

Kalzium-Oszillationen

Synchronisation heterogener Zellen

Christian Senger #3786150

18. Januar 2006

Zusammenfassung

Um ein besseres Verständnis der Entstehung von Kalziumwellen in der Zelle und deren Ausbreitung über mehrere Zellen zu erhalten, werden seit Ende der 80er Jahre mathematische (Computer-)Modelle entwickelt, die Entstehung und Ausbreitung der Wellen simulieren. Diese Modelle ermöglichen es, ohne Experimente an der lebenden Zelle Kalziumwellen in einer Zelle und die Fortbewegung über mehrere Zellen zu beobachten. Einzelne Parameter, wie z.B. die Größe der Zellmembran können verändert, und die Auswirkungen auf die Oszillationen im einzelnen beobachtet werden. Die hier behandelte Arbeit [Höf99] stammt von Thomas Höfer, der aufbauend auf vorangehenden Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen (z.B. [YK92]) das hier vorgestellte Modell entwickelt hat. So werden anhand des Modells die Einflüsse von Änderungen an strukturellen Parametern und der Kopplung über Gap-Junctions betrachtet. In weiteren Arbeiten ([SMH02]) hat Höfer sein Modell verfeinert, bzw. wurden andere verfeinerte Modelle vorgestellt (z.B. [WJZ⁺]), die hier aber aufgrund des beschränkten Rahmens nicht behandelt werden.

Einleitung

Die Tatsache, dass sich Kalziumwellen, die in Hepatocyten durch die Stimulation von Noradrenalin und Vasopressin ausgelöst werden, synchronisiert über ganze Leberläppchen ausbreiten, ist experimentell gut untersucht. Der Mechanismus hingegen, der zu der Synchronisierung der Zellen führt, ist bzw. war zum Zeitpunkt der Herausgabe des Artikels nicht aufgeklärt. Im besonderen ist zu beachten, dass die Zellen jeweils eigene z.T. stark unterschiedliche intrinsische Frequenzen aufweisen.

Eine mögliche Hypothese besteht in der Annahme, dass die Synchronisierung der Zellen durch den Ca^{2+} Fluss durch die Zellen verbindenden Gap-Junctions entsteht. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde das hier vorgestellte Modell erstellt und analysiert. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Zellen durch parakrines Signalisieren (z.B. durch InsP_3 , das im dem behandelten Artikel als der ausschlaggebende Auslöser für die Oszillation betrachtet wird), ebenfalls über die Gap-Junctions miteinander „kommunizieren“. Letztere Variante wurde in dem Artikel (außer in der Diskussion) nicht weiter analysiert. **Es sollen also die Fragestellungen beantwortet werden, ob (1) für die Synchronisierung der Kalziumoszillationen zwischen Hepatozyten die Ca^{2+} -Flüsse über die Gap-Junctions verantwortlich sind und (2) unter welchen Bedingungen sich diese Zellen mit unterschiedlichen intrinsischen Frequenzen synchronisieren**

Modellannahmen

Es wird davon ausgegangen, dass nur InsP_3 über den IP_3 -Rezeptor am Endoplasmatischen Reticulum (ER) die Oszillationen auslöst. In dem Modell wird davon ausgegangen, dass der Kalziumfluss durch die Gap-Junctions *alleine* für die Synchronisierung der Kalziumwellen verantwortlich ist. Ein Feedback über InsP_3 wird nicht angenommen. Experimentellen Untersuchungen von [TBCC97] folgend, die Zellpaare und -triplets untersuchten, basiert das Modell im weiteren auf fünf beobachteten Eigenschaften:

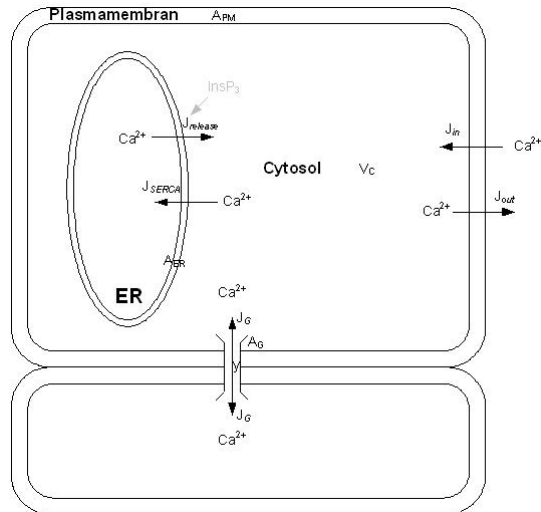


Abbildung 1: Modell der Zelle mit den modellierten Elementen

$$\frac{dx}{dt} = \frac{A_{PM}}{C_C} (J_{in} - J_{out}) + \frac{A_{ER}}{C_C} (J_{rel} - J_{SERCA}) + \frac{A_G}{C_C} J_G$$

Abbildung 2: Gleichung 1, Kalziumkonzentration im Cytosol

- (1) Bei gleicher Stimulation von Zellen mit intakten Gap-Junctions durch ein Hormon führt zu beinahe synchronen Oszillationen, die Peaks stehen in einer 1:1-Beziehung zueinander, die Phasenverschiebung liegt unter 10%.
- (2) Wird nur eine Zelle mit dem Hormon stimuliert, oszilliert diese, während benachbarte Zellen keine Oszillation aufweisen.
- (3) Eine Unterbrechung von Gap-Junctions führt zum sofortigen Verlust der Synchronität.
- (4) Die Wiederherstellung der Verbindung durch die Gap-Junctions führt nach wenigen Oszillationszyklen zur Wiederherstellung der Synchronität.
- (5) Die Zelle, die im ungekoppelten Zustand die höchste Frequenz aufweist, gibt die gemeinsame Geschwindigkeit im gekoppelten Verband vor.

Das Modell

In Abbildung 1 sind die modellierten Eigenschaften der Hepatocyten dargestellt. Neben den strukturellen Eigenschaften der Zelle wie der Plasmamembran, der Membran des ER, dem Cytosol, dem Volumen des ER, und den Gap-Junctions sind die Kalziumflüsse („Release“ aus dem ER, Einfluss über die Zellmembran, Aufnahme ins ER, Ausfluss aus der Zelle über die Zellmembran, und der Fluss über die Gap-Junctions) modelliert worden. Diese einzelnen Elemente des Modells werden im folgenden detailliert beschrieben.

$$\frac{dz}{dt} = \frac{A_{PM}}{C_C} (J_{in} - J_{out}) + \frac{A_G}{C_C} J_G.$$

Abbildung 3: Gleichung 2, Kalziumkonzentration der gesamten Zelle

Cytosol und Zelle

Zunächst wird der Kalziumgehalt der Zelle beschrieben (s. Gleichung in Abbildung 2), unter Berücksichtigung der Oberfläche der Plasmamembran (A_{PM}), der Kapazität des Cytoplasmas (C_C , beinhaltet Volumen und Pufferkapazität des Cytosols), des Ein- und Ausflusses von Kalzium über die Plasmamembran (J_{in} , J_{out}), der Oberfläche des ERs (A_{ER}), die Flüsse aus dem ER hinaus und hinein (J_{REL} und J_{SERCA}), der Oberfläche der Gap-Junction (A_G) und des Kalziumflusses über die Gap-Junction (J_G).

Die Gleichung in Abbildung 3 beschreibt die Kalziumkonzentration in der gesamten Zelle.

ER-Release

Der Kalziumrelease J_{rel} beschreibt, abgeleitet von [YK92] den Ca^{2+} -Release-Fluss aus dem ER, der durch eine bestimmte Konzentration $InsP_3$ ausgelöst wird. Diese Konzentration fließt in J_{rel} ebenso mit ein, wie der maximal mögliche Release, ein Leakage-Fluss, die Aktivierungszeit ($InsP_3$ -abhängig) und die Inaktivierungszeit (kalziumabhängig). Der Einfluss der beiden letztgenannten Parameter auf die Oszillation selbst wird negiert, da die kalziumabhängige Inaktivierung von IP_3R innerhalb von ca. 1s abläuft, wohingegen die Spikes der beobachteten Oszillationen zwischen 10 und 30s andauern. Als treibende Kraft für den Release (und damit auch der Oszillation) wird der Term $y - x$ multipliziert, mit y als der Ca^{2+} -Konzentration des ERs.

ER-Aufnahme und Ausfluss durch die Zellmembran

J_{SERCA} der Einfluss von Kalzium in das ER und J_{out} der Ausfluss von Kalzium aus der Zelle stehen jeweils in einer quadratischen Abhängigkeit vom im Cytosol vorhandenen Kalzium und der Literatur entnommenen Konstanten.

Kalzium Einfluss in die Zelle

Der Einfluss von Kalzium in die Zelle J_{in} wird von einer ständig vorhandenem Einfluss, einem Leck, der $InsP_3$ -Konzentration, einer Maximalrate und Konstanten aus der Literatur beschrieben.

Strukturelle Parameter der Zelle

Drei strukturelle Charakteristika der Zellen werden definiert: $\rho = \frac{A_{PM}}{C_C}$, $\alpha = \frac{A_{ER}}{A_{PM}}$, $\beta = \frac{C_{ER}}{C_C}$, also Quotienten von Plasmamembran zur cytosolischen Kapazität, Membran des ER zur Plasmamembran und der Kapazität des ER zur cytosolischen Kapazität.

Kopplung von Zellen - Gap-Junctions

Der Kalziumfluss durch die Gap-Junctions $j_{G,ij} = \Pi_{ij}(x_j - x_i)$ wird mit der Permeabilität Π zwischen den Zellen i und j beschrieben, die auch bei durch die Oszillationen veränderten Kalziumkonzentrationen gleich bleibt und als symmetrisch $\Pi_{ij} = \Pi_{ji}$ angenommen wird, multipliziert mit der Differenz der Kalziumkonzentration im Cytosol der Zellen i und j .

$$\begin{aligned} \frac{dx_i}{dt} &= \rho_i \left[v_0 + v_c \frac{P}{K_0 + P} - v_4 \frac{x_i^2}{K_4^2 + x_i^2} \right. \\ &\quad \left. + \alpha_i \left[k_r(x, P) \beta_i^{-1} (z_i - (1 + \beta_i)x_i) \right. \right. \\ &\quad \left. \left. - v_3 \frac{x_i^2}{K_3^2 + x_i^2} \right] \right] + \gamma(x_j - x_i), \\ \frac{dz_i}{dt} &= \rho_i \left(v_0 + v_c \frac{P}{K_0 + P} - v_4 \frac{x_i^2}{K_4^2 + x_i^2} \right) \\ &\quad + \gamma(x_j - x_i), \end{aligned}$$

IP₃R release function

$$k_r(x_i, P) = k_1 \frac{\left(d_2 \frac{d_1 + P}{d_3 + P} P x_i \right)^3}{(d_p + P)^3 (d_a + x_i)^3 \left(d_2 \frac{d_1 + P}{d_3 + P} + x_i \right)^3} + k_2$$

Abbildung 4: Gleichungen des Gesamtmodells

Ein Kopplungskoeffizient für die Gap-Junction zwischen den Zellen i und j wird durch $\gamma_{ij} = \frac{A_{G,ij} \Pi_{ij}}{C_{C,i}}$ definiert.

Das Gesamtmodell

Das Gesamtmodell wird durch Einsetzen der aufgestellten Gleichungen erhalten. In Abbildung 4 sind die Gesamtgleichungen für die cytosolische (x), die Gesamtzellen- (z) Konzentrationen der Zelle i aufgestellt. Zusätzlich ist die Release-Funktion des IP₃R dargestellt. Die hier nicht erklärten Parameter sind in dem Artikel detailliert beschrieben.

Versuche und Ergebnisse

Oszillationen in einer Zelle

In dem aufgestellten Modell oszilliert die Kalziumkonzentration des Cytoplasmas (s. Abbildung 5), und phasenverschoben auch die Konzentration im ER. Die Periodendauer liegt zwischen 30s und 3min, während die Spikedauer ca. 10s beträgt.

Abhängigkeit von der Konzentration des Agonisten

Mit einer Latenzzeit, die von der Konzentration des Agonisten abhängt, setzen die Kalziumwellen ein - je höher die Konzentration ist, desto geringer ist die Latenzzeit bis zum Einsetzen der Os-

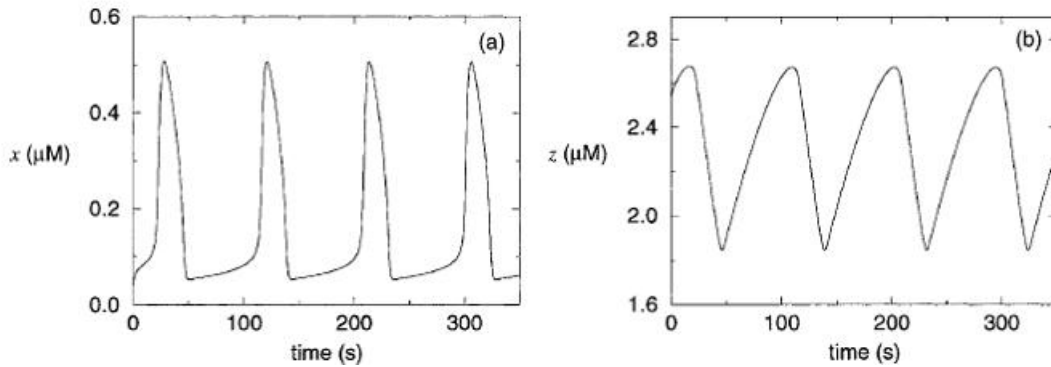


Abbildung 5: Oszillation a) im Cytosol, b) der gesamten Zelle

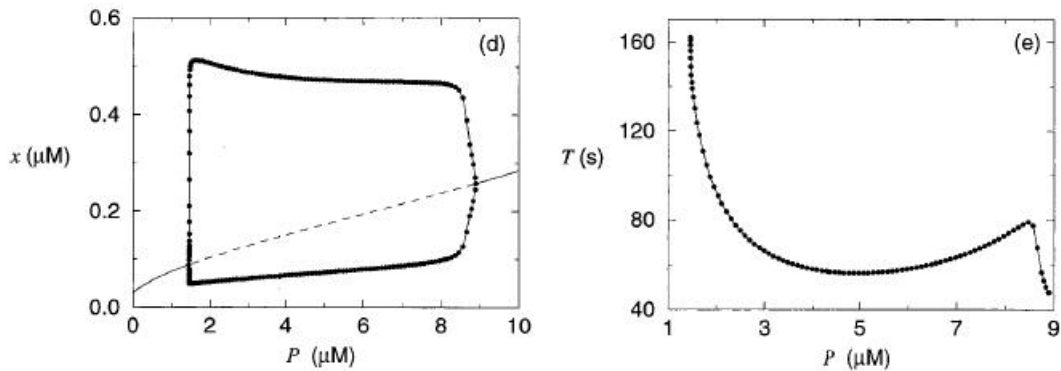


Abbildung 6: Abhängigkeit der Oszillation (Kalziumkonzentration x und deren Periodendauer T) von der Agonistenkonzentration P

zillation. Mit einer Erhöhung der Agonistenkonzentration erhöht sich deutlich auch die Frequenz, wobei es einen kritischen Bereich gibt. Erhöht sich die InsP_3 -Konzentration über diesen Bereich hinaus, oszilliert die Kalziumkonzentration nicht weiter (siehe Abbildung 6).

Exkurs: Bifurkationsplot

In Abbildung 7 ist der Weg aufgezeigt, auf dem man den Bifurkationsplot (Abbildung 6 links) erhält. Zunächst werden die geplotteten Oszillationen des Cytosols (x) und der gesamten Zelle (z) gegeneinander geplottet, so dass ein Trajektor entsteht, der die Oszillation bei einer Agonistenkonzentration von $P = 0$ beschreibt. Die gestrichelten Linien geben die Nullclines (also die N-förmige bei $dx/dt = 0$ und die vertikale bei $dz/dt = 0$) an, deren Schnittpunkte mit dem Trajektor die Minima und Maxima bilden. Der Bifurkationsplot (Abbildung 6 bildet nun die Minima und Maxima von x ab, wobei P , die InsP_3 -Konzentration verändert wird).

In dem Plot ist deutlich zu sehen, dass bei einer bestimmten Konzentration eine Bifurkation geschieht und das stabile System in einen instabilen, oszillierenden Zustand übergeht, und später bei einer zweiten Bifurkation der stabile Zustand wiederhergestellt wird, die Oszillationen enden.

Abhängigkeit von strukturellen Parametern

Die Ursache der unterschiedlichen intrinsischen Frequenzen der Zellen wird mit dem Modell durch deren unterschiedliche strukturelle Parameter erklärt (Abbildung 8). Während eine Veränderung in α (Verhältnis von Plasma- zu ER-Membranoberfläche) keine Veränderung in der Frequenz hervorruft, wird durch eine Erhöhung von β (Vergrößerung der ER-Kapazität oder Verringerung der cy-

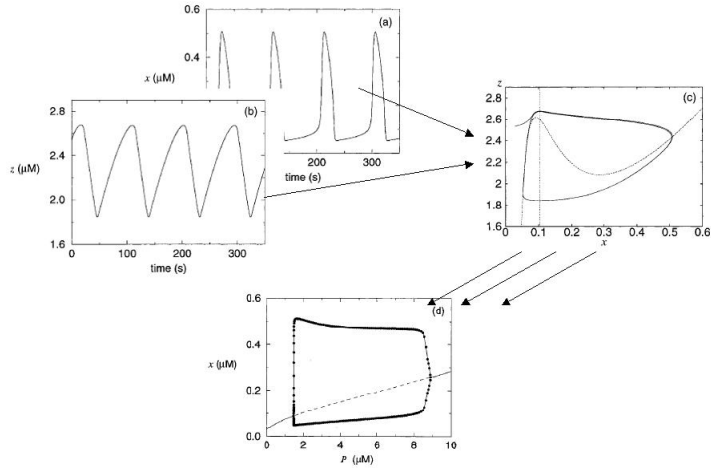


Abbildung 7: Beschreibung des Wegs zum Bifurkationsplot

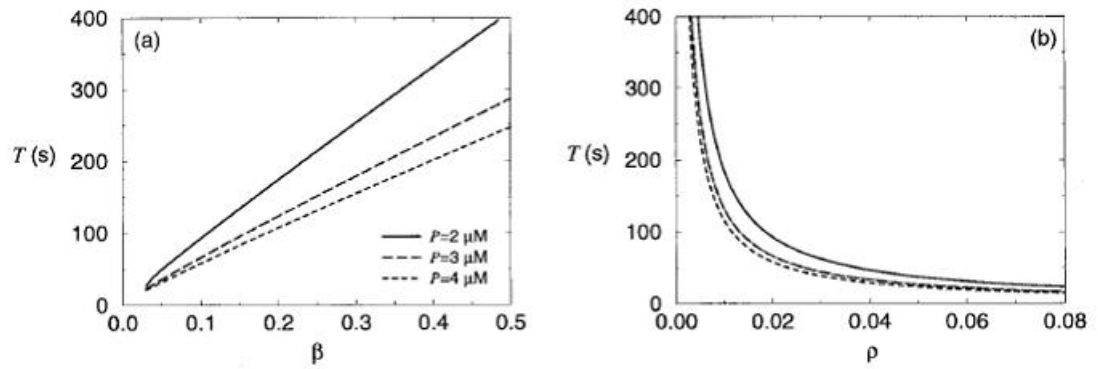


Abbildung 8: Abhängigkeit der Periodendauer T von den strukturellen Parametern β und ρ

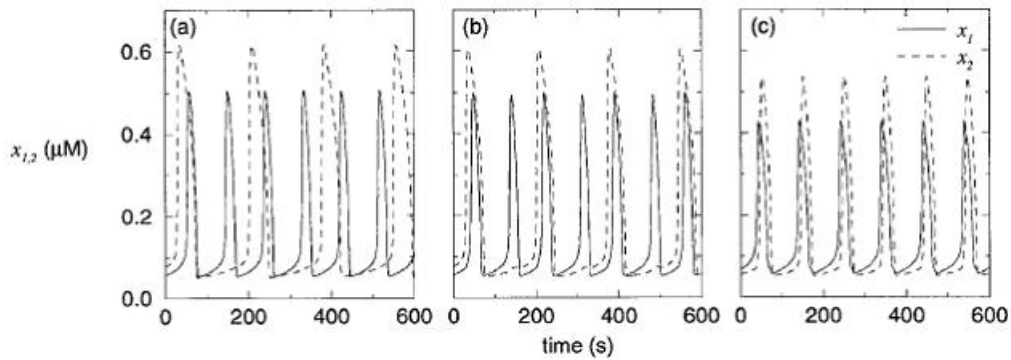


Abbildung 9: Synchronisation gekoppelter Zellen a) *unlocked*, b) *locked*, c) *synchrony*

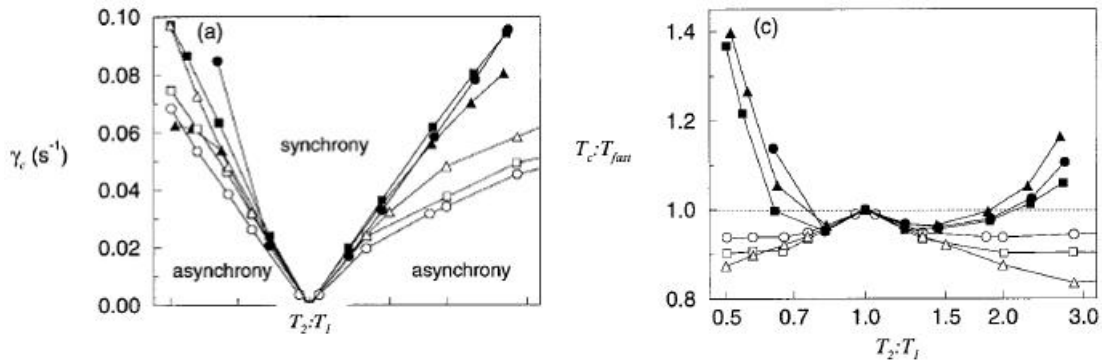


Abbildung 10: Intrinsische Frequenzen und Kopplungskoeffizienten bei veränderten strukturellen Parametern - gefüllte Zeichen: Änderungen an β , leere Zeichen: Änderungen an ρ - bei unterschiedlichen Agonistenkonzentrationen (Kreis: $2\mu\text{M}$, Rechteck: $3\mu\text{M}$, Dreieck: $4\mu\text{M}$)

tosolischen Kapazität) die Periodendauer deutlich erhöht. Eine Vergrößerung der Plasmamembran gegenüber der cytosolischen Kapazität oder der Verringerung von der Kapazität (Erhöhung von ρ) führt zu einer deutlich höheren Frequenz.

Oszillationen in gekoppelten Zellen

Einfluss des Kopplungskoeffizienten

Das Modell verdeutlicht, dass synchrone Oszillation erst ab einem Kopplungskoeffizienten bestimmter Größe auftritt, aber selbst dann noch leichte Phasenverschiebungen auftreten (Abbildung 9). Unter einem bestimmten Grenzwert von γ stehen die Spikes der Oszillationen in einem festen Verhältnis zueinander. Wird γ weiter verringert, geht auch dieser „harmonic lock“ verloren, und die Zellen oszillieren mit ihren intrinsischen Frequenzen.

Einfluss struktureller Parameter

In Abbildung 10 (links) wird gezeigt, welche Kopplungskoeffizienten nötig sind, um eine Synchronisation zweier Zellen herbeizuführen, bei unterschiedlichen intrinsischen Frequenzen und unterschiedlichen Koeffizienten β und ρ . Im allgemeinen wird für Zellen mit stark voneinander abweichenden Frequenzen ein größeres γ benötigt. Der rechte Teil der Abbildung zeigt, in wie weit sich

die gemeinsame Frequenz der Frequenz der schnelleren Zelle anpasst. Interessant ist, dass hier bei einer Veränderung an ρ die gemeinsame Frequenz immer niedriger ist, als die der schnellsten Zelle.

Untersuchung der Gap-Junctions

Im Modell wurde die Unterbrechung der Gap-Junctions simuliert. Der Kopplungskoeffizient wurde auf $\gamma = 0$ gesetzt, die Synchronisation ging verloren. In einem weiteren Schritt wurde γ wieder heraufgesetzt, woraufhin sich die Oszillationen nach einem Periodendurchgang der langsamer oszillierenden Zelle wieder synchronisierten.

Anhand eines modellierten Zelltriplets (C1-C2-C3) wurde zunächst festgestellt, dass in diesem Modell auch kleinere Zellverbände synchronisiert oszillieren. Die Auswirkung einer Blockade der IP_3 -Rezeptoren in der mittleren Zelle wurden getestet, in dem k_1 (maximale Flussrate aus dem ER) in J_{rel} und v_0 (Kalziumeinfluss-Leck in der Zellmembran) in J_{in} jeweils auf 0 gesetzt wurden. Die mittlere Zelle wies so, ohne Sensibilisierung durch den Agonisten, keine Oszillationen mehr auf. Die verbleibenden oszillierenden Zellen waren nicht synchronisiert, d.h. die Synchronisierung erfolgt immer über direkt benachbarte Zellen, es existiert kein Kalziumfluss durch eine nicht sensibilisierte Zelle. Allerdings wurde auch festgestellt, dass bei einer geringen Sensibilisierung der mittleren Zelle diese nicht notwendigerweise oszillieren muss, um das Signal und damit auch die Synchronisierung weiterzugeben.

Im weiteren wurde die Beobachtung gemacht, dass bei zu großem γ in diesem Modell die gemeinsame Frequenz sich der Mitte zwischen den unterschiedlichen Frequenzen annähert.

Diskussion

Die notwendige Sensibilisierung aller Zellen durch den Agonisten, damit diese oszillieren können, entspricht experimentellen Ergebnissen.

Die Annäherung an das Mittel der Frequenzen bei zu großem γ wurde in der Literatur und in Experimenten bisher nicht beschrieben bzw. beobachtet.

Die Kopplungskoeffizienten, die mit dem Modell gefunden wurden, befinden sich an der Obergrenze in der Literatur beschriebener Kopplungswerte. Als mögliche Ursache hierfür kommt in Betracht, dass die räumliche Ausbreitung des Kalziums nach dem Austritt aus den Gap-Junctions nicht korrekt modelliert wurde. Es ist denkbar, dass eine geringe Menge Kalzium ausreicht, um in der Nähe der Gap-Junctions den Release aus Speichern freisetzt, und so das Kalziumsignal in der Zelle verstärkt wird. Damit würde eine schwächere Kopplung der Zellen ausreichen, um das Signal weiterzuleiten.

Es bleibt in diesem Artikel unbeantwortet, ob das Modell die Ausbreitung über große Zellverbände, wie z.B. ganze Leberläppchen modellieren könnte, um auch dort Parameter genauer zu bestimmen. Ebenso ist die Ausbreitung in anderen Zelltypen als Hepatocyten von Interesse. Ebenfalls offen bleibt die Rolle, die der möglichen Diffusion von $InsP_3$ durch die Gap-Junctions zukommt, wie auch die Diffusion möglicher weiterer Signalträger wie z.B. ATP. Diese Ansätze oder Teile davon sind in später folgenden Arbeiten von mehreren Arbeitsgruppen (z.B. [WJZ⁺]) und auch dem Autor selbst verfolgt worden.

Zusammenfassung

Mit der hier beschriebenen Arbeit wurden Kalziumoszillationen in Hepatozyten und deren Synchronisierung über mehrere Zellen modelliert. Es wurde gezeigt, dass die Synchronisierung aufgrund des Kalziumflusses durch die Gap-Junctions möglich ist. Es wurden Grenzwerte der nötigen Agonistenkonzentration, die für die Oszillation notwendig ist, über das Modell erhalten. Ebenso wurden die für die Synchronisierung notwendigen Kopplungsstärken zwischen den Zellen bestimmt.

Literatur

- [Höf99] Thomas Höfer, *Model of intercellular calcium oscillations in hepatocytes: Synchronization of heterogeneous cells*, Biophysical Journal **77** (1999), 1244–1256.
- [SMH02] Stefan Schuster, Marko Marhl, and Thomas Hofer, *Modelling of simple and complex calcium oscillations - from single-cell responses to intercellular signalling*, Eur. J. Biochem **269** (2002), 1333–1355.
- [TBCC97] Thierry Tordjmann, Brigitte Berthon, Michel Claret, and Laurent Combettes, *Coordinated intercellular calcium waves induced by noradrenaline in rat hepatocytes: dual control by gap junction permeability and agonist*, The EMBO Journal **16** (1997), no. 17, 5398–5407.
- [WJZ⁺] Dan Wu, Ya Jia, Xuan Zhan, Lijian Yang, and Quan Liu, *Effects of gap junction to ca^{2+} and to $ip3$ on the synchronization of intercellular calcium oscillations in hepatocytes*, Biophysical Chemistry **113**, no. 2.
- [YK92] GARY W. DE YOUNG and JOEL KEIZER, *A single-pool inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in ca^{2+} concentration*, Biophysics **89** (1992), 9895–9899.