberfläche, (ii) Klassifikation intrazellulärer Signalgradienten, welche durch an der Oberfläche von Kompartimenten lokalisierte Enzyme hervorgerufen werden, (iii) Die Relaxation und stationäre Verteilung diffundierender Teilchen auf der Kugeloberfläche in der Gegenwart N teilweise absorbierender Cluster und (iv) die mittlere Verweilzeit eines diffundierenden Teilchens in einer reflektierenden Kugel mit N kleinen Austrittslöchern auf der Oberfläche.

Zur Lösung dieser teilweise klassischen Probleme war man für $N > 1$ bisher auf numerische Simulationen angewiesen. Die hier unternommenen asymptotischen Analysen zeigen jedoch, dass die Löcher im wesentlichen wie Punktsingularitäten wirken, sodass man die komplizierten Bedingungen am Rande der Löcher durch entsprechende Quellterme in den Reaktions-Diffusionsgleichungen für die „äußere Lösung“ ersetzen kann. Die Quellstärke gewinnt man aus dem Vergleich mit einer entsprechenden „inneren Lösung“, welche in der Nähe der Kompartimente gültig ist. Die diesem Vorgehen zugrunde liegende Theorie der zur Übereinstimmung gebrachten asymptotischen Entwicklungen („matched asymptotic expansions“) liefert für die untersuchten Problemstellungen (i)-(iv) analytische Ausdrücke, die in den Fällen (ii)-(iv) auch explizit von der räumlichen Anordnung der Kompartimente abhängen.

Im Zuge der Entwicklung hochauflösender Fluoreszenzspektroskopie wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl biologischer Prozesse auf subzellulärer Ebene beobachtet. Die hier gewonnenen Ergebnisse können sowohl für einen quantitativen Vergleich mit solchen experimentellen Daten als auch als Grundlage zur Formulierung neuer mathe-

matischer Modelle in realistischen Zellgeometrien dienen. Die Anwendungen reichen von der Abschätzung der mittleren Verweilzeit und der räumlichen Verteilung von Signalmolekülen im Zellkern, in der Zelle oder auf Biomembranen bis hin zur Berechnung von Diffusions-limitierten Reaktionsraten.

Der zweite Teil der Arbeit wurde durch den experimentellen Befund über einwärts rotierende Spiralwellen in einem glykolytischen Enzymsystem motiviert. Im Gegensatz zu den im ersten Teil der Arbeit untersuchten Systemen stellt die Glykolyse ein „klassisches“ Reaktions-Diffusions-System dar, in dem raum-zeitliche Muster durch diffusive Kopplung oszillatorischer enzymatischer Reaktionen entstehen können. Für die Untersuchung spielten zwei Aspekte eine wichtige Rolle: Zum einen wurden einwärts rotierende Spiralwellen bisher nur in rein chemischen Systemen beobachtet. Zum anderen wurden sie auch noch nie in numerischen Simulationen mit glykolytischen Modell-Systemen generiert, sodass die Frage bestand, ob man die Entstehung solcher Anti-Spiralen überhaupt im Rahmen bestehender Modelle, wie dem Sel'kov- oder dem Goldbeter-Modell, verstehen kann. Beide Modelle beschreiben die lokal oszillatorische Kinetik der Glykolyse allein über die allosterische Regulation des glykolytischen Enzyms Phosphofruktokinase (PFK). Aber während im Sel'kov-Modell eine einfache Hill-Kinetik zur Beschreibung der Enzym-Aktivierung benutzt wurde, setzte Goldbeter auf den realistischen Monod-Wyman-Changeux-Mechanismus.

Um die musterbildenden Eigenschaften beider Modelle vergleichen zu können, wurde die Tatsache benutzt, dass die raum-zeitliche Dynamik in der Nähe einer oszillatorischen Instabilität durch eine zugeordnete komplexe Ginzburg-Landau Gleichung beschrieben wird. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Anti-Spiralen nur im Goldbeter-Modell, nicht aber im Sel'kov-Modell entstehen können, da diese im letzteren Fall immer von der ebenfalls auftretenden Turing-Instabilität unterdrückt werden. Offenbar spielt für das Entstehen einwärts rotierender Spiralwellen sowohl der, in früheren Arbeiten nicht beachtete, hohe Oligomerisierungsgrad der Hefe-PFK als auch subtile Eigenschaften der Enzymkooperativität eine entscheidende Rolle. Beide Vorhersagen können, im Prinzip, auch experimentell überprüft werden.

Die Abbildung von Reaktions-Mechanismen auf eine entsprechende Amplitudengleichung stellt eine systematische Methode dar, um zu einem tieferen Verständnis darüber zu gelangen wie sich Details im molekularen Mechanismus auf die Ausbildung und die Stabilität makroskopischer Muster auswirken. Für biologische Netzwerke wurden ähnliche Analysen hauptsächlich in Reaktionssystemen ohne räumliche Kopplung vorgenommen, wo sie zur Entdeckung einer Reihe von Netzwerk-Motiven geführt haben, die ein bestimmtes dynamisches Verhalten, wie Oszillationen oder Bistabilität, hervorrufen können. Die hier angestrebten Untersuchungen bilden einen ersten Schritt zur Übertragung dieser Erkenntnisse auf räumlich ausgedehnte Systeme.

Danksagung

An dieser Stelle sei all denjenigen gedankt, die mich während meines Habilitationsvorhabens, sei es durch wissenschaftliche Kooperation oder gewissenhaftes Korrekturlesen der Habilitationsschrift, unterstützt haben. Allen voran Prof. Dr. Klaus Kassner, der sich sofort bereit erklärt hat, mein Habilitationsvorhaben von fachlicher Seite zu betreuen und Junior-Professor Dr. Marcus Hauser für sein ausgezeichnetes „Consulting“ .

Weiterhin möchte ich Prof. em. Dr.-Ing. Dr. h.c. mult. Ernst-Dieter Gilles danken. In seiner Arbeitsgruppe für Systembiologie am Max Planck Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme ist ein Großteil der hier vorgelegten Arbeiten entstanden. Ohne die eingeräumten Freiräume, die er mir neben der Bearbeitung MPI-interner Projekte für meine eigene Forschung gelassen hat, wäre eine Habilitation zum gegenwärtigen Zeitpunkt kaum denkbar gewesen.

Der wissenschaftliche Grundstein zu dieser Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Martin Falcke (jetzt: Max-Delbrück-Zentrum für molekulare Medizin, Berlin-Buch) am ehemaligen Hahn-Meitner-Institut Berlin (jetzt: Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie) gelegt. Er hatte damals die Frage nach der Clusterrate diffundierender Ionenkanäle auf einer zylindrischen Membranoberfläche aufgeworfen und damit die Tür zur Untersuchung von Reaktions-Diffusions-Systemen in singular gestörten Gebieten geöffnet. Methodisch habe ich von den Vorarbeiten von Prof. Michael Ward (Universität Vancouver, Kanada) profitiert. Die langjährige, äußerst effektive Zusammenarbeit mit ihm ist ein gutes Beispiel dafür, dass auch eine rein E-Mail-basierte Kooperation sehr erfolgreich sein kann.

Der zweite Teil der Arbeit wurde durch die von Dr. Thomas Mair¹ und Dr. Satenik Vermeer (jetzt: Chemie Berlin AG) durchgeführten Experimente zur Musterbildung in der Glykolyse inspiriert. Bei dem Vorhaben, die dabei gefundenen einwärts rotierenden Spiralwellen auf molekularer Ebene zu verstehen, hat mich Dr. Ernesto M. Nicola (Universität der Balearischen Inseln, Palma de Mallorca, Spanien) in theoretischen Fragen unterstützt. Allen dreien sei an dieser Stelle herzlichst gedankt.

Zum Schluß ist es mir ein besonderes Anliegen auch meiner Frau und meinen beiden Kindern für ihre anhaltende Unterstützung zu danken, denn meinem wissenschaftlichen Treiben ist in den vergangenen 5 Jahren nicht nur die Schwärze meiner Haare, sondern auch zahlreiche Feierabende und Wochenenden zum Opfer gefallen.

¹Dr. Thomas Mair (* 11.08.1959 in Bonn; † 13.06.2010 bei einem Motorrad-Unfall nahe Saalfeld)

Liste relevanter Publikationen

- A1** Straube R, Ward MJ, Falcke M (2007)
„Reaction rate of small diffusing molecules on a cylindrical membrane“
Journal of Statistical Physics **192**, 377–405.
- A2** Bagyan S, Mair T, Suchorski Y, Hauser MJB, Straube R (2008)
„Spatial desynchronization of glycolytic waves as revealed by Karhunen–Loève analysis“ *Journal of Physical Chemistry B* **112**, 14334–14341.
- A3** Straube R, Ward MJ (2009)
„An asymptotic analysis of intracellular signaling gradients arising from multiple small compartments“
SIAM Journal of Applied Mathematics **70**, 248–269.
- A4** Coombs D, Straube R, Ward MJ (2009)
„Diffusion on a sphere with localized traps: Mean first passage time, eigenvalue asymptotics, and Fekete points“
SIAM Journal of Applied Mathematics **70**, 302–332.
- A5** Cheviakov AF, Ward MJ, Straube R (2010)
„An asymptotic analysis of the mean first passage time for narrow escape problems: Part II: The sphere “
SIAM Multiscale Modeling and Simulation **8**, 836–870.
- A6** Straube R, Vermeer S, Nicola EM, Mair T (2010)
„Inward rotating spiral waves in glycolysis“
Biophysical Journal **99**, L4–L6.
- A7** Straube R, Nicola EM (2010)
„Diffusive coupling can discriminate between different reaction mechanisms in an allosteric enzyme system“
BMC Systems Biology **165**:4.