

ÜBER DIE MECHANISMEN DER  
SELBSTORGANISATION DER BAKTERIELLEN  
PROTEINE MIND UND MINE SOWIE DER  
PROTEINKINASE PKC $\alpha$

Dissertation zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät II  
- Physik und Mechatronik -  
Universität des Saarlandes

von  
MIKE BONNY

Saarbrücken

2014

Tag des Kolloquiums: 29.05.2015

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Georg Frey

Mitglieder des

Prüfungsausschusses: Univ.-Prof. Dr. Albrecht Ott

Univ.-Prof. Dr. Dr. Karsten Kruse

Univ.-Prof. Dr. Heiko Rieger

Prof. Dr. Uwe Thiele

Dr.-Ing. Andreas Tschöpe

## ABSTRACT

---

In this thesis, we use experimental and theoretical methods to analyse the spatiotemporal distribution of the bacterial proteins MinD and MinE and the protein kinase PKC $\alpha$ .

The Min proteins oscillate between the two cell poles in the rod-shaped bacteria *E.coli* to restrict division to midcell. Recent investigations could show that in addition to MinD, MinE can also bind to the membrane. In this thesis, we show that by accounting for this finding in a computational model, we can comprehensively describe all observed Min-protein patterns in vivo and in vitro. Furthermore our computational model could predict two new patterns in living *E.coli* cells. These predictions could be confirmed experimentally.

The ubiquitously expressed protein kinase PKC $\alpha$  is a member of the protein kinase C family and plays an essential role in signal transduction. The activation of PKC $\alpha$  is effected by the Ca<sup>2+</sup>-dependent binding of PKC $\alpha$  via its C<sub>2</sub> domain to the phosphoglycerides (PS) of the membrane, followed by the interaction of the C<sub>1</sub> domain with the second messenger diacylglycerol (DAG). The lifetime of the Ca<sup>2+</sup> occupied C<sub>2</sub>-PS complex is very short, compared to the time, the protein needs to find DAG and its target protein. In this thesis, we show by the interplay of experimental and theoretical methods that membrane-bound PKC $\alpha$  molecules can interact intramolecularly and thus stabilise the Ca<sup>2+</sup>-dependent membrane interaction.

## ZUSAMMENFASSUNG

---

In dieser Arbeit untersuchen wir mit Hilfe von experimentellen und theoretischen Methoden die raumzeitliche Verteilung der Proteine MinD und MinE sowie der Proteinkinase PKC $\alpha$ .

Die Min-Proteine oszillieren im stäbchenförmigen Bakterium *E.coli* zwischen den beiden Zellpolen und beschränken damit die Zellteilung auf die Zellmitte. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass neben MinD auch MinE Moleküle an die Membran binden können. Unter Berücksichtigung dieser neuen Erkenntnis, zeigen wir mit Hilfe einer theoretischen Beschreibung, dass wir alle bis dato bekannten Muster der Min-Proteine in vivo und in vitro reproduzieren können. Zusätzlich konnte unsere Beschreibung zwei neue Muster in lebenden *E.coli* Zellen voraussagen, die wir experimentell bestätigen konnten.

Die ubiquitär exprimierte Proteinkinase PKC $\alpha$  spielt als Mitglied der Proteinkinase C Familie eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion. Die Aktivierung von PKC $\alpha$  erfolgt durch die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Bindung der C<sub>2</sub>-Domäne des Proteins an die Phosphatidylserine (PS) der Membran und der anschließenden Interaktion der C<sub>1</sub>-Domäne mit dem sekundären Botenstoff Diacylglycerol (DAG). Die Lebensdauer des Ca<sup>2+</sup>-besetzten C<sub>2</sub>-PS Komplexes ist sehr kurz im Vergleich zur Zeit, die PKC $\alpha$  benötigt DAG und ein Zielprotein zu finden. Durch das Zusammenspiel von experimentellen und theoretischen Methoden können wir in dieser Arbeit zeigen, dass membrangebundene PKC $\alpha$  Moleküle intermolekular wechselwirken und damit die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Membraninteraktion stabilisieren.

## PUBLIKATIONEN

---

Inhalte dieser Dissertation wurden in folgenden Arbeiten veröffentlicht:

Schweizer, Jakob ; Loose, Martin ; Bonny, Mike ; Kruse, Karsten ; Mönch, Ingolf ; Schwille, Petra: Geometry sensing by selforganized protein patterns. In: *PNAS* 109 (Sep. 2012) Nr. 38, S. 15283–15288

Bonny, M. ; Fischer-Friedrich, E. ; Loose, M. ; Schwille, P. ; Kruse, K.: Membrane Binding of MinE Allows for a Comprehensive Description of Min-Protein Pattern Formation. In: *PLoS Comput Biol* 9 (2013) Nr. 12, e1003347

Wettmann, L ; Bonny, M ; Kruse, K: Effects of molecular noise on bistable protein distributions in rod-shaped bacteria. In: *Interface Focus* 4 (2014) Nr. 6, S. 20140039

Bonny, M. ; Schweizer, J. ; Loose, M. ; Mönch, I. ; Schwille, P. ; Kruse, K.: Response to Halatek and Frey: Effective two-dimensional model does account for geometry sensing by self-organized proteins patterns. In: (2014). arXiv: 1406.1347 [q-bio.SC]



## DANKSAGUNG

---

Eine Doktorarbeit ist nie die Arbeit von nur einer Person, sondern sie entsteht durch das Zusammenwirken vieler Personen. An dieser Stelle nutze ich die Gelegenheit allen Beteiligten zu danken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. Karsten Kruse für die interessanten Projekte an denen ich arbeiten durfte, sowie für seine Expertise und für seine Zeit mit denen er die Projekte betreute.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Elisabeth Fischer-Friedrich bedanken, die mir zu Beginn meiner Dissertation half, mich in die Thematik der Musterbildung der Min-Proteine einzuarbeiten. Des Weiteren geht mein Dank an Jakob Schweizer und Martin Loose, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Petra Schwille für die Durchführung der Experimente zur Musterbildung der Min-Proteine verantwortlich waren. Ich konnte in dieser Zeit viel lernen und die gemeinsame Arbeit mit euch hat wirklich Spaß gemacht.

Ein weiteres Projekt dieser Doktorarbeit war die Erforschung der Interaktion des Proteins PKC $\alpha$  mit der Plasmamembran. Hier möchte ich mich bei Xin Hui, Lars Kaestner und Prof. Dr. Peter Lipp bedanken, die für den experimentellen Teil dieses Projekts verantwortlich waren. Ein ebenso großer Dank gilt Martin Peglow in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heiko Rieger für die interessanten und anregenden Gespräche rund um dieses Thema.

In einem weiteren Projekt dieser Arbeit untersuchten wir die Auswirkung von molekularem Rauschen auf die Stabilität polarer Proteinakkumulationen. Hier möchte ich mich vor allem bei Lucas Wettmann bedanken mit dessen Zusammenarbeit dieses Projekt entstanden ist.

Neben interessanten Projekten ist ein weiterer wichtiger Punkt zum Gelingen einer Doktorarbeit, ein gutes Klima in der Arbeitsgruppe. Hier möchte ich mich nochmals bei Karsten Kruse bedanken, der während der gesamten Zeit der Promotion Bedingungen geschaffen hat, die ein angenehmes Arbeiten innerhalb seiner Arbeitsgruppe ermöglicht haben. Mein Dank gilt natürlich auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe. Besonders möchte ich mich bei Marc Neef bedanken, der mit mir über Jahre hinweg ein Büro geteilt hat. Die Zeit war wirklich schön.

Mein weiterer Dank gilt Francine Jurecka und Andrea Dumont, die sich um die organisatorischen Aspekte meiner Promotion kümmerten.

Nicht zuletzt will ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich während der Promotion seelisch und moralisch unterstützten und mir gezeigt haben, dass es neben einer Promotion noch weitere interessante Dinge gibt.

# INHALTSVERZEICHNIS

---

|       |  |    |    |
|-------|--|----|----|
| 1     | EINLEITUNG   | 1  |    |
| 2     | EINLEITUNG: MIN-SYSTEM   | 5  |    |
| 3     | DIE DYNAMIK DES MIN-SYSTEMS  | 13 |    |
| 3.1   | Die Wechselwirkungen der Min-Proteine  | 13 |    |
| 3.2   | Die molekularen Prozesse und die dynamischen Gleichungen   | 15 |    |
| 4     | MUSTERBILDUNG VON MIN-PROTEINEN IN ZELLULÄREN GEOMETRIEN   | 19 |    |
| 4.1   | Pol-Pol Oszillationen und stehende Wellen mit mehreren Knoten                                      | 19 |    |
| 4.2   | Laufende Wellen  | 21 |    |
| 4.3   | Phasendiagramm   | 23 |    |
| 4.4   | Stochastisches Schalten  | 25 |    |
| 4.5   | Musterbildung in dicken Zellen   | 26 |    |
| 4.6   | Musterbildung in Y-förmigen Zellen   | 28 |    |
| 4.7   | Intuitives Bild zum Verständnis der Musterbildung <i>in vivo</i>                                   | 30 |    |
| 5     | MUSTERBILDUNG VON MIN-PROTEINEN IN OFFENEN GEOMETRIEN  | 33 |    |
| 5.1   | Musterbildung auf flachen, ausgedehnten Membranen  | 34 | 34 |
| 5.2   | Musterbildung auf flachen, mikrostrukturierten Membranen   | 35 |    |
| 5.2.1 | Musterbildung auf lateral beschränkten Membranen   | 37 |    |
| 5.2.2 | Sensitivität der Wellenausbreitung auf rechteckigen Membranen unterschiedlicher Seitenverhältnisse | 40 |    |
| 5.2.3 | Musterbildung auf kurvigen Membranen   | 42 |    |
| 5.2.4 | Kopplung der Min-Protein Muster zwischen isolierten benachbarten Membranen                         | 44 |    |
| 5.3   | Beeinflussung der Musterbildung durch die Oberflächentopologie der Membran                         | 48 |    |
| 6     | ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK   | 51 |    |
| 6.1   | Zusammenfassung der Ergebnisse   | 51 |    |
| 6.1.1 | Die Musterbildung <i>in vivo</i>   | 51 |    |
| 6.1.2 | Die Musterbildung <i>in vitro</i>  | 52 |    |
| 6.2   | Ausblick   | 54 |    |
| 7     | EINLEITUNG: DIE PROTEINKINASE PKC $\alpha$   | 55 |    |
| 8     | DIE DYNAMIK VON PKC $\alpha$   | 65 |    |

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 9      | KOMPLEXBILDUNG MEMBRANGEBUNDENER PKC $\alpha$ MOLEKÜLE  | 71  |
| 9.0.1  | Lokale Aktivierung von PKC $\alpha$   | 72  |
| 9.0.2  | Globale Aktivierung von PKC $\alpha$  | 77  |
| 10     | PKC $\alpha$ :ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK  | 91  |
| 10.1   | Zusammenfassung der Ergebnisse  | 92  |
| 10.2   | Ausblick  | 92  |
| 11     | BISTABILE PROTEINVERTEILUNGEN IN STÄBCHENFÖRMIGEN BAKTERIEN   | 95  |
| 11.1   | Stochastische Dynamik zur Bildung von Clustern auf der Membran  | 96  |
| 11.1.1 | Die chemische Mastergleichung   | 96  |
| 11.1.2 | Numerische Lösung der chemischen Mastergleichung  | 99  |
| 11.2   | Die funktionale Fokker-Planck Gleichung   | 100 |
| 11.2.1 | Van Kampen Expansion und Kontinuumslimes  | 101 |
| 11.2.2 | Der deterministische Limes  | 103 |
| 11.2.3 | Garlekin-Näherung der Fokker-Planck Gleichung   | 106 |
| 11.3   | Bestimmung der Schaltzeit im Grenzfall von schwachem Rauschen   | 108 |
| 11.3.1 | Wahrscheinlichkeitsstrom durch die Separatrix   | 108 |
| 11.3.2 | Vergleich der abgeschätzten Schaltzeiten mit den Schaltzeiten der stochastischen Simulationen               | 111 |
| 11.3.3 | Zusammenfassung und Ausblick  | 113 |
| i      | ANHANG  | 115 |
| A      | ANHANG  | 117 |
| A.1    | Eindimensionale Version der dynamischen Gleichungen und Musterbildung der Min-Proteine in wachsenden Zellen | 117 |
| A.2    | Bestimmung der mittleren Lebenszeit von membrangebundenem MinD und MinE                                     | 118 |
| A.3    | Effektive zweidimensionale Beschreibung des invitro-Systems   | 119 |
| A.4    | Deterministische Gleichungen in der Galerkin Näherung   | 120 |
|        | LITERATUR   | 123 |

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

|              |   |    |
|--------------|---|----|
| Abbildung 1  | Nukleoid Okklusion und Pol-Pol Oszillation bestimmen die Zellmitte des Bakteriums <i>E.Coli</i> .                                       | 6  |
| Abbildung 2  | Musterbildung von MinD in lebenden <i>E. coli</i> Zellen.   | 7  |
| Abbildung 3  | Musterbildung der Min-Proteine in Y-förmigen <i>E.Coli</i> Zellen.  | 8  |
| Abbildung 4  | Musterbildung auf einer unterstützten Lipid-doppelschicht.  | 9  |
| Abbildung 5  | Schematische Darstellung der molekularen Prozesse zwischen MinD, MinE und der Plasmamembran.  | 14 |
| Abbildung 6  | Stehende Wellen in bakteriellen Geometrien.   | 20 |
| Abbildung 7  | Stehende Wellen in bakteriellen Geometrien mit mehreren Knoten.   | 21 |
| Abbildung 8  | Laufende Wellen in bakteriellen Geometrien.   | 22 |
| Abbildung 9  | Laufende Wellen mit mehreren Wellenpaketen.   | 23 |
| Abbildung 10 | Phasendiagramme   | 24 |
| Abbildung 11 | Stationäre Muster und stochastisches Schalten in bakteriellen Geometrien.   | 25 |
| Abbildung 12 | Maximale Anzahl von polarem MinD und MinE als Funktion der Zelllänge.   | 27 |
| Abbildung 13 | Musterbildung in dicken Zellen.   | 28 |
| Abbildung 14 | Musterbildung in Y-förmigen Zellen.   | 29 |
| Abbildung 15 | Momentaufnahmen der Verteilungen von membrangebundenem MinD und MinE in einem eindimensionalen System und entsprechende Illustrationen. | 31 |
| Abbildung 16 | Numerische Lösung der deterministischen dynamischen Gleichungen in der <i>in vitro</i> Geometrie.                                       | 36 |
| Abbildung 17 | Eigenschaften von laufenden Wellen aus den <i>in vitro</i> Simulationen.  | 36 |
| Abbildung 18 | Schematische Darstellung des experimentellen Setups und der Modellgeometrie.  | 37 |
| Abbildung 19 | Einfluss der lateralen Membrangrenzen auf die Wellenpropagation.  | 39 |
| Abbildung 20 | Min-Protein-Wellen auf Membranen mit Hindernissen.  | 40 |

|              |   |    |
|--------------|---|----|
| Abbildung 21 | Einfluss der Membrangeometrie auf die Ausbreitungsrichtung der Min-Protein-Wellen.                                      | 41 |
| Abbildung 22 | Ausrichtung der Wellen auf einer rechteckigen Membran.  | 41 |
| Abbildung 24 | Schematische Darstellung der Verteilung von MinD und MinE auf einer L-förmigen Membran.                                 | 42 |
| Abbildung 23 | Min-Protein-Wellen auf einer Membran, die die Form des Buchstabens L hat.   | 43 |
| Abbildung 25 | Min-Protein-Wellen auf Membranen, die die Formen einer Serpentine und eines Rings haben.                                | 45 |
| Abbildung 26 | Kopplung von Min-Protein-Wellen zwischen isolierten benachbarten Membraninseln.   | 46 |
| Abbildung 27 | Schematische Darstellung des Proteinaustauschs zwischen zwei dicht benachbarten Membranen.                              | 46 |
| Abbildung 28 | Einfluss einer reduzierten zytosolischen Diffusion auf die Kopplung der Min-Protein-Wellen.                             | 47 |
| Abbildung 29 | Musterbildung der Min-Protein-Wellen auf Membranen mit Vertiefungen.  | 49 |
| Abbildung 30 | Verteilung von MinD auf Membranen mit parallel angeordneten Vertiefungen.   | 50 |
| Abbildung 31 | Schematische Darstellung der Domänenstruktur von PKC $\alpha$   | 56 |
| Abbildung 32 | Regulation von PKC $\alpha$ durch die Kofaktoren Ca <sup>2+</sup> und Diacylglycerol (DAG).                             | 57 |
| Abbildung 33 | Räumlich eingeschränkte PKC $\alpha$ Translokation, induziert durch ein räumlich beschränktes Ca <sup>2+</sup> -Signal. | 58 |
| Abbildung 36 | Eigenschaften von PKC $\alpha$ -Clustern in COS1-Zellen.  | 62 |
| Abbildung 38 | Bestimmung der Diffusionskonstanten von zytosolischem PKC $\alpha$ mittels FLAP.  | 68 |
| Abbildung 39 | Aktivierung von PKC $\alpha$ in Abhängigkeit des Abstandes zur Membran.   | 73 |
| Abbildung 40 | Bildung eines kurzlebigen PKC $\alpha$ -Clusters in den Simulationen.   | 74 |
| Abbildung 41 | Lokale Translokation von PKC $\alpha$ in den Simulationen.  | 76 |
| Abbildung 42 | Lebenszeit von PKC $\alpha$ Komplexen.  | 78 |
| Abbildung 43 | Durch globale Ca <sup>2+</sup> -Oszillationen hervorgerufene Oszillationen des FRET-Signals in den Experimenten.        | 79 |

|              |   |     |
|--------------|---|-----|
| Abbildung 44 | Durch $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen hervorgerufene Oszillationen des FRET-Signals in den Simulationen.  | 81  |
| Abbildung 45 | Analyse der Komplexbildung und mittlere Lebenszeit von membrangebundenem $\text{PKC}\alpha$ .   | 82  |
| Abbildung 46 | Räumliche Verteilung des Fluoreszenz- und des FRET-Signals vor und nach der $\text{Ca}^{2+}$ - induzierten Translokation von $\text{PKC}\alpha$ . | 83  |
| Abbildung 47 | Zeitlicher Verlauf des FRET-Signals bei geringem zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Level.   | 84  |
| Abbildung 48 | Schnappschüsse aus den Simulationen bei geringem zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Level.   | 85  |
| Abbildung 49 | Zeitliche Entwicklung der mittleren Größe und der Anzahl der $\text{PKC}\alpha$ -Komplexe.  | 86  |
| Abbildung 50 | Zeitlicher Verlauf des FRET-Signals bei hohem zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Level.  | 87  |
| Abbildung 51 | Schnappschüsse aus den Simulationen mit hohem zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Level.  | 88  |
| Abbildung 52 | Abfall des FRET-Signals als Funktion der inneren $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.   | 89  |
| Abbildung 53 | FRET-Signal in Simulationen mit DAG.  | 90  |
| Abbildung 54 | Schematische Darstellung der molekularen Prozesse und die in den Simulationen verwendete eindimensionale Geometrie.                               | 98  |
| Abbildung 55 | Bildung polarer Cluster auf der Membran.  | 100 |
| Abbildung 56 | Verhalten des Systems im deterministischen Limes.   | 104 |
| Abbildung 57 | Flusslinien der Moden $M_1$ und $M_2$ im deterministischen Limes.   | 105 |
| Abbildung 58 | Stationäre Wahrscheinlichkeitsverteilungen für verschiedene Systemlängen.   | 110 |

Abbildung 59 Vergleich der Schaltzeiten aus der Theorie und den Simulationen. 112

## TABELLENVERZEICHNIS

---

|           |   |
|-----------|---|
| Tabelle 1 | Parameterwerte, welche für die numerische Lösung der deterministischen dynamischen Gleichungen (8)-(14) und für die Simulationen der stochastischen Dynamik (1)-(7) verwendet wurden. 18  |
| Tabelle 2 | Parametersätze, welche für die Simulationen der stochastischen Dynamik (17)-(27) verwendet werden. Da wir DAG nicht als eigenständiges Teilchen simulieren, verwenden wir zwei unterschiedliche Parametersätze, die die Membraninteraktion von PKC $\alpha$ einmal mit und einmal ohne Bindung zu DAG charakterisiert. 70 |
| Tabelle 3 | Parameterwerte, welche in Abbildung 20 verwendet wurden. 119  |

## EINLEITUNG

---

Proteine sind in lebenden Systemen die wohl wichtigsten und vielseitigsten Moleküle. Sie bilden nicht nur die Grundbausteine unserer Zellen, sondern übernehmen auch eine zentrale Rolle in nahezu allen biologischen Prozessen. So agieren Proteine in der Plasmamembran beispielsweise als Pumpen, die kleinere Moleküle durch die Membran transportieren. Motorproteine wie Myosin oder Kinesin sind in der Lage chemische Energie in Bewegung umzuwandeln und übernehmen damit eine wichtige Rolle im cytoplasmatischen Transport und der Zellbewegung, und Signalproteine wie beispielsweise Proteinkinasen spielen aufgrund ihrer Fähigkeit, Zielproteine zu phosphorylieren und somit deren Aktivität zu regulieren, eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion [1].

Obwohl Proteine effiziente und äußerst funktionelle Moleküle sind, agieren sie in den seltensten Fällen alleine. Der größte Teil aller Prozesse innerhalb einer Zelle erfolgt durch die Interaktion von Proteinen. Ein Beispiel hierfür ist etwa die Signaltransduktion. Binden Hormone an Transmembranrezeptoren, wie etwa an bestimmte G-Protein gekoppelte Rezeptoren, so führt dies zur Änderung von deren Konformation. Da diese Proteine aus einem extra- und einem intrazellulären Anteil bestehen, überträgt sich die Konformationsänderung ins Innere der Zelle, wodurch die an den Rezeptoren gebundenen G-Proteine aktiviert werden und das Signal ins Zellinnere leiten. Dort wird das Signal weitergeleitet, indem Proteinkinasen und Phosphatasen die Konformation ihrer Zielproteine ändern und sie so aktivieren bzw. deaktivieren. Durch die Wechselwirkung der Proteine bilden sich auf diese Weise komplexe Signalnetzwerke, ähnlich den Schaltkreisen eines Computers, die den Zellen erlauben, gezielt auf Einflüsse ihrer Umgebung zu reagieren.

Die Interaktion von Proteinen beeinflusst jedoch nicht nur deren spezifische Funktion, sondern kann auch deren zeitliche und räumliche Organisation innerhalb der Zelle regulieren. Aufgrund von Diffusion und der Fähigkeit miteinander zu interagieren sind Proteine in der Lage, durch Selbstorganisation, räumliche Strukturen bzw. Muster zu bilden [2, 3]. Diese Strukturen bzw. Muster sind typischerweise an die Funktion der Proteine gekoppelt. So bilden beispielsweise spezielle Transmembranrezeptoren in *E.Coli*, Komplexe an den Zellpolen, wodurch die Sensitivität des Bakteriums erhöht wird [4, 5].

Ein weiteres Beispiel für die Kopplung von Funktion und räumlicher Verteilung der Proteine ist die Bildung von Clathrin-ummantelten Vesikeln. Das Protein Clathrin bindet an Adapterproteine, die lokal in der Membran akkumulieren und bildet durch die Interaktion mit benachbarten Clathrin Molekülen eine kugelförmiges Clathrin-Gitter, welches als Gerüst für die Bildung eines Membranvesikels dient [1, 6].

In der folgenden Doktorarbeit untersuchen wir die raumzeitlich Verteilung der bakteriellen Proteine MinD und MinE des stäbchenförmigen Bakteriums *E.Coli* sowie der ubiquitär exprimierten Proteinkinase PKC $\alpha$ . Sowohl die Proteine des Min-Systems als auch die Signalproteine PKC $\alpha$  bilden Muster bzw. Strukturen auf der Plasmamembran, deren räumliche und zeitliche Eigenschaften in unmittelbarer Beziehung zur Funktion der Proteine stehen.

Im Falle der Proteine des Min-Systems, die für die exakte Lokalisierung der Zellteilung verantwortlich sind, führt ihre intermolekulare Wechselwirkung zur Bildung polarer Akkumulationen, die sich periodisch abwechselnd an den beiden Zellpolen bilden und die Teilung an den Polkappen inhibieren. Damit wird die Cytokinese auf die Zellmitte beschränkt, womit unter anderem gewährleistet wird, dass beide Tochterzellen einen vollständigen Satz an Erbinformationen erhalten.

PKC $\alpha$  bildet in ATP-stimulierten HEK-Zellen, räumlich begrenzte Proteincluster auf der Plasmamembran. Diese Cluster bilden sich voraussichtlich als Folge der lokalen Freisetzung von Ca $^{2+}$ -Ionen, besitzen jedoch eine Lebenszeit, die die Dauer bis dato bekannter lokaler Ca $^{2+}$ -Freisetzungen um ein Vielfaches überschreitet [7]. Diese erhöhte Lebenszeit kann physiologisch deshalb relevant sein, da sie dafür sorgt, dass das nachgeschaltete Signal von PKC $\alpha$  genügend stark ist.

Im Speziellen wollen wir in dieser Arbeit untersuchen, welche Proteinwechselwirkungen bzw. molekulare Mechanismen der räumlichen und zeitlichen Organisation der Proteine des Min-Systems sowie der PKC $\alpha$ -Moleküle zu Grunde liegen.

Im ersten Teil untersuchen wir sowohl die Musterbildung der Min-Proteine *in vivo* als auch *in vitro* und nutzen dazu theoretische und experimentelle Methoden. Ziel unserer Untersuchung ist ausgehend von neuen Erkenntnissen in der intermolekularen Wechselwirkung der Min-Proteine, eine möglichst umfassende theoretische Beschreibung der Min-Protein-Dynamik zu entwickeln. Mit dieser Beschreibung untersuchen wir anschließend die Musterbildung *in vivo* sowie den Einfluss der Geometrie und Oberflächentopologie der Membran auf die Musterbildung der Proteine in *in vitro* Systemen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wenden wir uns der konventionellen Proteinkinase PKC $\alpha$  zu und versuchen herauszufinden, ob membrangebundene PKC $\alpha$  Moleküle miteinander wechselwirken, damit ihre Interaktion mit der Membran stabilisieren und somit die Lebenszeit des gesamten Signalkomplexes verlängern. Wie bei der Untersuchung des Min-Systems verwenden wir auch hier eine Mischung aus experimentellen und theoretischen Methoden. Eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung könnte einen Mechanismus darstellen mit dem periphere Signalproteine ihre räumliche Verteilung und Verweildauer auf der Membran regulieren.

Aufgrund ihrer funktionellen Bedeutung, spielt auch die Stabilität der durch die Proteine gebildeten Muster und Strukturen eine wichtige Rolle für das ordnungsgemäße Funktionieren der Zellen. Da viele dieser räumlichen Strukturen und Muster oft nur durch eine geringe Anzahl von 100 bis wenigen 1000 Proteinen gebildet werden, kann molekulares Rauschen deren Stabilität beeinflussen. So bilden etwa die Min-Proteine in kleinen Zellen bei einer leichten Überexpression polare Akkumulationen, die stochastisch zwischen den Zellhälften schalten [8, 9, 10]. Ein weiteres Beispiel für den Einfluss von molekularem Rauschen auf die raumzeitliche Organisation von Proteinen, ist das stochastische Schalten der SpooJ/Soj-Proteine zwischen zwei Nukleotide im Bakterium *Bacillus subtilis* [11, 12]. Um die Stabilität von räumlichen Proteinmustern zu untersuchen, analysieren wir im dritten und letzten Teil dieser Arbeit, die Stabilität von Molekülclustern in einer stäbchenförmigen Geometrie. Dazu verwenden wir im Vergleich zum Min-System, ein vereinfachtes Reaktions-Diffusions-System, welches in der Lage ist, eine polare Akkumulation von Proteinen zu bilden, die aufgrund von molekularem Rauschen zwischen den beiden Zellpolen stochastisch hin und her schalten kann. Um ein tieferes Verständnis für das System zu erhalten, verwenden wir einen Mean-Field-Ansatz und verfolgen die Vorgehensweise in [13], um die entsprechende Fokker-Planck Gleichung der relevanten Moden herzuleiten. Mit Hilfe der Wentzell-Freidlin Theorie werden wir die Fokker-Planck Gleichung lösen und entsprechend der Vorgehensweise in [14, 15] die Schaltzeiten in Abhängigkeit der Gesamtanzahl von Proteinen bestimmen.



Die räumliche und zeitliche Koordination der Zellteilung ist ein elementarer Bestandteil im Lebenszyklus einer Zelle. Im stäbchenförmigen Bakterium *Escherichia coli* erfolgt die räumliche Lokalisierung des Zellteilungsseptums durch zwei voneinander unabhängige Mechanismen. Diese sind durch die „Nukleoid Okklusion“ sowie durch das Min-System gegeben [16].

Die Nukleoid Okklusion ist ein Schutzmechanismus der Chromosomen, welcher verhindert, dass sie durch das sich einschnürende Septum zerstört werden. Im Bakterium *E.coli* erfolgt dieser Schutz durch das Protein SlmA [17], welches die Verhinderung der Septumbildung in der Umgebung der Nukleoide herbeiführt. Der genaue Wirkmechanismus von SlmA ist bis dato unklar. Die Nukleoid Okklusion beschränkt damit die möglichen Orte der Zellteilung auf drei Zellregionen. Diese liegen in der Zellmitte zwischen den beiden Chromosomen und an den beiden Polkappen, siehe Abbildung 1A.

Um den Ort der Teilung auf die Zellmitte zu beschränken, wird sie an beiden Polkappen inhibiert. Diese Aufgabe übernimmt das Min-System, welches sich aus den Proteinen MinC, MinD und MinE zusammensetzt. In lebenden *E.Coli* Zellen oszillieren die Min-Proteine zwischen den beiden Zellpolen, siehe Abbildung 1B, was zu einer stehenden Welle mit einem Knoten im Zellzentrum führt [19, 20].

Die grundlegenden molekularen Mechanismen der Oszillation sind schematisch in Abbildung 1C dargestellt. Im ATP-gebundenen Zustand bindet die ATPase MinD in der Polregion des Bakteriums an die Zellmembran, was zur Rekrutierung von MinC und MinE führt. MinC, der eigentliche Inhibitor der Zellteilung, verhindert im MinCD Komplex, dass sich die Zelle in der Region teilen kann, in der der Komplex lokalisiert ist. MinE erhöht die ATPase Aktivität von MinD und leitet damit das Ablösen des MinCD Komplexes ein. Im Zytoplasma der Zelle bindet MinD wiederum ATP und bindet am gegenüberliegenden Zellpol. MinC und MinE folgen der Verteilung von MinD.

Die sich so bildende stehende Welle, auch Pol-Pol Oszillation genannt, bewirkt im zeitlichen Mittel einen räumlichen Gradienten der Min-Proteine mit maximaler Proteindichte an den Polen und minimaler Proteindichte in der Zellmitte, siehe Abbildung 1B. Aufgrund der

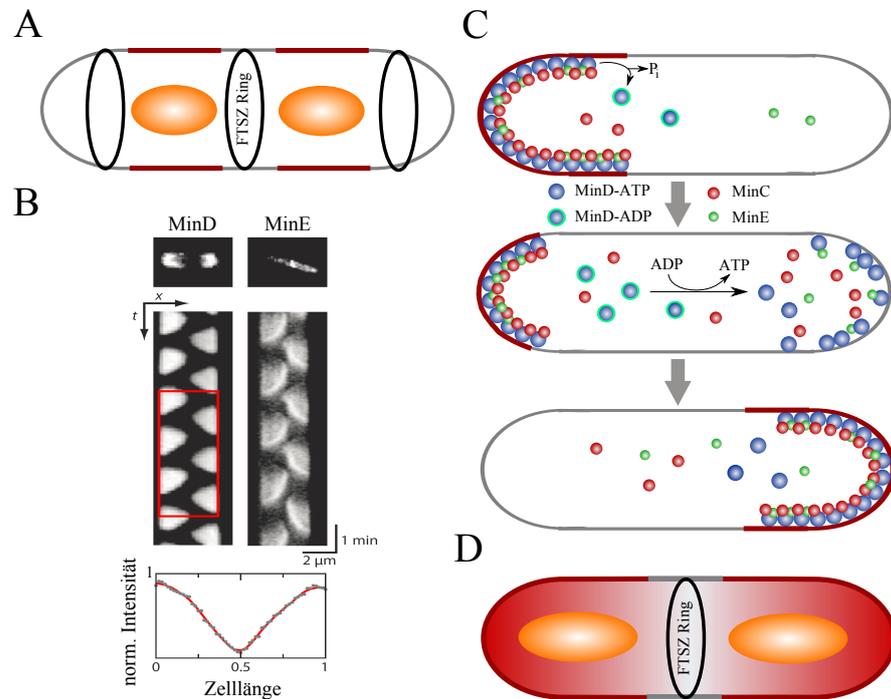


Abbildung 1: **Nukleoid Okklusion und Pol-Pol Oszillation bestimmen die Zellmitte des Bakteriums *E.Coli*.** A) Die Nukleoid Okklusion verhindert die Zellteilung in der Umgebung der Chromosomen (rot markierte Bereiche). Die noch möglichen Orte der Zellteilung sind durch schwarze Ellipsen gekennzeichnet. B) Oben: Mikroskopische Momentaufnahmen von MinD-GFP und MinE-GFP in lebenden *E.Coli* Zellen. Mitte: Entsprechende Kymographen einer Pol-Pol Oszillation. Unten: Zeitlich gemittelt Intensitätsprofil von MinD aus dem rot gekennzeichneten Bereich des Kymographen. C) Schematische Darstellung der Dynamik der Min-Proteine. MinD-ATP (blau) bindet an die Membran was zur Rekrutierung des Inhibitors der Zellteilung MinC (rot) führt. Zytoplasmatisches MinE bindet an den MinCD Komplex und löst die Proteine von der Membran. MinD, MinE und MinC diffundieren im Zytoplasma und binden nach dem Nukleotidaustausch von MinD am gegenüberliegenden Zellpol. Der gesamte Vorgang beginnt von vorn, was zu einer Oszillation der Proteine von Pol zu Pol führt. D) Die Oszillation der Min-Proteine führt zu einem Gradient des eigentlichen Inhibitors MinC (rot) mit hoher Konzentration an den Polen und niedriger Konzentration im Zellzentrum. Gleichsam verhindern die Nucleoide (orange) die Bildung des Zellteilungsseptums in ihrer Umgebung. Die Kombination beider Mechanismen beschränkt den Ort der Zellteilung auf das Zellzentrum. B) entstammt der Referenz [18].

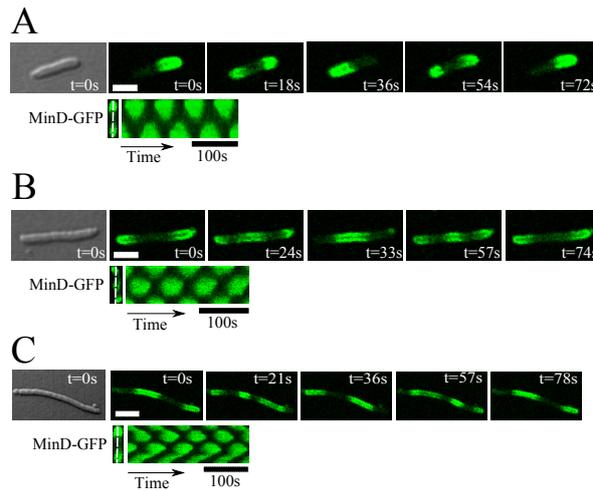


Abbildung 2: **Stehende Wellen, gebildet von Min-Proteinen in unterschiedlich langen *E. coli* Zellen.** A) Stehende Welle mit einem Knoten. B) Stehende Welle mit zwei Knoten. C) Stehende Welle mit drei Knoten. Oben: DIC Aufnahmen gefolgt von Zeitserien, die die Verteilung von MinD-GFP in lebenden Zellen für unterschiedliche Zelllängen zeigen. Unten: Kymographen, aufgenommen in Richtung der bakteriellen Längsachse. Der Maßstab ist  $3\mu\text{m}$ .

inhibitorischen Wirkung von MinC wird dadurch die Zellteilung an den Zellpolen verhindert.

Infolge der Nukleoid Okklusion und der Inhibierung der Zellteilung an den beiden Zellpolen durch das Min-System, bleibt als einziger Ort für die Cytokinese, die Region zwischen den beiden Chromosomen übrig, siehe Abbildung 1D. Auf diese Weise ist die Zelle in der Lage, sich in zwei gleich große Tochterzellen zu teilen.

Einige Modelle gehen nun davon aus, dass bestimmte Eigenschaften der Zellpole die Musterbildung des Min-Systems beeinflussen [21]. Andere Arbeiten fokussieren den Ansatz, dass es die alleinige Selbstorganisation der Min-Proteine ist, welche zu deren Musterbildung führt.

Einen ersten Hinweis auf die Theorie der Selbstorganisation lieferte die Beobachtung, dass sich die Muster in Abhängigkeit der Zelllänge und der Proteinkonzentration ändern. Während sich in kürzeren Zellen stehende Wellen mit einem Knoten im Zellzentrum ausbilden, siehe Abbildung 2A, bilden sich in längeren Zellen stehende Wellen mit mehreren Knoten, wie sie in Abbildung 2B und Abbildung 2C zu sehen sind. Die Erhöhung der Knotenzahl bei Variation der Zelllänge, liefert einen starken Hinweis darauf, dass die Musterbildung der Min-Proteine durch eine intrinsische Wellenlänge geprägt ist, was einen starken Indiz für den selbstorganisatorischen Charakter des Systems darstellt.

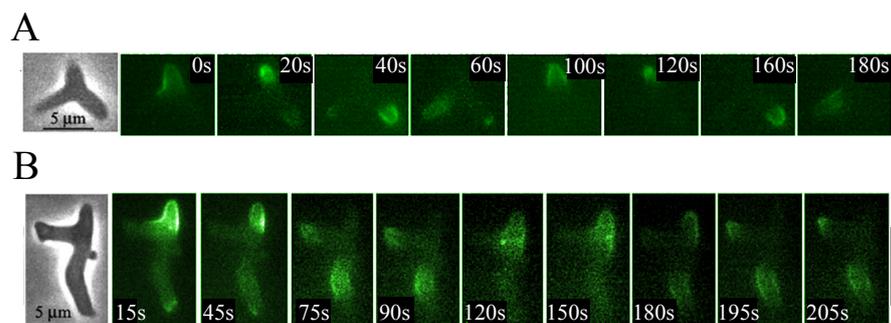


Abbildung 3: **Musterbildung der Min-Proteine in Y-förmigen *E.Coli* Zellen.** Die Min-Proteine nutzen das gesamte Zellvolumen der anormal geformten *E.Coli* Zellen zu ihrer Selbstorganisation. A) In einer Zelle mit drei nahezu gleich langen Zellzweigen akkumulieren die Min-Proteine nacheinander im Uhrzeigersinn in den einzelnen Zellpolen. B) Auch in weniger symmetrisch geformten Zellen, erfassen die Proteine das gesamte Zellvolumen und akkumulieren nacheinander in den jeweiligen Zellpolen. Die einzelnen Zeitserien wurden der Referenz [22] entnommen.

Ein weiteres Indiz für die Selbstorganisation der Min-Proteine liefert die Musterbildung in *E.Coli* Zellen mit anormaler Zellform. Auch bei anomaler Zellgeometrie, detektieren die Proteine das gesamte Zellvolumen. Etwa in Zellen, die die Form des Buchstabens Y haben, binden die Min-Proteine in Abhängigkeit der unterschiedlichen Armlängen in den entsprechenden Verzweigungen der Zelle, siehe Abbildung 3 [22]. In kurzen Zellen mit einer erhöhten Konzentration an Min-Proteinen, beobachtet man statt Oszillationen, stochastisches Schalten der Proteine zwischen den beiden Zellhälften [23, 9]. Der wohl wichtigste Hinweis für die Selbstorganisation der Min-Proteine liefert die Musterbildung außerhalb der Zelle auf unterstützten Lipiddoppelschichten. Diese *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass sich die Proteine MinD und MinE in Umgebung einer Membran spontan in laufende Wellen organisieren können, siehe Abbildung 4A. Die Wellen zeigen ein charakteristisches Profil, welches in Abbildung 4B dargestellt ist. Von der Wellenfront beginnend wächst die MinD-Konzentration an, geht in der Mitte der Welle in Sättigung und fällt am Heck der Welle rapide ab. Die Dichten von MinC und MinE wachsen langsamer und folgen am Heck der Dichte von MinD. Das MinE Profil zeigt kurz vor Abfall einen steilen Anstieg.

Insgesamt bestärkt die Musterbildung der Min-Proteine in den unterschiedlichsten *in vivo* und *in vitro* Geometrien die Vorstellung, dass die Muster, die durch die Min-Proteine gebildet werden, alleine durch deren intrinsische Wechselwirkungen entstehen. Im wesentlichen ist dies das Binden von ATP gebundenem MinD an die Membran, welche durch die hohe Membranaffinität des Proteins im ATP gebunde-

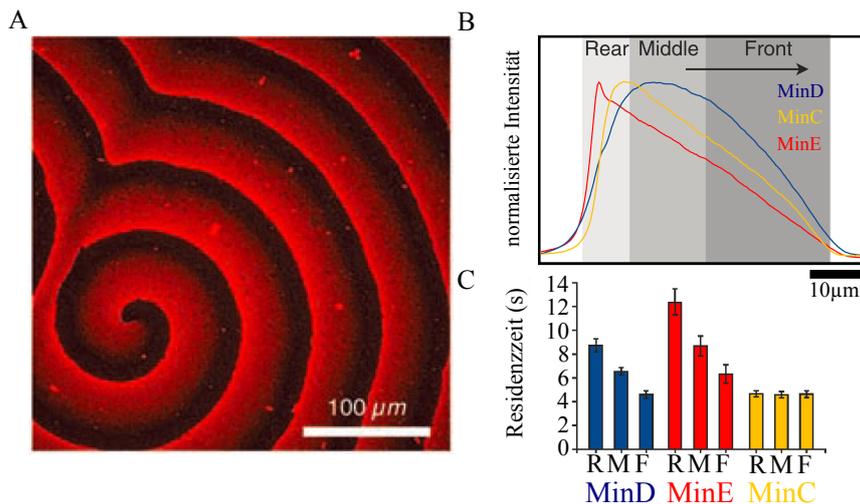


Abbildung 4: **Musterbildung von Min-Proteinen auf einer unterstützten Lipiddoppelschicht.** A) Spiralwelle, gebildet durch die sich selbstorganisierenden Proteine. B) Räumlich gemittelttes Wellenprofil von MinC, MinD und MinE. C) Gemessene Residenzzeiten der Min-Proteine auf der Membran für die in B) dargestellten Segmente des Wellenprofils. A) wurde der Referenz [3] entnommen und B), C) entstammen der Referenz [32].

nen Zustand bedingt ist, und die Umwandlung in den nur schwach gebundenen ADP Zustand [24] durch die durch MinE induzierte Hydrolyse. Diese schon sehr etablierten Prozesse sind Ausgangspunkt einiger Modelle, die in der Lage sind Min-Oszillationen zu reproduzieren [25]. Der wohl beliebteste Mechanismus als Ursprung der Musterbildung ist das kooperative Binden von MinD. In seiner einfachsten Form nimmt die Binderate von zytosolischem MinD linear mit der Dichte an membrangebundenem MinD zu [26].

In anderen Arbeiten zur Analyse des Min-Systems wurden das kooperative Binden von MinD auf unterschiedlichste Arten implementiert und durch weitere Randprozesse ergänzt, wodurch all diese Modelle in der Lage sind, robuste Pol-Pol-Oszillationen zu erzeugen [27, 28, 29]. Andere Arbeiten verwenden statt kooperativem Binden von MinD, kooperative Effekte zwischen schon gebundenen MinD Proteinen [30, 31].

*In vitro* Messungen der Residenzzeiten einzelner Moleküle in den in Abbildung 4B dargestellten Segmenten der Min-Protein Wellen zeigen, dass die Verweildauer von MinE die Verweildauer von MinD auf der Membran übersteigt [32], siehe Abbildung 4C. Da MinE jedoch nur in Verbindung mit MinD an die Membran binden kann, liefert die im Vergleich zu MinD erhöhte Residenzzeit von MinE einen Hinweis darauf, dass MinE mehrere MinD Moleküle von der Membran lösen kann, ohne sie selbst zu verlassen. Zusätzlich geben genetische, physiologische und strukturelle Analysen des Proteins MinE [33] Hinweise darauf, dass es mit Phospholipiden interagieren kann und somit

in der Lage ist, an der Membran zu verweilen, selbst nachdem sich MinD von ihr gelöst hat.

Beide Untersuchungsergebnisse liefern eine neue Vorstellung für die Interaktion zwischen MinE, MinD und den Phospholipiden der Membran. Nach dieser Vorstellung könnte MinE außerhalb des MinDE-Komplexes mit den Phospholipiden der Membran interagieren und damit kurzzeitig im membrangebundenen Zustand verweilen. Dadurch wäre MinE durch Diffusion in der Lage, von MinD-Molekül zu MinD-Molekül zu gelangen und diese in Folge von der Membran zu lösen. In Analogie zu molekularen Motoren, die nacheinander mehrere Schritte auf einem Filament des Zytoskeletts ausführen können, bezeichnen wir diese Eigenschaft als MinE-Prozessivität.

In den Kapiteln 3, 4 und 5 wird die Auswirkung der Prozessivität von MinE auf die Musterbildung des Min-Systems untersucht. In einem ersten Schritt zeigen wir hierzu, dass die Eigenschaft von MinE mit Phospholipiden zu interagieren und dadurch mehrere benachbarte membrangebundene MinD Moleküle zu lösen, einen Schlüssel darstellt, alle bis heute beobachteten *in vivo* Muster des Min-Systems zu reproduzieren. Zu den bis dato bekannten *in vivo* Mustern, konnten unsere Untersuchungen neue Muster in lebenden *E. coli* Zellen voraussagen. Dazu zählen laufende Wellen in langen Zellen bei einer leicht erhöhten Konzentration der Min-Proteine wie auch sich bewegende, räumlich abgegrenzte Anhäufungen von membrangebundenem MinD in dicken Zellen. Durch Fluoreszenzmikroskopie von lebenden *E. coli* Zellen können wir die Existenz der neuen Min-Protein-Muster verifizieren.

Auf *in vitro* Membranen, deren räumliche Ausdehnung ein vielfaches der Periodizität der Wellen ist, organisieren sich die Min-Proteine in Spiralen und laufende Wellen, die sich unbeeinflusst inmitten der Membran ausbreiten können, siehe Abbildung 4A. Verkleinert man nun die laterale bzw. longitudinale Ausdehnung von Membranen auf die Größenordnung der Wellenlänge, so zeigt sich, dass die Musterbildung der Min-Proteine durch die Ränder der Membran beeinflusst wird [34]. So beobachtet man etwa, dass die durch die Interaktion der Min-Proteine gebildeten laufenden Wellen sich stets entlang der Längsachse von Membranen ausbreiten, deren laterale Ausdehnung in der Größenordnung der Wellenlänge liegt. Auf gekrümmten Membranen führt der Einfluss der Ränder dazu, dass die Wellen ihre Laufrichtung ändern, um dem Kurs der Membran zu folgen. Um diese Eigenschaft besser zu verstehen und der Frage auf den Grund zu gehen, inwieweit die MinE-Prozessivität hierfür wichtig ist, vergleichen wir in einem zweiten Schritt der Arbeit, die Musterbildung zwischen Experiment und Theorie auf unterschiedlich geformten *in vitro* Mem-

branen. Wir zeigen im Verlauf dieser Arbeit, dass unsere theoretische Beschreibung alle *in vitro* Muster qualitativ reproduzieren kann und dass sich mit Hilfe des transienten Bindens von MinE an die Membran, alle charakteristischen Merkmale der Musterbildung auf mikrostrukturierten Membranen erklären lassen.

In Kapitel 11 versuchen wir, ein tieferes Verständnis für das Phänomen des stochastischen Schaltens der Min-Proteine in kurzen *E. coli* Zellen bei einem erhöhten Proteinexpressionslevel zu erhalten [23, 9]. Dazu untersuchen wir ein vereinfachtes Reaktions-Diffusionssystem, was ähnlich dem Min-System in der Lage ist Proteincluster an den Zellpolen zu bilden, die stochastisch von Zeit zu Zeit zum gegenüberliegenden Zellpol schalten. In einem ersten Schritt führen wir hierzu stochastische Simulationen durch um das Schaltverhalten dieses Modellsystems zu analysieren. Um das System näher zu charakterisieren, verwenden wir eine Mean-Field-Beschreibung und verfolgen den Ansatz in [13], um die entsprechende Fokker-Planck Gleichung der relevanten Moden herzuleiten. Mit Hilfe eines WKB-Ansatzes lösen wir die Fokker-Planck Gleichung und entsprechend der Vorgehensweise in [14] bestimmen wir die Schaltzeiten.

In dem nun folgenden Kapitel werden die wichtigsten Wechselwirkungen dargestellt, welche für die *in vivo* und *in vitro* Musterbildung der Min-Proteine in unserer Beschreibung von Bedeutung sind. Aus den Wechselwirkungen werden die den Simulationen zugrundeliegenden Gleichungen abgeleitet, welche mit Hilfe von deterministischen als auch stochastischen Verfahren in drei Dimensionen gelöst werden.



## DIE DYNAMIK DES MIN-SYSTEMS

---

In diesem Kapitel betrachten wir die molekularen Wechselwirkungen der Min-Proteine die für die *in vivo* und *in vitro* Musterbildung des Systems von Bedeutung sind. Wir beschränken uns ausschließlich auf die molekularen Prozesse, für die es starke experimentelle Hinweise gibt. Sie bilden die Basis zur Herleitung der Reaktionsgleichungen und dynamischen Mean-Field Gleichungen, die wir mit Hilfe stochastischer und deterministischer Methoden lösen. Da wir nicht an der Beschreibung jedes Charakteristikums der Protein-Muster interessiert sind, halten wir an einer möglichst einfachen Formulierung der Gleichungen fest.

### 3.1 DIE WECHSELWIRKUNGEN DER MIN-PROTEINE

Wir beginnen unsere Betrachtungen mit der ATPase MinD. Das Binden von ATP an MinD führt zur Bildung einer amphipathischen Helix am C-Terminus des zytosolen MinD Moleküls, was die Bindeaffinität von MinD zur Plasmamembran erhöht [35, 36, 37, 38, 39]. Des Weiteren ermöglicht die ATP Bindung des Moleküls dessen Dimerisation. Nur in diesem dimerisierten Zustand besitzt MinD eine genügend hohe Affinität, um an die Lipiddoppelschicht zu binden. Die Kinetik des Bindens von MinD zeigt Abweichungen von der Langmuir Adsorptionskinetik, was ein Anzeichen dafür ist, dass der Bindeprozess kooperativ ist [37, 40, 41, 42].

Ohne auf die möglichen molekularen Mechanismen der Kooperativität einzugehen, lässt sich festhalten, dass membrangebundene MinD Moleküle in der Lage sind räumlich geordnete Strukturen zu bilden. So konnte etwa in *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass MinD Moleküle welche an Vesikel binden, sich helikal anordnen und damit die kugelförmigen Vesikel in Röhren verformen [43]. In *in vivo* Experimenten konnte ebenfalls beobachtet werden, dass fluoreszenzmarkierte MinD Moleküle helikale Strukturen an den Zellpolen des *E.coli* Bakteriums bilden [44]. Es ist jedoch unklar ob die Aggregate von membrangebundenem MinD eine funktionale Rolle in der Musterbildung der Min Proteine spielen. Andererseits zeigen Arbeiten, welche die Bildung von MreB Helices oder Zentren der Clp Protease in *E.coli* untersuchen, dass die Strukturen dieser Proteine durch Fluoreszenzfarbstoffe induziert werden und damit keine Eigenschaft der

Proteine selbst sind [45, 46]. Ob und inwieweit die helikale Membranordnung von MinD durch Fluoreszenzfarbstoff induziert wird, bleibt zu klären.

MinC und MinE werden durch membrangebundene MinD Dimere zur Plasmamembran rekrutiert. Dort binden MinC und MinE nahe der Kopplungsstelle des MinD Dimers [47, 48, 39]. Zur gleichen Zeit bindet MinE via amphipathischer  $\alpha$ -Helix an die Membran [33]. Die Bindung von MinE erhöht die ATPase Aktivität von MinD und leitet damit das Ablösen von MinD von der Plasmamembran ein [36, 37]. Durch die direkte Wechselwirkung mit der Membran kann MinE noch selbst nach dem Ablösen von MinD kurzzeitig an der Membran verweilen und mit einem weiteren membrangebundenen MinD Dimer ein Bindung eingehen [32, 33]. Da die Bildung der  $\alpha$ -Helix von MinE von der Bildung eines Komplexes mit dessen Substrats MinD abhängig ist, ist dieses Verhalten vergleichbar mit prozessiven Proteinen, welche in der Lage sind, an ihrem Substrat gebunden zu bleiben, während sie eine große Zahl an Katalysen durchführen bevor sie sich selbst ablösen [49].

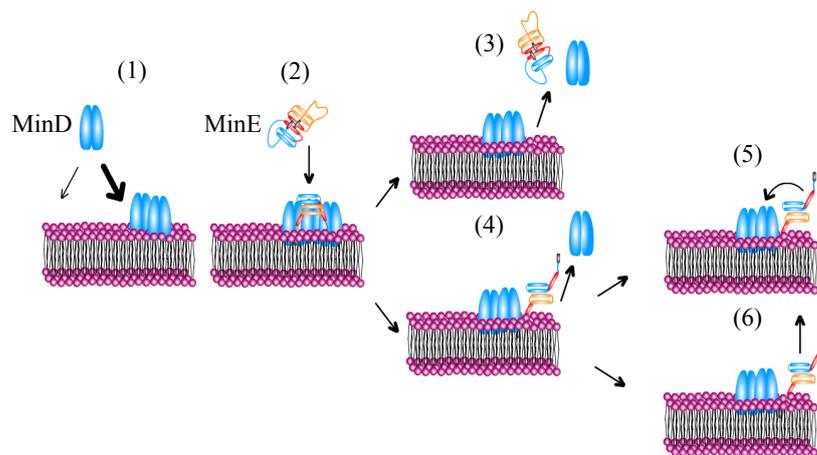


Abbildung 5: **Schematische Darstellung der berücksichtigten molekularen Prozesse zwischen MinD, MinE und der Plasmamembran.** Zytosolische MinD Dimere binden mit einer erhöhten Rate in der Umgebung von membrangebundenem MinD an die Membran (1). Zytosolisches MinE bindet an membrangebundenes MinD und bildet einen MinDE Komplex (2). MinDE Komplexe können sich auf zwei unterschiedlichen Wegen von der Membran lösen: MinD und MinE lösen sich zeitgleich von der Membran ab (3) oder ausschließlich MinD löst sich ab, wogegen MinE an der Membran bleibt (4). Dort kann MinE an ein weiteres nahegelegenes membrangebundenes MinD Molekül binden (5) oder sich ablösen (6).

### 3.2 DIE MOLEKULAREN PROZESSE UND DIE DYNAMISCHEN GLEICHUNGEN

Von den molekularen Wechselwirkungen, welche im ersten Teilabschnitts dieses Kapitels aufgezeigt werden, leiten wir die wichtigsten Reaktionen ab, welche für die makroskopische Dynamik der Min-Protein Verteilung von Bedeutung sind. Um unsere Beschreibung möglichst einfach zu halten, betrachten wir nur MinD Dimere.

Die in unserer Analyse berücksichtigten Prozesse sind die Folgenden: MinD bindet mit der Rate  $\omega_D$  an die Membran, siehe Abbildung 5. Kooperative Effekte beim Binden von MinD führen zu einer erhöhten Binderate, wenn sich membrangebundenes MinD in direkter Nähe befindet. Wir berücksichtigen diesen Effekt durch Erhöhen der Binderate  $\omega_D$  um  $\omega_{dD}$  multipliziert mit der lokalen Dichte von membrangebundenem MinD. MinE bindet an membrangebundenes MinD und beide Moleküle bilden einen MinDE Komplex [50]. Dieser Prozess findet mit Rate  $\omega_E$  multipliziert mit der lokalen Dichte von membrangebundenem MinD statt. Der MinDE Komplex kann sich auf zwei Wegen von der Membran lösen: Entweder lösen sich sowohl MinD als auch MinE zeitgleich von der Membran ab oder nur MinD löst sich ab und MinE bleibt an der Membran gebunden. Beide Prozesse finden mit den Raten  $\omega_{de,c}$  bzw.  $\omega_{de,m}$  statt. MinE Moleküle im membrangebundenen Zustand können an nahegelegenes MinD im membrangebundenen Zustand binden. Dies geschieht mit der Rate  $\omega_{ed}$  multipliziert mit der lokalen Dichte von membrangebundenem MinD oder sie lösen sich mit der Rate  $\omega_e$  von der Membran ab.

Alle Moleküle können sowohl im zytosolischen als auch im membrangebundenen Zustand diffundieren. Wir ignorieren jegliche räumliche Inhomogenitäten, etwa hervorgerufen durch Variationen in der Lipidzusammensetzung der Membran, durch die mögliche Bildung von MinD Clustern auf der Membran oder durch die Verdrängung des Zytoplasmas aufgrund des Nukleotids. Wir vermuten jedoch, dass diese Effekte im Vergleich zu den betrachteten Prozessen nur von untergeordneter Bedeutung sind. Um die Muster zu analysieren, welche durch die betrachteten Reaktionen entstehen, verwenden wir zwei unterschiedliche Ansätze. Einerseits verwenden wir einen Mean Field Ansatz, welcher ein System von partiellen Differentialgleichungen liefert. Auf der anderen Seite nutzen wir ein teilchen-basiertes stochastisches Modell. In diesem Modell entspricht jedes Molekül einem Teilchen, welches sich sowohl im Zytoplasma als auch auf der Membran zufällig bewegt und den beschriebenen Reaktionen unterliegt, welche sich stochastisch ereignen. Das verwendete Reaktionsschema sieht wie folgt aus:

$$\text{MinD}_{\text{cyt}} \xrightarrow{\omega_D} \text{MinD}_{\text{mem}} \quad (1)$$

$$\text{MinD}_{\text{cyt}} + \text{MinD}_{\text{mem}} \xrightarrow{\omega_{dD}} 2 \cdot \text{MinD}_{\text{mem}} \quad (2)$$

$$\text{MinE}_{\text{cyt}} + \text{MinD}_{\text{mem}} \xrightarrow{\omega_E} \text{MinDE} \quad (3)$$

$$\text{MinDE} \xrightarrow{\omega_{de,c}} \text{MinD}_{\text{cyt}} + \text{MinE}_{\text{cyt}} \quad (4)$$

$$\text{MinDE} \xrightarrow{\omega_{de,m}} \text{MinD}_{\text{cyt}} + \text{MinE}_{\text{mem}} \quad (5)$$

$$\text{MinE}_{\text{mem}} + \text{MinD}_{\text{mem}} \xrightarrow{\omega_{ed}} \text{MinDE} \quad (6)$$

$$\text{MinE}_{\text{mem}} \xrightarrow{\omega_e} \text{MinE}_{\text{cyt}}. \quad (7)$$

Des Weiteren berücksichtigen wir, dass aufgrund der räumlichen Ausdehnung der Proteins, die Dichte von membrangebundenem MinD begrenzt ist. Die Binderate von MinD in einem bestimmten Gebiet der Membran, wird somit proportional zur Anzahl an Bindungsplätzen in diesem Gebiet.

Im Mean Field-Ansatz ist der Zustand des Systems zu einem Zeitpunkt  $t$  durch die räumliche Verteilung der Dichten von membrangebundenem und zytosolischem MinD, MinE und dem MinDE-Komplex bestimmt. Die Volumendichten  $c_D$  und  $c_E$  bezeichnen die zytosolen Konzentrationen von MinD und MinE. Die Oberflächendichten  $c_d$ ,  $c_{de}$  und  $c_e$  kennzeichnen die Dichten von membrangebundenem MinD, MinE und dem MinDE-Komplex. Die zeitliche Entwicklung dieser Dichten ist durch folgendes partielle Differentialgleichungssystem gegeben:

$$\partial_t c_D = D_D \Delta c_D \quad (8)$$

$$\partial_t c_E = D_E \Delta c_E \quad (9)$$

$$\begin{aligned} \partial_t c_d = & D_d \Delta_{\parallel} c_d + c_D (\omega_D + \omega_{dD} c_d) (c_{\max} - c_d - c_{de}) / c_{\max} \\ & - \omega_E c_E c_d - \omega_{ed} c_e c_d \end{aligned} \quad (10)$$

$$\begin{aligned} \partial_t c_{de} = & D_{de} \Delta_{\parallel} c_{de} + \omega_E c_E c_d + \omega_{ed} c_e c_d \\ & - (\omega_{de,m} + \omega_{de,c}) c_{de} \end{aligned} \quad (11)$$

$$\partial_t c_e = D_e \Delta_{\parallel} c_e + \omega_{de,m} c_{de} - \omega_{ed} c_e c_d - \omega_e c_e \quad (12)$$

Die Dichten  $c_d$ ,  $c_e$  und  $c_{de}$  sind ausschließlich auf der Membranoberfläche definiert. In den Gleichungen (10)-(12) bezeichnet  $\Delta_{\parallel}$  den Laplace-Operator auf der Oberfläche und  $D_d$ ,  $D_{de}$  und  $D_e$  die Diffusionskonstanten von membrangebundenem MinD, MinDE und MinE. Die Konstante  $c_{\max}$  steht für die maximale Dichte von membrangebundenem MinD. In den Gleichung (10) und (11) werden die Dichten  $c_D$  und  $c_E$  in den gleichen Punkten wie die entsprechenden Oberflä-

chendichten ausgewertet. In Gleichung (8) und (9) steht  $\Delta$  für den Laplace-Operator in drei Dimensionen und  $D_D$  und  $D_E$  für die Diffusionskonstanten von zytosolischem MinD und MinE. Die dynamischen Gleichungen (8) und (9) werden durch Randbedingungen an die Diffusionsströme komplementiert. Die zur Membran senkrechte Komponente der Diffusionsströme für MinD und MinE entsprechen der Nettobinderate des jeweiligen Proteins. Formal lassen sich die Ströme schreiben als

$$-D_D \nabla_{\perp} c_D = c_D (\omega_D + \omega_{dD} c_d) (c_{\max} - c_d - c_{de}) / c_{\max} - (\omega_{de,m} + \omega_{de,c}) c_{de} \quad (13)$$

$$-D_E \nabla_{\perp} c_E = \omega_{EC} c_d - \omega_e c_e - \omega_{de,c} c_{de} \quad (14)$$

In den Gleichungen (13) und (14) entspricht  $\nabla_{\perp}$  dem nach außen gerichteten Gradienten senkrecht zur Oberfläche. Anzumerken ist hier, dass das System aus den dynamischen Gleichungen (8)-(12) und den Randbedingungen an die Diffusionsströme (13) und (14) die Teilchenzahl erhält.

In den nun folgenden beiden Kapiteln wird die stochastische Dynamik (1)-(7) und die deterministischen Gleichungen (8)-(14) in den entsprechenden *in vivo* und *in vitro* Geometrien gelöst. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 1 dargestellt. Da die Gesamtdichten  $C_D$  und  $C_E$  von MinD und MinE in den *in vivo* Simulationen variieren, sind sie in den entsprechenden Bildunterschriften angegeben. In den dreidimensionalen *in vitro* Simulationen sind die Gesamtdichten  $C_D = 484 \mu\text{m}^{-3}$  und  $C_E = 696 \mu\text{m}^{-3}$ . Diese bleiben in allen 3D *in vitro* Simulationen unverändert.

|                 | <i>in vivo</i>                                      | <i>in vitro</i>                                     | wachsende Zelle (1D)                              |
|-----------------|---|---|---|
| $D_D$           | $14 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$                 | $50 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$                 | $14 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$               |
| $D_E$           | $14 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$                 | $50 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$                 | $14 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$               |
| $D_d$           | $0.06 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$               | $0.3 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$                | $0.06 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$             |
| $D_e$           | $0.3 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$                | $1.8 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$                | $0.3 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$              |
| $D_{de}$        | $0.06 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$               | $0.3 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$                | $0.06 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$             |
| $c_{\max}$      | $5.4 \cdot 10^3 \frac{1}{\mu\text{m}^2}$            | $2.75 \cdot 10^4 \frac{1}{\mu\text{m}^2}$           | $5.4 \cdot 10^3 \frac{1}{\mu\text{m}}$            |
| $\omega_D$      | $0.1 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$                  | $5 \cdot 10^{-4} \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$      | $0.1 \frac{1}{\text{s}}$                          |
| $\omega_{dD}$   | $8.8 \cdot 10^{-3} \frac{\mu\text{m}^3}{\text{s}}$  | $3.18 \cdot 10^{-3} \frac{\mu\text{m}^3}{\text{s}}$ | $8.8 \cdot 10^{-3} \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$  |
| $\omega_E$      | $6.96 \cdot 10^{-5} \frac{\mu\text{m}^3}{\text{s}}$ | $1.36 \cdot 10^{-4} \frac{\mu\text{m}^3}{\text{s}}$ | $6.96 \cdot 10^{-5} \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ |
| $\omega_{ed}$   | $0.139 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$              | $4.9 \cdot 10^{-3} \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  | $0.139 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$              |
| $\omega_{de,c}$ | $0.08 \frac{1}{\text{s}}$                           | $0.16 \frac{1}{\text{s}}$                           | $0.08 \frac{1}{\text{s}}$                         |
| $\omega_{de,m}$ | $1.5 \frac{1}{\text{s}}$                            | $2.52 \frac{1}{\text{s}}$                           | $1.5 \frac{1}{\text{s}}$                          |
| $\omega_e$      | $0.5 \frac{1}{\text{s}}$                            | $0.5 \frac{1}{\text{s}}$                            | $0.5 \frac{1}{\text{s}}$                          |

Tabelle 1: Parameterwerte, welche für die numerische Lösung der deterministischen dynamischen Gleichungen (8)-(14) und für die Simulationen der stochastischen Dynamik (1)-(7) verwendet wurden. Die Gesamtkonzentrationen  $C_E$  und  $C_D$  von MinE und MinD sowie die Länge der Zellgeometrie variieren zwischen den einzelnen Simulationen und sind in der jeweiligen Bildunterschrift angegeben.

## MUSTERBILDUNG VON MIN-PROTEINEN IN ZELLULÄREN GEOMETRIEN

---

In diesem Kapitel wird die Musterbildung der Min-Proteine in zellulären Geometrien untersucht. Dazu werden sowohl die stochastischen als auch die deterministischen dynamischen Gleichungen aus Kapitel 3 in einer stäbchenförmigen Geometrie gelöst. Die in diesem Kapitel verwendeten Parameter sind in Tabelle 1 angegeben. Die zytosolischen Diffusionskonstanten wurden in Ref. [51] gemessen. Die Diffusionskonstanten von membrangebundenem MinD, MinE und MinDE wurde nicht direkt gemessen, sie sind jedoch gewöhnlich zwei bis drei Größenordnungen kleiner als die Diffusionskonstanten im Zytoplasma [52]. Um die maximale Dichte von membrangebundenem MinD zu bestimmen, gehen wir davon aus, dass die dichteste Packung von membrangebundenem MinD einer Dichte von  $1/(\text{laterale Ausdehnung eines MinD Dimers})$  entspricht. Dies liefert einen Wert für  $c_{max}$  von etwa  $4 \cdot 10^4 \mu\text{m}^{-2}$ . Da auf der Membran außer MinD und MinE auch weitere Proteine binden und somit Bindungsplätze auf natürliche Weise besetzt sind, verwenden wir für  $c_{max}$  einen reduzierten Wert von  $c_{max} = 5.4 \cdot 10^3 \mu\text{m}^{-2}$ . Die Werte aller übrigen Parameter wurden so gewählt, dass die dynamischen Gleichungen die experimentell beobachteten Muster in ihrer Gesamtheit reproduzieren können.

### 4.1 POL-POL OSZILLATIONEN UND STEHENDE WELLEN MIT MEHREREN KNOTEN

Pol-Pol Oszillationen sind die physiologisch wichtigsten Muster, die durch das Min-System im Bakterium *E.coli* gebildet werden, da sie eine zentrale Rolle bei der Positionierung der Zellteilung übernehmen. Entsprechen die Dichten von MinD und MinE denen in Wildtyp *E. coli* Zellen, so liefern die dynamischen Gleichungen in einer Zellgeometrie der Länge  $L = 3.8 \mu\text{m}$ , Pol-Pol Oszillation, siehe Abbildung 6A. Die Periode der Oszillationen ist etwa 50s und steht damit in guter Übereinstimmung mit den experimentell gemessenen Perioden von Pol-Pol Oszillationen. Das Muster verändert sich qualitativ nicht, solange die Länge  $L$  des Bakterium eine kritische Länge  $L_{krit}$  von etwa  $5 \mu\text{m}$  nicht überschreitet. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten [53, 54] zeigen auch die stochastischen Simulatio-

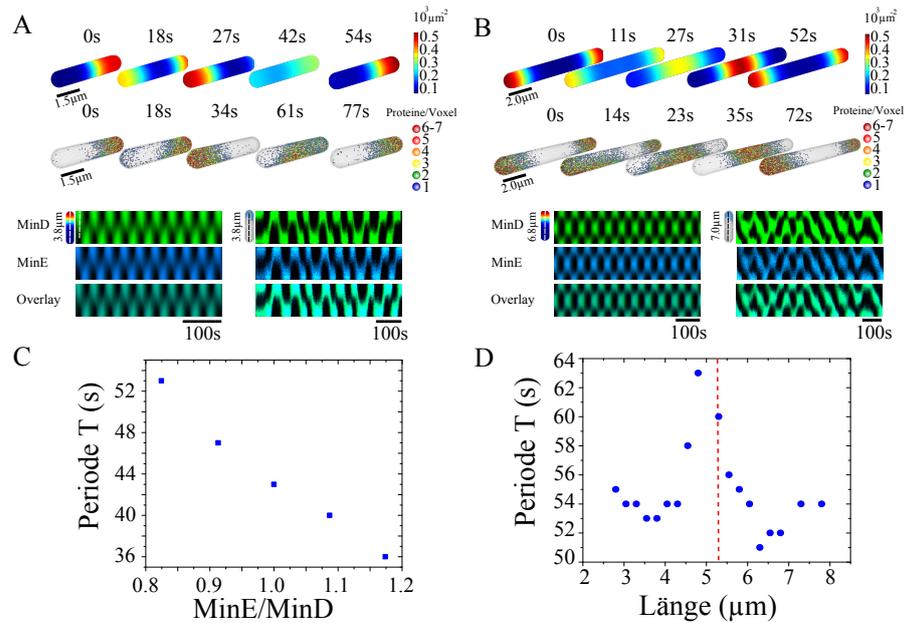


Abbildung 6: **Stehende Wellen in bakteriellen Geometrien.** A) Pol-Pol Oszillation für eine Zelllänge von  $3,8 \mu\text{m}$ . B) Stehende Welle mit zwei Knoten für eine Zelle der Länge von  $7 \mu\text{m}$ . Der Durchmesser der Zellgeometrie in beiden Fällen ist  $0,8 \mu\text{m}$ . Die obersten Reihen in A) und B) zeigen die Verteilung von membrangebundenem MinD der deterministischen Simulation zu verschiedenen Zeitpunkten. Die mittleren Reihen zeigen die entsprechenden Ergebnisse der stochastischen Simulationen. In den unteren Reihen sind jeweils links die Kymographen der deterministischen Simulation und rechts die Kymographen der stochastischen Simulation dargestellt. C) Periode der deterministischen Pol-Pol Oszillation als Funktion der Gesamtkonzentration von MinE mit  $C_D = 1,15 \cdot 10^3 \mu\text{m}^{-3}$ . D) Periode als Funktion der Zelllänge mit  $C_D = 1,4 \cdot 10^3 \mu\text{m}^{-3}$  und  $C_E = 9,7 \cdot 10^2 \mu\text{m}^{-3}$ . Die rote Linie markiert die Länge bei der die Pol-Pol Oszillation in eine stehende Welle mit zwei Knoten übergeht.

nen, dass Pol-Pol Oszillationen stabil gegenüber molekularem Rauschen sind.

Für Zelllängen größer als  $L = 5 \mu\text{m}$  verändert sich das Muster. In diesem Fall bilden die Min-Proteine, stehende Wellen, deren Knotenzahlen größer als eins sind, siehe Abbildung 6B und Abbildung 7. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den experimentell beobachteten Mustern in langen Zellen. Der Ursprung des Entstehens mehrerer Knoten liegt in der charakteristischen Wellenlänge der Min-Protein-Muster begründet. Die Eigenschaft der Muster des Min-Systems, eine charakteristische Wellenlänge zu besitzen, zeigt sich auch in der *in vitro* Musterbildung [3], welche in Kapitel 5 diskutiert wird.

In Abbildung 6C und D ist die Periode der Oszillation als Funktion der MinE-Gesamtkonzentration  $C_E$  und der Zelllänge  $L$  dargestellt. Da durch eine wachsende Gesamtkonzentration von MinE, die Membrandichte von MinE und damit auch die Aktivität zunimmt mit der

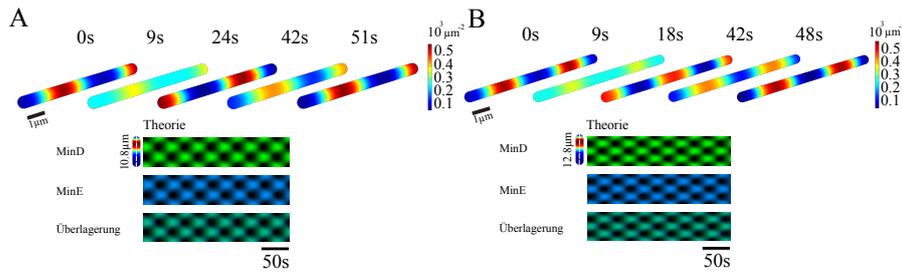


Abbildung 7: **Stehende Wellen mit mehreren Knoten.** Stehende Welle mit drei (A) und vier (B) Knoten in bakteriellen Geometrien der Länge  $L=10.8\mu\text{m}$  und  $L=12.8\mu\text{m}$ . Der Durchmesser der Zellgeometrien ist in beiden Fällen  $0.8\mu\text{m}$ . Die Zeitserien zeigen die Verteilung von membrangebundenem MinD in den deterministischen Simulationen. Darunter sind die entsprechenden Kymographen dargestellt. Die Gesamtkonzentrationen von MinD und MinE sind  $C_D = 1.4 \cdot 10^3\mu\text{m}^{-3}$  und  $C_E = 9.7 \cdot 10^2\mu\text{m}^{-3}$ .

MinD von der Membran gelöst wird, nimmt die Periode  $T$  mit wachsendem  $C_E$  ab. Die Abhängigkeit der Periode von der Zelllänge ist nicht monoton und im Vergleich zur  $C_E$ -Abhängigkeit nur schwach ausgeprägt. Abbildung 6C und D machen deutlich, dass die Oszillationsperiode keine robuste Eigenschaft des Min-Systems ist. Dies steht auch im Einklang mit experimentellen Messungen der Periode als Funktion der Zelllänge in lebenden *E.coli* Zellen [19, 31].

#### 4.2 LAUFENDE WELLEN

Veränderungen in der Musterbildung der Min-Proteine entstehen nicht nur durch die Variation der Zelllänge  $L$ , sie treten auch bei der Änderung der Gesamtkonzentration von MinD und MinE auf. Wie in Abbildung 8 zu sehen ist, finden wir laufende Wellen in Zellen der Länge  $L = 4.8\mu\text{m}$  bei einer MinD-Gesamtkonzentration von  $C_D = 2.2 \cdot 10^3\mu\text{m}^{-3}$  und einer MinE-Gesamtkonzentration von  $C_E = 1.5 \cdot 10^3\mu\text{m}^{-3}$ . Diese sind im Vergleich zu den Gesamtkonzentrationen  $C_D = 1.4 \cdot 10^3\mu\text{m}^{-3}$  und  $C_E = 9.7 \cdot 10^2\mu\text{m}^{-3}$  in Abbildung 6 und Abbildung 7 leicht erhöht. Im Fall von laufenden Wellen, akkumulieren die Min-Proteine an einem Pol der Zelle und laufen entlang der Membran in Richtung des gegenüberliegenden Pols. Dort angekommen lösen sie sich von der Membran ab und diffundieren durchs Zytoplasma zurück zu dem Pol, von dem sie gestartet sind. Dort binden sie erneut an die Membran und der Prozess beginnt von vorn. In langen Zellen, bilden sich laufende Wellen, die sich in mehrere Wellenpakete aufspalten, siehe Abbildung 9A. Dies spiegelt erneut die inhärente Wellenlänge des Min-Systems wider. Aufgrund der Symmetrie des Systems, beobachtet man in den stochastischen Simulationen von Zeit zu Zeit eine Änderung der Bewegungsrichtung der

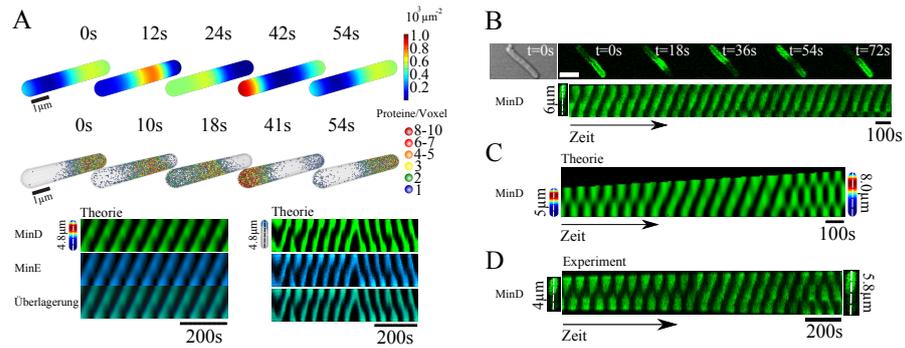


Abbildung 8: **Laufende Wellen in bakteriellen Geometrien.** A) Laufende Wellen in den deterministischen (oberste Zeile) und stochastischen (mittlere Zeile) Simulationen zu verschiedenen Zeitpunkten. In der untersten Zeile werden die Kymographien der deterministischen (links) und stochastischen Rechnung (rechts) dargestellt. Die Gesamtkonzentrationen von MinD und MinE sind  $C_D = 2.2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^{-3}$  und  $C_E = 1.5 \cdot 10^2 \mu\text{m}^{-3}$ . Der Durchmesser der Zellgeometrie ist  $0.8 \mu\text{m}$ . B) Verteilung von MinD-GFP in einer lebenden Zelle der Länge  $6 \mu\text{m}$ . C) Kymograph von membrangebundenem MinD in einer simulierten wachsenden eindimensionalen Zelle. Die Gesamtkonzentrationen sind  $C_D = 8.4 \cdot 10^2 \mu\text{m}^{-1}$  und  $C_E = 5.8 \cdot 10^2 \mu\text{m}^{-1}$ . D) Verteilung von MinD-GFP in einer lebenden wachsenden Zelle.

laufenden Wellen, wie sie beispielsweise in den Kymographen der stochastischen Simulation in Abbildung 8A zu sehen ist.

Um nun herauszufinden, ob wir laufende Wellen auch experimentell beobachten können, verwenden wir *E. coli* Zellen, welche MinD-GFP exprimieren und beobachten die Dynamik von MinD-GFP mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. In lebenden *E. coli* Zellen mit einer Länge größer als  $6 \mu\text{m}$ , können wir laufende Wellen beobachten, wie sie durch die dynamischen Gleichungen vorhergesagt werden, siehe Abbildung 8B. Des Weiteren können wir in sehr langen Zellen mit einer Länge von etwa  $19 \mu\text{m}$ , laufende Wellen mit zwei Wellenpaketen beobachten, siehe Abbildung 9B. Auch dies wird durch die dynamischen Gleichungen vorhergesagt. Erste Hinweise für laufende Min-Wellen *in vivo* konnten auch schon in einer früheren Arbeit von Shih et al. [55] gefunden werden. Shih et al. zeigten für *E. coli* Zellen mit  $\text{MinE}^{D45A/V49A}$ , dass sich ein Min-Protein Band von Zeit zu Zeit von einem Pol der Zelle zum gegenüberliegenden Pol bewegt. Laufende Wellen, die sich über einen längeren Zeitraum in eine Richtung ausbreiten, wie sie etwa in Abbildung 8B zu sehen sind, konnten in der Arbeit von Shih et al. jedoch nicht beobachtet werden.

Um nun einen Bezug zwischen laufenden Wellen in lebenden *E. coli* Zellen mit denen in *in vitro* Systemen, siehe Abbildung 4, herzustellen, vergleichen wir deren Wellengeschwindigkeiten und Wellenlängen. Die experimentell gemessene *in vivo* Wellengeschwindigkeit ist

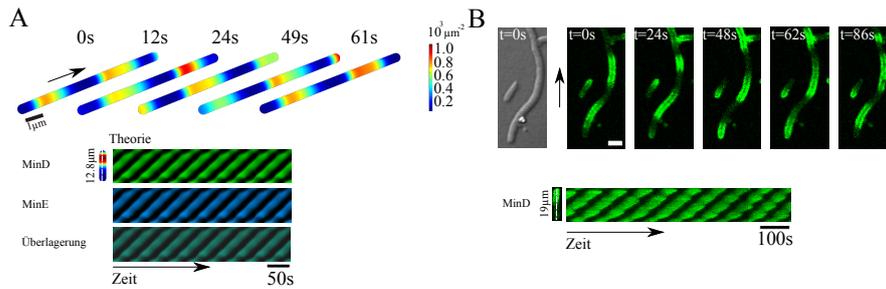


Abbildung 9: **Laufende Wellen mit zwei Wellenpaketen.** A) Laufende Wellen in den deterministischen Rechnungen in langen Zellen und entsprechende Kymographen. Die Gesamtkonzentrationen von MinD und MinE sind  $C_D = 1.7 \cdot 10^3 \mu\text{m}^{-3}$  und  $C_E = 1.2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^{-3}$ . Der Durchmesser der Zellgeometrie ist  $0.8 \mu\text{m}$ . B) Verteilung von MinD-GFP in einer langen lebenden *E. coli* Zelle. Der Maßstab ist  $2 \mu\text{m}$ . Der Kymograph im unteren Teil der Abbildung zeigt die räumliche Verteilung von MinD-GFP als Funktion der Zeit. Die schwarze Pfeile neben den Zeitserien in (A) und (B) kennzeichnen die Laufrichtung der Wellen.

etwa  $0.1 \mu\text{m}/\text{s}$ , verglichen mit etwa  $0.6 \mu\text{m}/\text{s}$  *in vitro*. Dagegen misst man für die Wellenlänge annähernd  $6 \mu\text{m}$  *in vivo* und  $70 \mu\text{m}$  *in vitro* [3, 32]. Ein Vergleich der Verhältnisse von Wellengeschwindigkeit zu Wellenlänge *in vitro* mit dem entsprechenden Verhältnis *in vivo* zeigt, dass beide Verhältnisse nahezu gleich groß sind. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass der Ursprung der laufenden Wellen *in vivo* mit dem Ursprung der Wellen *in vitro* übereinstimmt und damit die Selbstorganisation der Min-Proteine ist.

Unsere Simulationen machen zusätzlich auf eine weitere Situation aufmerksam, in der laufende Wellen beobachtet werden: In wachsenden Zellen bilden sich laufende Wellen typischerweise bei Längen, bei denen eine stehende Welle mit  $n$  Knoten in eine stehende Welle mit  $n+1$  Knoten überführt wird, siehe Abbildung 8C für den Fall  $n=1$ . Auch diese Voraussage wird durch experimentelle Daten bestätigt. In Langzeitmessungen der MinD-GFP Verteilung in wachsenden *E. coli* Zellen, beobachtet man, dass sich beim Übergang von stehenden Wellen unterschiedlicher Knotenzahlen, vorübergehend laufende Wellen bilden, siehe Abbildung 8D. Für die Simulation der wachsenden Zelle wurden die dynamischen Gleichungen in 1D gelöst. Das genaue Vorgehen bei der Simulation einer wachsenden eindimensionalen Zelle wird in Abschnitt A.1 beschrieben.

#### 4.3 PHASENDIAGRAMM

Um ein vollständiges Bild der Muster zu erhalten, die in der bakteriellen Geometrie gebildet werden, sind in Abbildung 10, Schnitte durch den Phasenraum dargestellt, welche man durch Lösen der

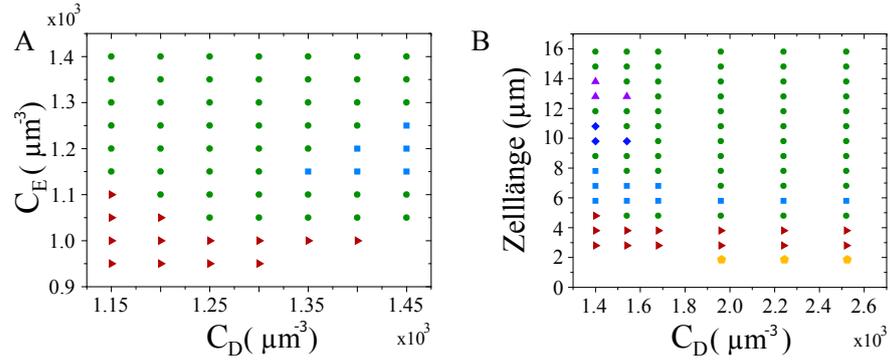


Abbildung 10: **Phasendiagramme.** A) Muster, die das Min-System in einer zellulären Geometrie der Länge  $4.8\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von  $0.8\mu\text{m}$  für unterschiedliche Gesamtkonzentrationen von MinD und MinE bildet. B) Musterbildung in Abhängigkeit der Zelllänge und der MinD Gesamtkonzentration bei einem konstanten Verhältnis  $C_E/C_D=0.69$ . Der Zelldurchmesser beträgt  $0.8\mu\text{m}$ . Die verwendeten Symbole besitzen die folgende Bedeutung: Rotes Dreieck - Pol-Pol Oszillation, grüner Kreis - laufende Welle, hellblaues Quadrat - stehende Welle mit zwei Knoten, gelbes Fünfeck - inhomogen stationärer Zustand, dunkelblaue Raute - stehende Welle mit drei Knoten, purpurnes Dreieck - stehende Welle mit vier Knoten.

dynamischen Gleichungen (8)-(14) bei Variation der dargestellten Parameter erhält. In einem ersten Schritt diskutieren wir den Einfluss der Gesamtkonzentrationen  $C_D$  und  $C_E$  auf die Musterbildung in einer Zelle der konstanten Länge  $L=4.8\mu\text{m}$ , siehe Abbildung 10A. Für  $C_E \lesssim 0.9$  ist die Verteilung der Min-Proteine homogen. Für höhere MinE-Konzentrationen bilden sich stehende Wellen. Ein weiterer Anstieg von  $C_E$  führt zu laufenden Wellen. Für  $C_D \gtrsim 1.35 \cdot 10^3 \mu\text{m}^{-3}$  bilden sich stehende Wellen mit zwei Knoten in einem begrenzten Bereich des Phasenraums. In Abbildung 10B ist das Phasendiagramm als Funktion der Konzentration  $C_D$  und der Zelllänge  $L$  bei festem Verhältnis der Gesamtkonzentrationen  $C_E/C_D = 0.69$  dargestellt. Für genügend geringe Konzentrationen  $C_D$ , bildet das System bevorzugt stehende Wellen, deren Knotenzahl mit wachsender Länge zunimmt. Stehende Wellen mit unterschiedlichen Knotenzahlen, werden durch laufende Wellen getrennt. Mit zunehmender Konzentration  $C_D$  verschwinden die stehenden Wellen mit mehreren Knoten. Stattdessen erscheint für  $C_D \gtrsim 2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^{-3}$  und  $L \lesssim 2\mu\text{m}$  ein neuer Zustand. In diesem Zustand ist der Großteil der Proteine entweder am linken oder rechten Zellpol stationär lokalisiert. Aufgrund der Symmetrie der Zelle, koexistieren beide spiegelsymmetrische Lösungen. Im folgenden Teilabschnitt soll die Stabilität dieses inhomogen stationären Zustandes unter dem Einfluss von molekularem Rauschen untersucht werden.

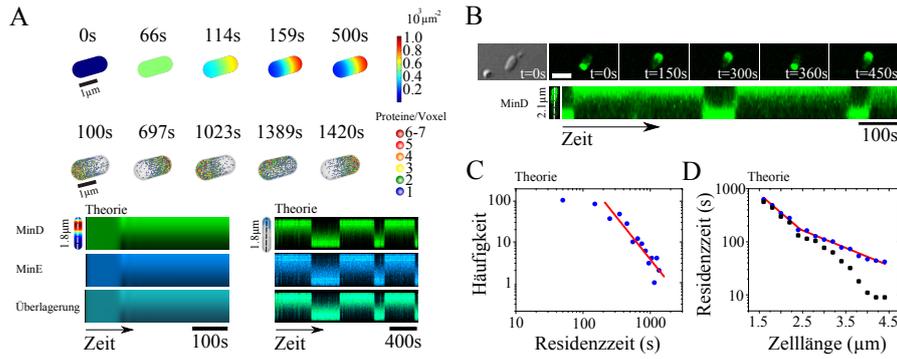


Abbildung 11: **Stationäres Muster und stochastisches Schalten in bakteriellen Geometrien.** A) Musterbildung in einer Zelle der Länge  $1.8\mu\text{m}$  für die Gesamtdichten  $C_D = 2.2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^{-3}$  und  $C_E = 1.5 \cdot 10^3 \mu\text{m}^{-3}$  in der deterministischen Simulation (oberer Teil) sowie der stochastischen Simulation (mittlerer Teil). Der Durchmesser der Zellen ist in beiden Simulationen  $0.8\mu\text{m}$ . Unterer Teil: Dazugehörige Kymographen. B) Verteilung von MinD-GFP in einer lebenden Zelle der Länge  $2.1\mu\text{m}$ . C) Häufigkeitsverteilung der Residenzzeiten der Min-Proteine in Zellen der Länge  $1.6\mu\text{m}$ ,  $1.8\mu\text{m}$ ,  $2.0\mu\text{m}$ ,  $2.2\mu\text{m}$  und  $2.4\mu\text{m}$ . D) Mittlere Residenzzeiten (blaue Punkte) und Standardabweichungen der entsprechenden Mittelwerte (schwarze Quadrate) als Funktion der Zelllänge. Die rote Linie entspricht Exponentialfunktionen mit den charakteristischen Längen  $1.45\mu\text{m}$  und  $3.0\mu\text{m}$ .

#### 4.4 STOCHASTISCHES SCHALTEN

In den bisher diskutierten Beispielen spielten die Auswirkungen von molekularem Rauschen auf die Musterbildung der Min-Proteine nur eine untergeordnete Rolle. Dies steht im direkten Einklang mit vorangegangenen Arbeiten [53, 54, 56]. Es gibt jedoch Beispiele, in denen die Berücksichtigung des Rauschens wichtig ist, um die Musterbildung der Min-Proteine zu verstehen. In Zellen beispielsweise, denen die negativ geladenen Lipide Phosphatidylethanolamine fehlen, bildet MinD fokale Cluster auf der Zellmembran, deren Erscheinungsort als auch Lebensdauer stochastischen Gegebenheiten unterliegen [40, 54]. Ein weiteres Beispiel für die Beeinflussung der Musterbildung durch molekulares Rauschen, zeigt sich in kurzen Zellen bei einer leichten Überexpression der Min-Proteine. In diesen Zellen akkumulieren die Proteine in einem der beiden Zellpole. Dort verweilen sie eine unbestimmte Zeit, lösen sich danach ab und akkumulieren am gegenüberliegenden Pol. Die Verweildauer der Proteine an den Polen ist stochastisch verteilt, siehe Abbildung 11B [23, 9]. Wie unsere Analysen der dynamischen Gleichungen (8)-(14) zeigten, existieren in kurzen Zellen symmetrische stationäre Lösungen. Diese Lösungen sind dadurch charakterisiert, dass der überwiegende Anteil der Min-Proteine in einem der beiden Zellpole lokalisiert ist. Während in den

deterministischen Simulationen die Verteilung stationär ist, würde man in einem stochastischen System erwarten, dass der Zustand des Systems stochastisch zwischen den beiden symmetrischen Lösungen hin und her schalten kann. Genau dieses Verhalten beobachtet man in teilchen-basierten stochastischen Simulationen unter der Bedingung, dass MinD und MinE unter einer erhöhten Gesamtkonzentration vorliegen und die Zelllänge unterhalb eines kritischen Wertes liegt (Abbildung 11A).

Genau wie in den Experimenten ist auch in den Simulationen, die Dauer des Schaltvorgangs wesentlich kürzer als die Verweildauer der Proteine an einem Pol. In Abbildung 11C ist die Häufigkeitsverteilung der Residenzzeiten aus den Daten der stochastischen Simulationen dargestellt. Die Steigung der Fitgeraden beträgt  $-2.06 \pm 0.27$ . Dieser Wert stimmt mit dem experimentellen Wert von  $-2.1$  sehr gut überein. In Abbildung 11D ist die Abhängigkeit der mittleren Residenzzeit und deren Standardabweichung als Funktion der Zelllänge dargestellt. Für Zelllängen zwischen  $1.6\mu\text{m}$  und  $2.4\mu\text{m}$  nimmt die mittlere Residenzzeit mit einer charakteristischen Länge  $\lambda=1.45\mu\text{m}$  exponentiell ab. Eine weitere Vergrößerung der Zelllänge führt zu einer exponentiellen Abnahme mit der charakteristischen Länge  $\lambda=3\mu\text{m}$ , was zu einem Knick im Schnittpunkt der beiden Fitgeraden führt, siehe Abbildung 11D. Vor dem Knick sind die Residenzzeiten und deren Standardabweichungen nahezu gleich groß. Danach fällt die Standardabweichung im Vergleich zur mittleren Residenzzeit stärker ab. Dies lässt sich dadurch erklären, dass mit zunehmender Zelllänge die Gesamtteilchenzahlen von MinE und MinD innerhalb der Zelle zunehmen. Folglich nimmt auch die maximale Teilchenzahl der Proteine in den Polregionen zu, siehe Abbildung 12A. Aufgrund der Prozessivität von MinE führt dies zu einer überproportionalen Verstärkung der Ablösevorgänge von MinD an den Polkappen. Dadurch nimmt das Verhältnis MinD/MinE der maximalen Teilchenzahlen vor dem Übergang zur Pol-Pol Oszillation ab, siehe Abbildung 12B. In den stochastischen Simulationen nimmt in dieser Phase die Schaltfrequenz zu und geht schlussendlich in eine Oszillation über. Der Verlauf der Residenzzeiten und der Standardabweichungen, welcher in Abbildung 11D dargestellt ist, lässt sich qualitativ ähnlich in *in vivo* Experimenten beobachten [23].

#### 4.5 MUSTERBILDUNG IN DICKEN ZELLEN

Die bis hierhin vorgestellten Muster der Min-Proteine sind invariant unter Rotation der Zellen bezüglich ihrer Längsachse. Für genügend

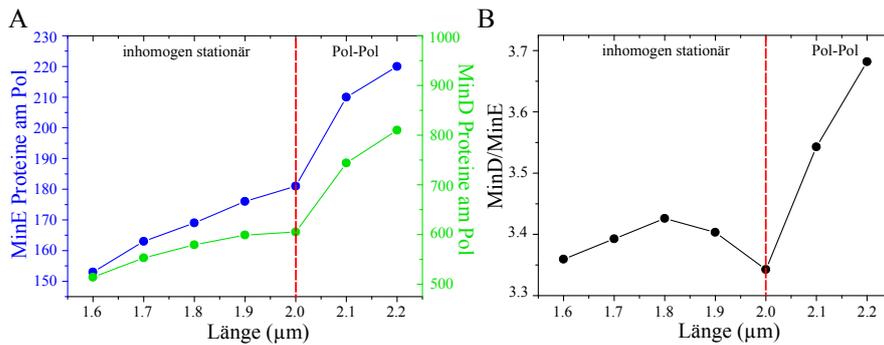


Abbildung 12: **Maximale Anzahl von polaren MinD und MinE Molekülen als Funktion der Zelllänge.** A) Mit wachsender Zelllänge nimmt die maximale Anzahl von MinD und MinE Molekülen an den Polkappen zu. Beim Übergang des inhomogen stationären Zustandes zu den Pol-Pol Oszillationen kommt es zu einem rapiden Anstieg der maximalen Teilchenzahlen. B) Aufgrund der wachsenden Teilchenzahl von polarem MinE mit zunehmender Zelllänge, kommt es zu einer Abnahme der Steigung von polarem MinD (siehe (A)), wodurch das Verhältnis MinD/MinE nach anfänglichem Anstieg abnimmt. Nach dem Übergang zur Pol-Pol Oszillation nimmt das Verhältnis MinD/MinE stark zu. Die Daten entstammen den deterministischen Simulationen. Die Parameter wurden wie in Abbildung 11 gewählt.

große Durchmesser der Zellen, wird man jedoch erwarten, dass diese Symmetrie gebrochen wird.

Es ist möglich den Zelldurchmesser lebender Zellen zu vergrößern, indem man sie mit dem Wirkstoff A22 behandelt. Dieser interagiert mit dem filamentbildenden Protein MreB, welches den Wachstum der Zellwand reguliert [57]. Nach Behandlung mit A22 lässt sich ein Cluster von membrangebundenem MinD beobachten, welches sich entlang Zellmembran von Pol zu Pol bewegt. Bemerkenswert an diesem Prozess ist die spontane Änderung der Bewegungsrichtung des MinD-Clusters in den Zellpolen, siehe Abbildung 13A. In vorangegangenen Arbeiten wurde die Abhängigkeit der Musterbildung von der Zellgröße in runden *rodA* Mutanten [58] und  $\Delta mreB$  Zellen [59] untersucht. Während sich in *rodA* Mutanten irreguläre Oszillationen bildeten, konnten in  $\Delta mreB$  Zellen sowohl gewöhnliche Pol-Pol Oszillationen beobachtet werden als auch Cluster von membrangebundenem MinD, welche die Zelle umkreisen.

Löst man die deterministischen Gleichungen (8)-(14), sowie die stochastischen Gleichungen (1)-(7) in einer Zellgeometrie, welcher der Geometrie einer mit A22 behandelten *E. coli* Zelle entspricht, so sieht man, dass auch hier eine Symmetriebrechung in der Musterbildung bezüglich der Längsachse des Bakteriums stattfindet. Dies ist in Abbildung 13B und Abbildung 13C zu sehen. In den Simulationen bildet sich ein Cluster von membrangebundenem MinD in einem der bei-

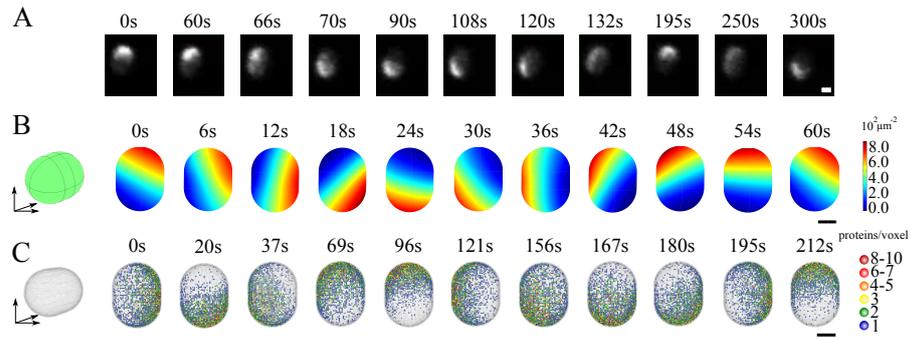


Abbildung 13: **Musterbildung der Min-Proteine in dicken Zellen.** A) Momentaufnahmen der Verteilung von MinD-GFP in lebenden Zellen nach Behandlung mit dem Wirkstoff A22. B) Lösung der deterministischen dynamischen Gleichungen. C) Lösungen des stochastischen Systems. In B) und C) hat die Zellgeometrie einen Durchmesser von  $2\mu\text{m}$  und eine Länge von  $2.7\mu\text{m}$ . Die Gesamtkonzentrationen von MinD und MinE sind  $C_D = 2.2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^{-3}$  und  $C_E = 1.5 \cdot 10^3 \mu\text{m}^{-3}$  in (B) und  $C_D = 0.8 \cdot 10^3 \mu\text{m}^{-3}$  und  $C_E = 0.55 \cdot 10^3 \mu\text{m}^{-3}$  in (C). Die übrigen Parameter sind in Tabelle 1 angegeben. Der Maßstab in A), B) und C) ist  $1\mu\text{m}$ .

den Zellpole, der sich anschließend auf der Zellmembran bewegt. In den deterministischen Rechnungen bewegt sich das Cluster entlang eines klar definierten geschlossenen Weges, ohne die Bewegungsrichtung zu ändern. In den stochastischen Rechnungen hingegen, siehe Abbildung 13C, verändert der Cluster von Zeit zu Zeit die Bewegungsrichtung, wenn er einen Zellpol passiert. Diese Muster unterscheiden sich von den helikalen Wellen, welche in dicken Zellen im Aggregation-Strom Modell beobachtet werden können [60].

#### 4.6 MUSTERBILDUNG IN Y-FÖRMIGEN ZELLEN

Ein weitere Form von *E. coli* Zellen, welche nicht invariant unter der Rotation bzgl. ihrer Längsachse ist, zeigen *E. coli* Mutanten, denen bestimmte Penicillin-bindenden Proteine fehlen. Diese Zellen besitzen eine anormale Zellgestalt in der Form, dass ihre Zelldicke variiert, sie gekrümmt sind oder verästelt und mehrere Zellpole besitzen [22]. In den letzteren soll nun die Musterbildung der Min-Proteine untersucht werden. Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, nutzen die Proteine das gesamte Zellvolumen zur Musterbildung. In Zellen mit nahezu gleich langen Zellzweigen, akkumulieren die Proteine in einem Zellpol und rotieren danach von Zellpol zu Zellpol im Uhrzeiger- bzw. Gegenuhrzeigersinn, siehe Abbildung 3A. Um eine weitere Zellform zu diskutieren, betrachten wir eine Zelle mit einem langen und zwei kurzen Zellzweigen, siehe Abbildung 3B. In diesem Fall akkumulieren die Proteine nacheinander in den Polen der beiden kurzen Zell-

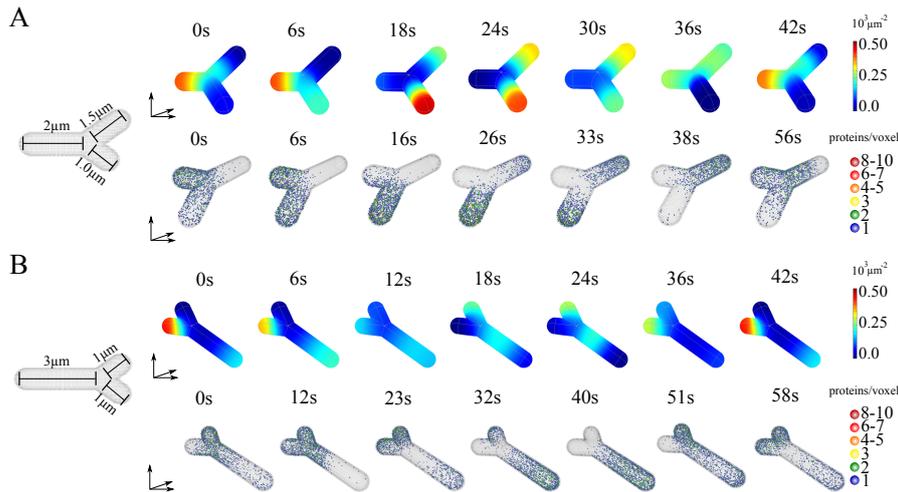


Abbildung 14: **Musterbildung in Y-förmigen Zellen.** Im linken Teil der Abbildung ist die untersuchte Zellgeometrie dargestellt. In den danebenstehenden Zeitserien sind die entsprechenden Ergebnisse der deterministischen Rechnungen (oberer Teil) und die Ergebnisse der stochastischen Rechnungen (unterer Teil) zu sehen. A) Das Maximum der Proteinkonzentration rotiert von Zellpol zu Zellpol im Gegenuhrzeigersinn. B) Die Proteine akkumulieren nacheinander in den beiden kurzen Zellpolen, bevor sie dies am Pol des längeren Zellzweigs tun. Von dort läuft das Konzentrationsmaximum in Richtung der kürzeren Zellzweige und akkumuliert in einem der beiden Pole von neuem. Die Gesamtkonzentrationen von MinD und MinE sind  $C_D = 1.4 \cdot 10^3 \mu\text{m}^{-3}$  und  $C_E = 9.7 \cdot 10^2 \mu\text{m}^{-3}$ .

zweige, bevor sie dies am Pol des längeren Zellzweigs tun. Von dort läuft das Konzentrationsmaximum in Richtung der beiden kürzeren Zweige und akkumuliert in einem der beiden Pole von neuem. Danach beginnt der Verlauf von vorn. Die Ergebnisse der entsprechenden Simulationen sind in Abbildung 14 dargestellt. Die dynamischen Gleichungen sind sowohl in der Lage die rotierenden Muster in Zellen mit nahezu gleich langen Zellzweigen (A), als auch die Muster in Zellen mit zwei kurzen und einem langen Zellzweig (B) zu reproduzieren.

Der Grund für die Rotation der Muster in eine feste Rotationsrichtung kann wie folgt verstanden werden: MinD akkumuliert aufgrund seiner Kooperativität und der Wechselwirkung mit MinE in einem der drei Zellpole. MinE folgt der Verteilung von MinD und löst es von dort ab. Das freiwerdende MinD bindet an den nächsten, am besten zu erreichenden Zellpol und akkumuliert dort von neuem. MinE folgt der Verteilung von MinD und löst es erneut ab. Da nun in zwei der drei Zellpolen, MinE in leicht erhöhter Konzentration vorliegt, bindet MinD als nächstes in dem Pol, in dem es zuvor noch nicht lokalisiert war. Da sich aufgrund der Ablösedynamik, so gut wie keine

Proteine mehr im ersten Pol befinden, beginnt danach der gesamte Prozess von vorn.

#### 4.7 INTUITIVES BILD ZUM VERSTÄNDNIS DER MUSTERBILDUNG *in vivo*

Die Ausbreitung von Wellenfronten *in vitro* kann mit Hilfe folgender Betrachtung verstanden werden. Interpretiert man die Raumkoordinate in Abbildung 16B als Zeitkoordinate, so bindet zytosolisches MinD anfänglich an die noch leerstehende Membran. Die Nichtlinearität im Bindeterm für MinD führt zu einer erhöhten Binderate und somit zu einer zunehmenden Dichte von membrangebundenem MinD. Sobald die Membrandichte von MinD anwächst, bindet auch MinE. Sind genügend Bindestellen für MinE vorhanden, nimmt die Dichte von MinE nahezu linear zu. Mit zunehmender Dichte von MinE nimmt die Nettobinderate ab. Schlussendlich übersteigt die MinE-induzierte Ablöserate, die Binderate von MinD und die Dichte von membrangebundenem MinD nimmt ab. Diese Dichteabnahme geschieht aufgrund der Prozessivität von MinE schlagartig am Heck der Welle.

Mit Hilfe des Mechanismus der Wellenausbreitung *in vitro* lassen sich die Änderungen der Min-Protein Muster *in vivo* in Abhängigkeit der Zelllänge erklären. Aus diesem Grund, führen wir die Diffusionslänge  $l_{\text{diff}}$  ein, welche der Wegstrecke entspricht, die ein Molekül im Mittel diffundiert, bevor es von neuem an die Membran bindet. Für die Diffusionskonstante  $D$  und die Binderate  $\omega$  ist  $l_{\text{diff}}$  gegeben durch  $l_{\text{diff}}^2 = D/\omega$ . Nun betrachten wir eine laufende Welle, die sich in Längsrichtung einer Zelle bewegt. Die Welle wird vorangetrieben durch das Ablösen der Proteine am Heck der Welle und durch das Binden der Proteine an der Vorderfront. Erreicht die Welle nun den Zellpol, können die Proteine, die am Heck der Welle abgelöst werden, nicht mehr in der Vorderfront der Welle binden. Stattdessen diffundieren sie vom Pol weg. Ist die Zelllänge in etwa der gleichen Größenordnung wie die Diffusionslänge von MinD, so bindet MinD vornehmlich am gegenüberliegenden Zellpol, siehe Abbildung 15A. Mit einer zeitlichen Verzögerung folgt auch MinE der Verteilung von MinD und bindet am gegenüberliegenden Zellpol, wodurch sich eine laufende Welle bildet, deren Ausbreitungsrichtung der Ausbreitungsrichtung der ursprünglichen Welle entspricht.

In Zellen deren Länge kürzer als die Diffusionslänge von MinD ist, bindet MinD in einem Bereich der sich vom gegenüberliegenden Zellpol bis hin zur Zellmitte erstreckt. Das Maximum der Verteilung liegt in unmittelbarer Umgebung des Zellzentrums. Grund hierfür ist das

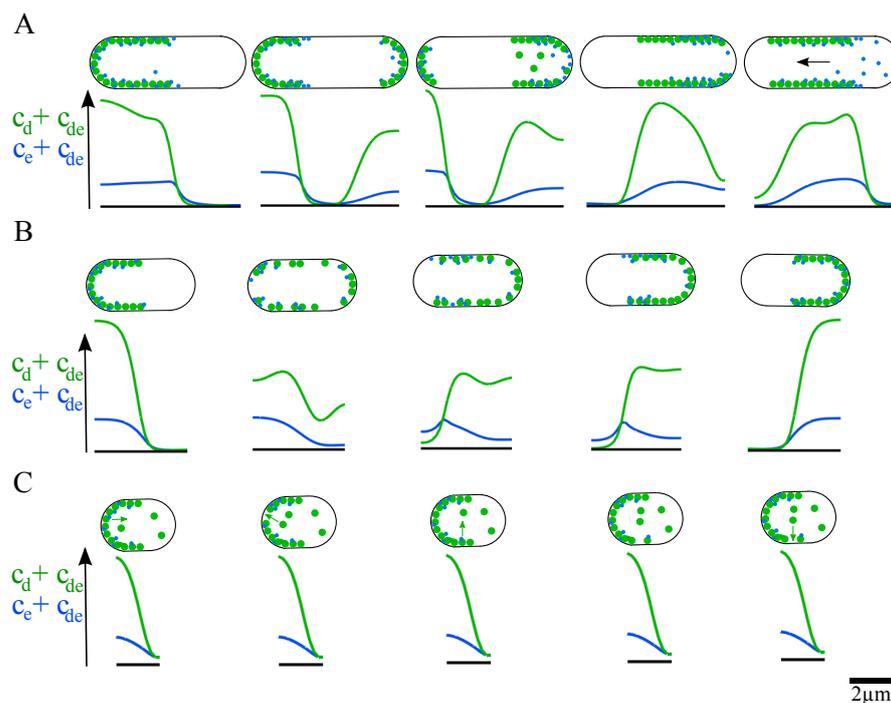


Abbildung 15: **Momentaufnahmen der Verteilungen von membrangebundenem MinD und MinE in einem eindimensionalen System und entsprechende Illustrationen.** A) Sind Zelllänge und Diffusionslänge von MinD in etwa gleich lang, so bildet sich ein Dichtemaximum von membrangebundenem MinD am gegenüberliegenden Polende. Das Gleiche gilt für membrangebundenes MinE. Dies führt zu einer laufenden Welle, die am rechten Pol beginnend zum linken Pol läuft. B) Ist die Diffusionslänge größer als die Zelllänge, so bildet sich ein Dichtemaximum von MinD in der Nähe des linken Pols, was zur Absorption von MinE in Umgebung dieses Pols führt. Es entsteht eine laufende Welle die in der Mitte beginnend zum rechten Pol läuft, was eine Pol-Pol Oszillation zur Folge hat. C) Ist die Zelle wesentlich kleiner als die Diffusionslänge von MinD, so bindet MinD hauptsächlich am Pol hoher MinD Konzentration, was eine stationäre Verteilung schafft.

angestiegene Verhältnis der Diffusionslänge zur Länge der Zelle. Da die Affinität des Bindens von MinE an membrangebundenes MinD hoch ist, bindet MinE vornehmlich in der Nähe des Maximums der MinD-Verteilung, was zu einer laufenden Welle führt die sich genau in entgegengesetzte Richtung der ursprünglichen Welle bewegt. Dies hat eine Pol-Pol Oszillation zur Folge, siehe Abbildung 15B. Ist die Länge der Zelle bedeutend kürzer als die Diffusionslänge von MinD, so ist die Verteilung von zytosolischem MinD und MinE nahezu homogen. In diesen Zellen bindet sowohl MinD als auch MinE hauptsächlich im Gebiet maximaler Konzentration von membrangebundenem MinD, was zu einer stationären Dichteverteilung führt, siehe Abbildung 15C.



## MUSTERBILDUNG VON MIN-PROTEINEN IN OFFENEN GEOMETRIEN

---

Ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Musterbildung der Min-Proteine, lieferte das Studium der Min-Protein-Dynamik in offenen Geometrien. *In vitro* Experimente, in denen auf unterstützte Lipid-doppelschichten eine Lösung aus MinD, MinE sowie ATP gegeben wurde, konnten zeigen, dass sich die Proteine auch außerhalb lebender Zellen, auf großen flachen Membranen spontan in laufende Wellen organisieren können [3, 32, 18]. Da für die Bildung dieser Wellen keine weiteren externen Einflüsse notwendig sind, liefern diese Untersuchungen einen Beweis für den selbstorganisatorischen Charakter der Min-Proteine. Der Ursprung der Musterbildung liegt damit alleine in der intermolekularen Wechselwirkung der Proteine sowie ihrer räumlichen Verteilung via Diffusion. Daraus folgt jedoch, dass die fundamentalen Eigenschaften der Muster unabhängig von der Geometrie des Raumes sind, in dem sie gebildet werden. Lediglich die spezifische Form der Muster wird durch die Geometrie des Raumes bestimmt [22, 61, 62, 63].

Dies legitimiert uns die Musterbildung der Min-Proteine in spezifischen *in vivo* Situation mit Hilfe des *in vitro* Systems zu untersuchen. Dazu zählen beispielsweise die Musterbildung der Proteine in Umgebung von Hindernissen oder auf Membranen die gekrümmt sind. Dazu verwenden wir in den Experimenten unterstützte Lipid-doppelschichten verschiedener Formen und Größen, auf die eine Lösung mit fluoreszenzmarkiertem MinD und MinE sowie ATP gegeben wird. Mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie werden die sich bildenden raumzeitlichen Muster sichtbar gemacht. Diese Experimente wurden von Jakob Schweizer und Martin Loose in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Petra Schwille durchgeführt.

In der theoretischen Analyse werden die deterministischen Gleichungen (8)-(12) in offenen dreidimensionalen Geometrien gelöst und mit den entsprechenden experimentellen Ergebnissen in den *in vitro* Systemen verglichen. Die genaue Form der Geometrie wie auch die verwendeten Randbedingungen sind in den jeweiligen Teilabschnitten beschrieben. In allen dreidimensionalen Simulationen dieses Kapitels wird ausschließlich ein Satz von Parametern verwendet, welcher in Tabelle 1 zu sehen ist. Der Unterschied zwischen *in vivo* und *in vitro* Parametersätzen lässt sich durch die unterschiedlichen Umge-

bungsbedingungen begründen, wie beispielsweise dem Vorhandensein weitere Makromoleküle in *E. coli* oder unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen der Membranen.

Im nun folgenden Kapitel wird die Musterbildung der Min-Proteine *in vitro* untersucht. Dies erfolgt durch das Zusammenspiel von experimentellen und theoretischen Methoden. Im ersten Teil dieses Kapitels wird die Musterbildung auf unterstützten Lipiddoppelschichten untersucht, deren Ausdehnung größer als die Periodizität der Wellen ist. Dies tun wir um zu überprüfen, ob die dynamischen Gleichungen in der Lage sind, die bis dato bekannten experimentellen Eigenschaften der *in vitro* Wellen zu reproduzieren. Im zweiten Teil untersuchen wir die Musterbildung in bestimmten *in vivo* Szenarien mit Hilfe des *in vitro* Systems. Um dies zu tun, verwenden wir unterstützte Lipiddoppelschichten, deren Ausdehnung in der Größenordnung der Periodizität der Wellen liegt. Im dritten Teil wird die Musterbildung der Min-Proteine auf Membranen mit Oberflächenstruktur untersucht.

### 5.1 MUSTERBILDUNG AUF FLACHEN, AUSGEDEHNTEN MEMBRANEN

In Abbildung 16 sind die numerischen Ergebnisse der dynamischen Gleichungen (8)-(12) auf einer quadratischen Membran mit periodischen Randbedingungen zu sehen. Abbildung 16A illustriert das dreidimensionalen Simulationsvolumen. Im Volumen selbst werden die dynamischen Gleichungen (8) und (9) der zytosolischen Dichten  $c_D$  und  $c_E$  gelöst. An den Randflächen der Geometrie wenden wir für die Diffusionsströme periodische Randbedingungen an. An der Decke gelten No-Flux-Randbedingungen. Im blau markierten Quadrat, welches die Membran darstellt, werden die dynamischen Gleichungen (10), (11) und (12) der Dichten  $c_d$ ,  $c_{de}$  und  $c_e$  der membrangebundenen Proteine gelöst. An den Rändern gelten für die Diffusionsströme ebenfalls periodische Randbedingungen. Die Kopplung zwischen den Membrandichten und den Proteindichten in der Lösung erfolgt durch die Diffusionsströme (13) und (14).

Den experimentellen Ergebnissen entsprechend, organisieren sich die Proteine MinD und MinE in laufenden Wellen, siehe Abbildung 16B. Vergleicht man die Wellenprofile von MinD und MinE in Experiment und Theorie, siehe Abbildung 4B und Abbildung 16C, so zeigen sie die gleichen charakteristischen Merkmale. Das MinD-Profil wächst von der Wellenfront beginnend an, sättigt und fällt daraufhin steil ab. Die Dichte von MinE nimmt indes langsamer zu, zeigt an der Hinterkante der Welle einen leichten Anstieg und fällt daraufhin stark ab. Die experimentellen Daten hinge-

gen zeigen einen steilen Anstieg der Fluoreszenzintensität von MinE am Heck der Welle, bevor die Intensität schlagartig abfällt. Dieser Peak wird als MinE-Ring bezeichnet. Grund für dieses Charakteristikum könnten MinE Moleküle sein, die bei hohen Dichten, Komplexe bilden und damit ihre Membranbindung stabilisieren. Andererseits könnte es auch die Interaktion der Fluoreszenzmoleküle von MinE sein, welche diesen Peak verursachen. Wie im unteren Teil von Abbildung 16D zu sehen ist, sind die zytosolischen Dichten  $c_D$  und  $c_E$  nur unmittelbar oberhalb der Membran inhomogen. Die Höhe ab der keine merkliche Inhomogenität mehr gesehen werden kann, liegt bei etwa  $9\mu m$ . Im Experiment liegt diese Grenzhöhe bei etwa  $5\mu m$  [34].

Abbildung 17B zeigt die räumlich aufgelösten mittleren Residenzzeiten  $\langle \tau_D \rangle$  und  $\langle \tau_E \rangle$  von MinD und MinE auf der Membran, sowie deren Verhältnis  $\langle \tau_E \rangle / \langle \tau_D \rangle$ . Die dichteabhängigen Residenzzeiten sind durch die Gleichungen

$$\langle \tau_D \rangle = (\omega_E c_E + \omega_{ed} c_e)^{-1} + (\omega_{de,c} + \omega_{de,m})^{-1} \quad (15)$$

$$\langle \tau_E \rangle = \frac{2(\omega_{de,m} + \omega_{ed} c_d + \omega_e)}{\omega_{de,c} \omega_{ed} c_d + (\omega_{de,c} + \omega_{de,m}) \omega_e}. \quad (16)$$

gegeben, siehe Abschnitt A.2. Abbildung 17A zeigt das für die räumliche Auflösung der Residenzzeiten verwendete *in vitro* Wellenprofil. Wie in Abbildung 17B zu sehen ist, ist die Residenzzeit von MinE innerhalb der Welle nahezu konstant, wogegen die Residenzzeit von MinD zum Heck der Welle stark abnimmt. Diese Abnahme ist durch die ansteigende Konzentration von MinE zu erklären und der damit verbundenen erhöhten Ablösedynamik von MinD. In den Experimenten hingegen ist trotz hoher MinE Konzentration, die Residenzzeit von MinD am Heck der Welle am höchsten, siehe Abbildung 4C. Eine mögliche Erklärung könnten intermolekulare Wechselwirkungen zwischen membrangebundenen MinD Molekülen sein, welche die Membraninteraktion stabilisieren und damit deren Lebenszeit verlängern.

## 5.2 MUSTERBILDUNG AUF FLACHEN, MIKROSTRUKTURIERTEN MEMBRANEN

Um nun die charakteristischen Eigenschaften der raumzeitlichen Muster der Min-Proteine näher zu analysieren, nutzen wir in den experimentellen Untersuchungen Membranen, deren Dimensionen mit der typischen Längenskala der *in-vitro* Muster übereinstimmt. Um diese Membranen experimentell zu realisieren, verwenden wir mikrostrukturierte Goldschichten auf Glas, wie sie in Abbildung 18A schematisch dargestellt sind [64]. Da sich Membranen nur an den Orten bil-

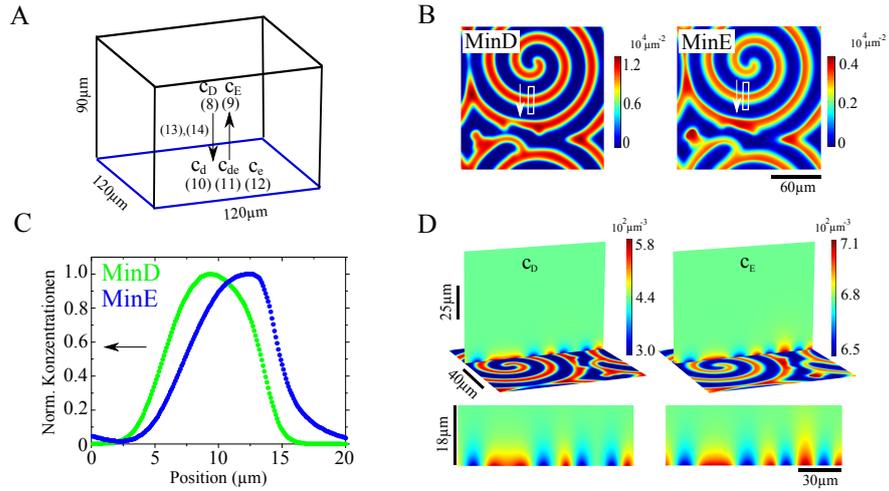


Abbildung 16: **Numerische Lösung der deterministischen dynamischen Gleichungen in der *in vitro* Geometrie.** A) Geometrie in der die dynamischen Gleichungen gelöst werden. B) Dichteverteilung von membrangebundenem MinD und MinE unter Verwendung von periodischen Randbedingungen. C) Dichteprofil von MinD und MinE, aufgenommen entlang der Längsrichtung des weißen Rechtecks in B). D) z-Abhängigkeit der zytosolischen Dichten von MinD und MinE. Oberer Teil: Pufferkonzentrationen entlang eines Schnittes durch das System. Unterer Teil: Nahaufnahme der Pufferkonzentrationen in diesem Schnitt unmittelbar oberhalb der Membran. Periodische Randbedingungen wurden in x- und y-Richtung angewandt, während No-Flux-Randbedingungen für den Diffusionsstrom in z-Richtung verwendet wurden. Die Gesamtdichten für MinD und MinE sind  $C_D = 4.8 \cdot 10^2 \mu m^{-3}$  und  $C_E = 7.0 \cdot 10^2 \mu m^{-3}$ . Die übrigen verwendeten Parameterwerte sind in Tabelle 1 angegeben.

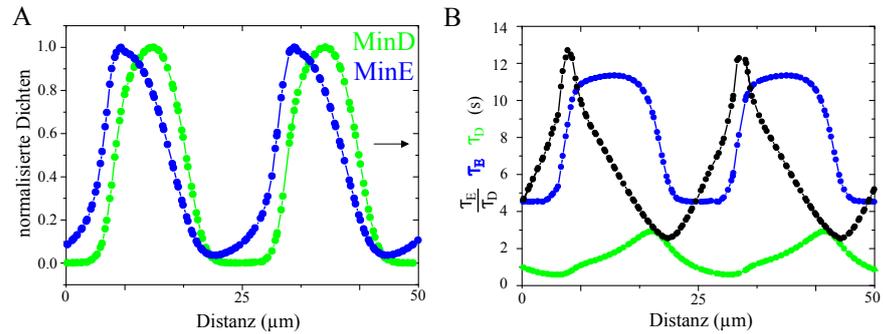


Abbildung 17: **Analyse der Verweildauer der Min-Proteine auf der Membran.** A) Wellenprofile, aufgenommen im langen Arm der L-förmigen Membran aus Abbildung 23A. B) Räumlich aufgelöste Lebenszeiten  $\tau_E$  und  $\tau_D$  von membrangebundenem MinE und MinD und deren Verhältnisses  $\tau_E/\tau_D$  in den Simulationen. Die verwendeten Parameterwerte sind in Tabelle 1 dargestellt.

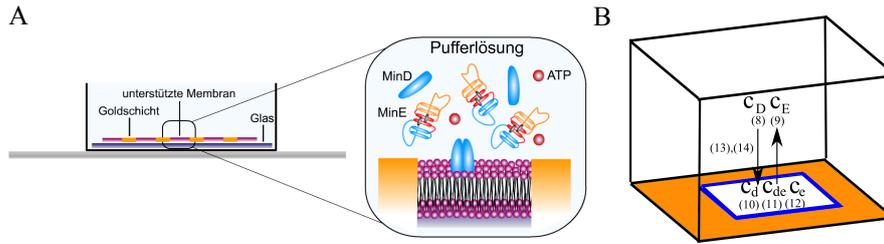


Abbildung 18: **Schematische Darstellung des experimentellen Setups und der Modellgeometrie.** A) Die Lipiddoppelschicht bildet sich ausschließlich an den Orten, die nicht mit Gold bedeckt sind, womit sich Membranen unterschiedlicher Formen und Größen herstellen lassen. In der Pufferlösung in die, die Membran eingetaucht ist, befinden sich  $0.8\mu\text{M}$  MinD,  $0.5\mu\text{M}$  MinE und  $2.5\text{mM}$  ATP. B) Modellgeometrie in welcher die dynamischen Gleichungen gelöst werden. Das blau umrandete Rechteck stellt exemplarisch die Membran dar. An den Rändern der Membran werden für die Oberflächendichten No-Flux-Randbedingungen verwendet. Auf den Goldflächen sind keine Oberflächendichten definiert.

den, die nicht mit Gold bedeckt sind, lassen sich auf diese Weise Membranen verschiedener Größen und Formen realisieren. Wir tauchen sie in Pufferlösungen die  $0.8\mu\text{M}$  MinD,  $0.5\mu\text{M}$  MinE und  $2.5\text{mM}$  ATP enthalten. Dies führt zur Bildung laufender Wellen, deren Ausbreitungsverhalten wir in Abhängigkeit der Membrangeometrie analysieren [34].

Für die theoretischen Untersuchungen lösen wir die dynamischen Gleichungen in einer Geometrie, wie sie schematisch in Abbildung 18B zu sehen ist. Die dynamischen Gleichungen (8) und (9) der zytosolischen Dichten  $c_D$  und  $c_E$  werden im Volumen gelöst und unterliegen periodischen Randbedingungen an den Randflächen der Geometrie. Die dynamischen Gleichungen (10), (11) und (12) der Oberflächendichten  $c_d$ ,  $c_{de}$  und  $c_e$  werden ausschließlich auf dem Gebiet der Membran gelöst. Diese ist in Abbildung 18B blau umrandet. Die Kopplung zwischen Membrandichten und Volumendichten erfolgt im Gebiet der Membran durch die Diffusionsströme (13) und (14). Diese verschwinden an der Deck- und den Goldflächen. Auf der Goldoberfläche, die die Membran umgibt, sind keine Dichten definiert. An der Grenze zwischen Membran und Goldoberfläche (blaue Kanten) verwenden wir für die Oberflächendichten  $c_d$ ,  $c_{de}$  und  $c_e$  No-Flux-Randbedingungen.

### 5.2.1 Musterbildung auf lateral beschränkten Membranen

In der stäbchenförmigen Geometrie des *E.Coli* Bakteriums organisieren sich die Proteine MinD und MinE stets entlang der Längsach-

se der Stäbchengemetrie. Selbst in Y-förmigen Zellgeometrien bleibt diese Eigenschaft des Min-Systems erhalten, siehe Abbildung 14. Andererseits ist aufgrund der Robustheit der Min-Oszillation in lebenden Zellen davon auszugehen, dass Hindernisse auf der Membran, etwa durch Makromoleküle, nur einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Selbstorganisation haben. Um zu prüfen, ob diese Eigenschaften auch auf flachen Membranen erhalten bleiben und somit intrinsische Eigenschaften der Selbstorganisation der Min-Proteine sind, analysieren wir die Musterbildung der Min-Proteine auf Membranen verschiedener lateraler Ausdehnungen als auch auf Membranen mit künstlichen Hindernissen.

Als erstes untersuchen wir, ob das Verkleinern der lateralen Membranausdehnung und somit die Schaffung einer klaren Längsrichtung, eine Auswirkung auf die Musterbildung hat, siehe Abbildung 19. Auf großen rechteckigen Membranen deren laterale Ausdehnung wesentlich größer als die charakteristische Länge der laufenden Wellen ist, bilden sich sowohl im Experiment als auch in den Simulationen Spiraldefekte an den Rändern, von denen sich Wellen in unterschiedliche Richtungen ausbreiten. Liegt hingegen die Breite der Membran in der Größenordnung der Wellenlängen, so werden die Wellen von den Seitenrändern geführt und breiten sich entlang des längsten Weges aus, siehe Abbildung 19A, B. Abbildung 19C zeigt die Verteilung der zytosolischen Dichten  $c_D$  und  $c_E$  in der Modellgeometrie. Äquivalent zu Abbildung 16D, sind auch hier die zytosolischen Dichten nur in unmittelbarer Nähe zur Membran, inhomogen.

Als nächstes untersuchen wir die Musterbildung der Min-Proteine auf Membranen mit Hindernissen. Die Hindernisse sind quadratischen Goldflächen unterschiedlicher Ausdehnung die schachbrettartig in die Membranen eingebettet sind, siehe Abbildung 20. Ist die Ausdehnung des Hindernisses im Vergleich zur Wellenlänge klein, so bilden sich kohärente Wellenmuster, siehe Abbildung 20A, deren Ausbreitung von den inerten Goldflächen nahezu unbeeinflusst bleibt. Liegt die Dimension eines Hindernisses in der Größenordnung der Wellenlänge, so findet teilweise eine Synchronisation von Wellenmuster benachbarter Membranen statt, siehe Abbildung 20B, das kohärente Wellenbild geht jedoch verloren. Für sehr große Hindernisse, bilden sich überwiegend Spiraldefekte an den Eckpunkten und Rändern der Membranen und Wellen breiten sich unabhängig voneinander in verschiedene Richtungen aus, siehe Abbildung 20C.

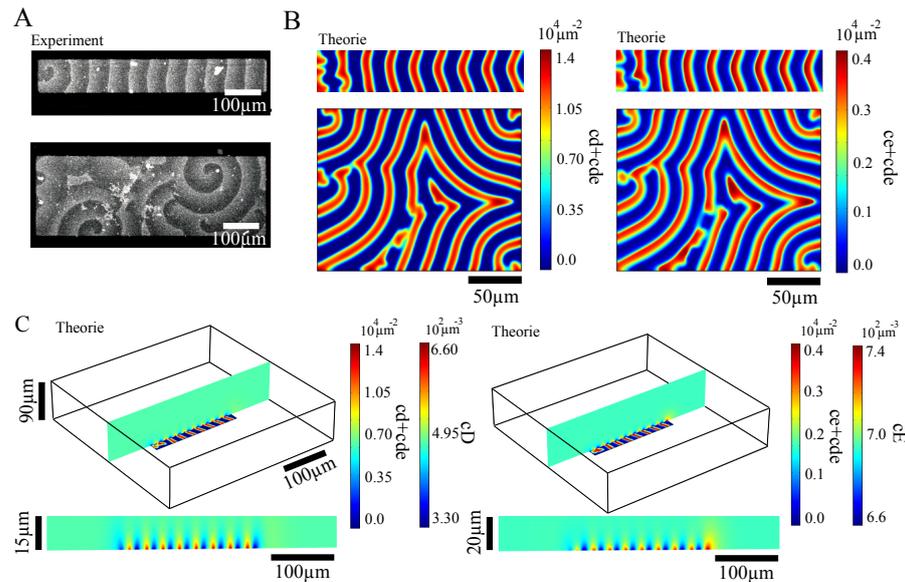


Abbildung 19: **Einfluss der lateralen Membrangrenzen auf die Wellenpropagation.** A) Konfokale Mikroskopie von Min-Protein-Wellen auf Membranen unterschiedlicher Breite. B) Entsprechende Resultate aus der Simulation. Für große Membranen mit einer beidseitigen Ausdehnung von mehrerer Wellenlängen, breiten sich die Wellen in unterschiedlichen Richtungen aus. Auf Membranen mit einer seitlichen Ausdehnung in der Größenordnung der Wellenlänge, breiten sich die Wellen entlang der Längsrichtung der Membran aus. C) z-Abhängigkeit der zytosolischen Dichten von MinD und MinE. Oberer Teil: Pufferkonzentrationen entlang eines Schnittes durch das Gesamtsystem. Unterer Teil: Nahaufnahme der Pufferkonzentrationen in diesem Schnitt unmittelbar oberhalb der Membran.

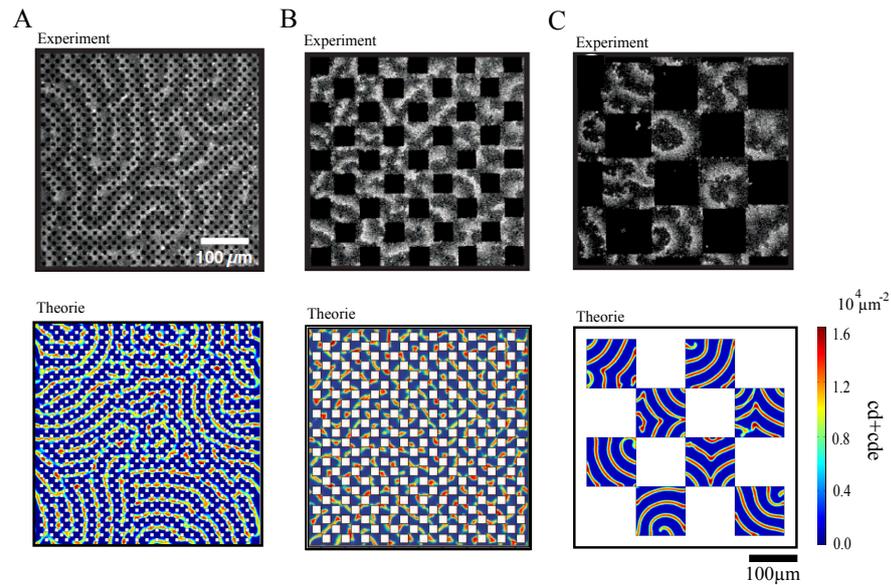


Abbildung 20: **Min-Protein-Wellen auf Membranen mit Hindernissen.** A) Auf Membranen mit kleinen Hindernissen im Vergleich zur Wellenlänge, bilden sich kohärente Wellenmuster, deren Ausbreitung von den Hindernissen nahezu unbeeinflusst bleibt. Mit wachsender Hindernisgröße ((B) und (C)) verlieren die Wellenmuster ihre kohärente Struktur und breiten sich unabhängig voneinander aus. Um Rechenzeit zu sparen, wurden die theoretischen Ergebnisse dieser Abbildung mit Hilfe der effektiven zweidimensionalen Beschreibung aus Abschnitt A.3 generiert.

### 5.2.2 Sensitivität der Wellenausbreitung auf rechteckigen Membranen unterschiedlicher Seitenverhältnisse

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben wurde, haben Min-Protein-Wellen unter lateraler Beschränkung, eine starke Affinität sich in Richtung des längsten Weges auszubreiten. Um nun ihre Sensitivität zu untersuchen mit der sie sich entlang dieses Weges orientieren, untersuchen wir ihre Ausbreitungsrichtung auf rechteckigen Membranen mit unterschiedlichen Seitenverhältnissen. Die Flächen der Membranen bleiben unter Variation des Seitenverhältnisses konstant. Im Experiment beträgt sie  $2500\mu\text{m}^2$  und in den Simulationen  $3600\mu\text{m}^2$ . Sowohl in den Experimenten als auch in den Simulationen bilden sich Wellen, deren Ausbreitungsrichtung sich in Abhängigkeit des Seitenverhältnisses ändert, siehe Abbildung 21A. Um dies näher zu untersuchen, sind in Abbildung 21B der Ausbreitungswinkel  $\alpha$  und der Diagonalenwinkel  $\beta$  als Funktion des Seitenverhältnisses dargestellt. Auf langen Membranen, deren Seitenverhältnisse kleiner als 0.3 sind, propagieren die Wellen stets in Richtung der Längsachse. Dies liegt darin begründet, dass die seitliche Ausdehnung der Membran kleiner wie die Wellenlänge ist. Der Ausbreitungswinkel  $\alpha$  ist in diesen Fällen  $0^\circ$ . Auf Membranen mit einem Seitenverhältnis größer

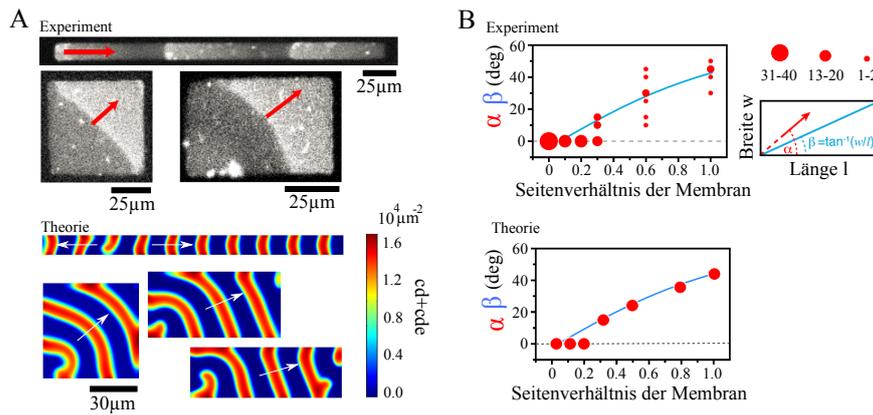
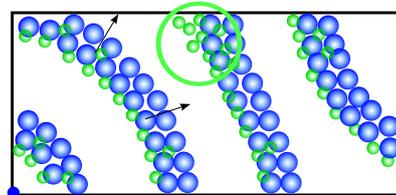


Abbildung 21: **Einfluss der Membrangeometrie auf die Ausbreitungsrichtung der Min-Protein-Wellen.** A) Oberer Teil: Konfokale Mikroskopie von Min-Protein-Wellen auf kleinen Membranrechtecken mit unterschiedlichen Seitenverhältnissen und gleichem Flächeninhalt. Unterer Teil: Entsprechende Ergebnisse aus den Simulationen. B) Ausbreitungswinkel  $\alpha$  der Wellen (rote Punkte) und Diagonalenwinkel  $\beta$  des Rechtecks (blaue Linie) als Funktion des Seitenverhältnisses der Membran. Je höher die Anzahl des gemessenen Winkels, desto größer der Durchmesser der roten Punkte. Sowohl im Experiment als auch in der Simulation, nimmt mit wachsendem Seitenverhältnis, der Ausbreitungswinkel  $\alpha$  der Wellen entsprechend dem Diagonalwinkel  $\beta$  zu.

als 0.3, liegt die seitliche Ausdehnung der Membran in der Größenordnung der Wellenlänge bzw. sie ist entsprechend größer. In diesen Fällen neigen die Wellen dazu, sich entlang der Diagonalen auszubreiten, womit sie sich in Richtung des längsten Weges orientieren. Der Ausbreitungswinkel  $\alpha$  entspricht in dieser Phase dem Diagonalenwinkel  $\beta$ . Zwei Eigenschaften der Wellen führen zu deren Ausrichtung entlang der Diagonalen.



Einerseits entstehen die Wellen sowohl in den Experimenten als auch in den Simulationen, stets in einem der Eckpunkte der Membran und breiten sich von dort in Form eines Ringsegmentes aus. Damit sind die Wellen in der Lage die gesamte Membrangeometrie zu erfassen. Andererseits treffen die Anteile der Welle, die sich nicht in Richtung der Diagonalen ausbreiten, auf den Rand der Membran. Dabei kommt es zu einer Akku-

Abbildung 22: **Ausrichtung der Wellen auf einer kleinen rechteckigen Membran.** Die Wellen breiten sich von einer Ecke (blauer Punkt) der Geometrie beginnend, in Form eines Ringsegmentes auf der Membran aus. Der Anteil der Welle, der sich nicht in Richtung der Diagonalen ausbreitet, trifft auf die Grenzfläche zwischen Membran und inerter Goldschicht. Dies führt zu einer Anhäufung von membrangebundenem MinE in dieser Region (grüner Kreis) und damit zu einer Neuausrichtung der Welle in diesem Gebiet.

mulation von membrangebundenem MinE (grüner Kreis) was dazu führt, dass das MinE/MinD Verhältnis in diesem Bereich des Wellenbandes zunimmt. Die Zunahme führt zu einer Erhöhung der Geschwindigkeit des Wellenbandes in dieser Region und somit zu einer Ausrichtung des Wellenbandes in Richtung der Diagonalen, siehe Abbildung 22. Die hohe Sensitivität der Min-Wellen, sich entlang des längsten Weges zu orientieren, spielt beispielsweise bei der Längsachsenfindung in kurzen Zellen unmittelbar nach der Zellteilung eine wichtige Rolle.

### 5.2.3 Musterbildung auf kurvigen Membranen

Um in einem zweiten Schritt zu untersuchen, wie sich Min-Protein-Wellen auf kurvigen Membranen organisieren, nutzen wir zu Beginn eine Membran, die die Form des Buchstabens L hat. Um dem längsten Weg zu folgen, drehen die Wellen in der Knickregion ihre Ausrichtung um  $90^\circ$  und sind damit in der Lage dem weiteren Verlauf der Membran zu folgen, siehe Abbildung 23A. Sowohl im Experiment als auch in den Simulationen erfolgt eine Verformung des Wellenbandes in der Knickregion als Folge der unterschiedlich langen Wegstrecken, die der innere und äußere Teil des Bandes zurücklegen müssen, um die Knickregion zu passieren. Infolgedessen verformt sich das Wellenband, wodurch der äußere Teil des Bandes, dem inneren Teil hinterherläuft. In Abbil-

dung 23C ist hierzu die Breite des Wellenbandes als Funktion der Position des Bandes dargestellt. Sowohl in den Experimenten als auch in den Simulationen nimmt sie schlagartig in der Region des Knicks zu und danach im Prozess der Neuausrichtung wieder ab. Die Neuausrichtung erfolgt durch Zunahme der Geschwindigkeit des äußeren Anteils des Wellenbandes, nachdem die Welle die Knickregion passiert hat, siehe

Abbildung 23D. Während die Geschwindigkeit des Wellenbandes im

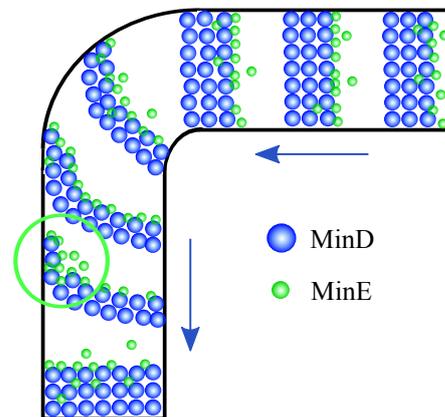


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Verteilung von MinD und MinE auf einer L-förmigen Membran. Die Verformung des Wellenbandes aufgrund der Richtungsänderung, führt zu einer Akkumulation von MinE am äußeren Rand des Wellenbandes (grüner Kreis), welche die Geschwindigkeit des Bandes in dieser Region erhöht. Die blauen Pfeile geben die Laufrichtung der Wellen an.

Abbildung 23D. Während die Geschwindigkeit des Wellenbandes im

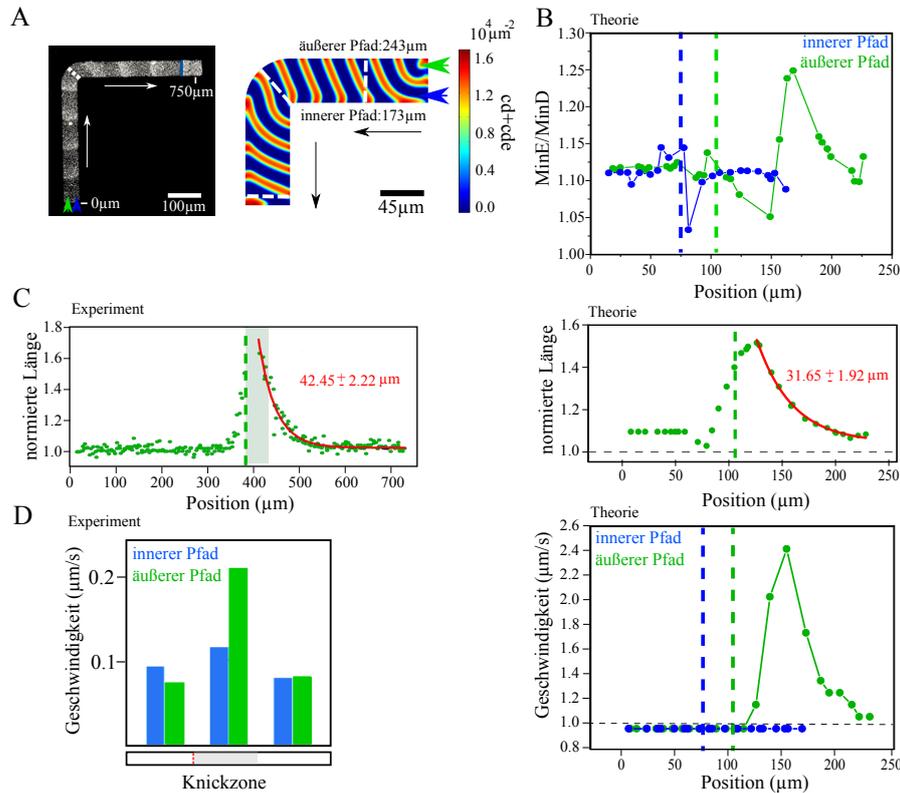


Abbildung 23: **Min-Protein-Wellen auf einer Membran, die die Form des Buchstabens L hat.** A) Experimentelle und theoretische Ergebnisse der Wellenausbreitung auf einer ebenen gekrümmten Membran. Die Wellen drehen sich in der Umgebung der Knickstelle um  $90^\circ$ , um der Membran zu folgen. Die Pfeile geben die Ausbreitungsrichtung der Wellen an. B)  $\text{MinE}/\text{MinD}$  Verhältnis als Funktion der Strecken welche in A) markiert sind. C) Relative Änderung der Wellenbreite als Funktion der Wegstrecke. Der exponentielle Fit (rote Kurve) gibt die charakteristische Wegstrecke an, die die Wellfront zur Neuausrichtung benötigt. D) Wellengeschwindigkeit in Abhängigkeit der Strecken, welche in A) eingezeichnet sind. Die experimentellen Daten entstammen der Referenz [63].

inneren Pfad nahezu konstant bleibt, verdoppelt sie sich auf dem äußeren Pfad und fällt danach auf die Ausgangsgeschwindigkeit zurück. Der Grund für die Zunahme der Geschwindigkeit ist in Abbildung 24 schematisch dargestellt. Durch die Verformung des Wellenbandes trifft der äußere Teil des Bandes nach dem Passieren der Knickstelle auf die Grenzfläche zwischen Membran und Goldschicht. Dies führt lokal zu einer Erhöhung des MinE/MinD Verhältnisses (grüner Kreis), wodurch sich die Ablösedynamik von MinD am Heck der Welle erhöht. Dadurch nimmt die Geschwindigkeit des äußeren Teil des Wellenbandes nach dem Passieren der Knickstelle kurzzeitig zu. Die charakteristischen Längen der Neuausrichtung sind im Experiment  $42.45\mu\text{m}$  und in der Simulation  $31.65\mu\text{m}$  und liegen somit in der Größenordnung einer Wellenlänge. Dies zeigt deutlich die sehr flexible Anpassungsfähigkeit der Min-Protein-Muster bei Variation der räumlichen Gegebenheiten.

Als nächstes untersuchen wir die Musterbildung der Min-Proteine auf Membranen, die die Form eines Ringes und einer Serpentine haben, siehe Abbildung 25. In der Ringgeometrie bilden sich sowohl im Experiment als auch in den Rechnungen, laufende Wellen die in unterschiedlichen Richtungen die Geometrie durchlaufen und sich beim Zusammenstoßen auslöschen. Im Fall der Serpentine passen die laufenden Wellen flexibel ihre Laufrichtung dem gekrümmten Membranverlauf an und folgen wie im Fall der L-förmigen Membran, dem längsten Weg. Sowohl in den experimentellen als auch in den theoretischen Ergebnissen ist deutlich zu sehen, dass die laufenden Min-Protein-Wellen in der Lage sind, ihre Richtung entsprechend der Membrangegebenheiten sehr flexibel anzupassen. Dies ist eine Eigenschaft die dem Min-System erlaubt auch komplexe Geometrien, beispielsweise in Form von verbogenen Bakterien, zu erfassen.

#### 5.2.4 *Kopplung der Min-Protein Muster zwischen isolierten benachbarten Membranen*

In diesem Abschnitt untersuchen wir, ob eine Kopplung von Min-Protein-Wellen zwischen benachbarten, voneinander isolierten Membranen möglich ist. Die Motivation für diese Untersuchung liefert jene Phase der Zellteilung, in der das Gesamtvolumen der Mutterzelle durch den sich in der Mitte schließenden Z-Rings in die zwei Teilvolumina der Tochterzellen separiert wird. Da die beiden Teilvolumen bis zum Abschluss des Teilungsprozesses durch ein gemeinsames Zytoplasma verbunden bleiben, können Proteinen zwischen diesen diffundieren und ausgetauscht werden. In lebenden *E.Coli* Zellen ermöglicht dieser Austausch eine Veränderung der klassischen Pol-

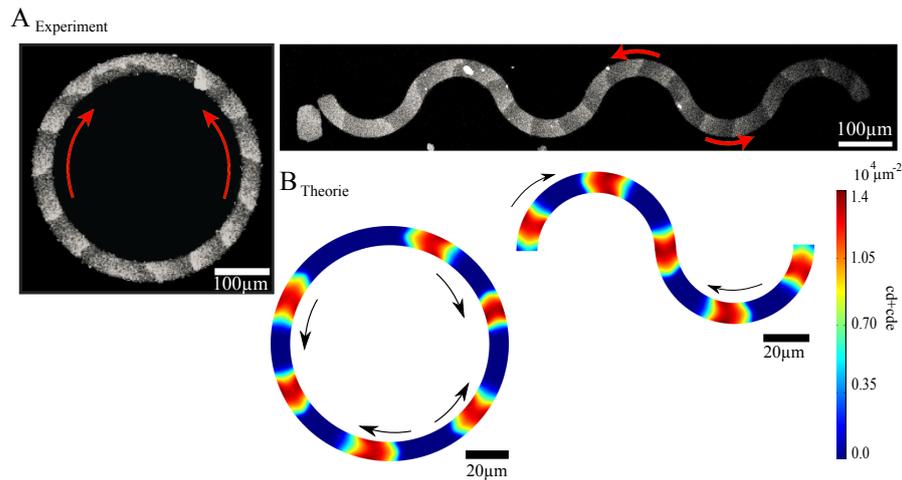


Abbildung 25: **Min-Protein-Wellen auf Membranen, die die Formen einer Serpentine und eines Rings haben.** Sowohl in den Experimenten (A) als auch in den Simulationen (B) folgen die Wellen dem Pfad der Membran. Die experimentellen Daten entstammen der Referenz [63].

Pol-Oszillation hin zu einer Oszillation, in der die Proteine zwischen den beiden Polen und dem Z-Ring oszillieren. Es bilden sich zwei unabhängige Oszillationen. Die intrinsische Wellenlänge der Oszillation bleibt hingegen unverändert. Um nun die zytosolische Kopplung nachzuahmen, verwenden wir im Experiment als auch in den Simulationen quadratische Membraninseln, deren Seitenlänge in der Größenordnung der charakteristischen Wellenlänge liegt und die durch unterschiedlich breite Lücken voneinander getrennt sind, siehe Abbildung 26A und Abbildung 26B.

Im ersten Schritt untersuchen wir den Einfluss des Abstandes zwischen den Membraninseln auf die Kopplung der Muster. Für kleine Abstände zwischen den Membranen kann sowohl in den Experimenten als auch in den Simulationen ein synchronisiertes Verhalten der Wellen beobachtet werden. Treffen die Wellen auf die Kante der Membran, lösen sich die Proteine von der Membran ab, gehen in Lösung und binden an die benachbarte Membran, so dass die laufende Welle die Lücke überstreicht und in ihrer ursprünglichen Richtung weiterläuft, siehe Abbildung 27. Übersteigt hingegen der Abstand zwischen zwei benachbarten Membranen eine kritische Länge, findet keine sichtbare Kopplung statt. Die kritische Länge liegt im Experiment bei etwa  $10 \mu\text{m}$  [63] und in den Simulationen bei etwa  $3 \mu\text{m}$ .

Da beim Einschnüren des Z-Rings, der zytosolische Austausch der Proteine zwischen den beiden Zellhälften reduziert wird, untersuchen wir in einem zweiten Schritt, den Einfluss einer reduzierten zytosolischen Diffusion auf die Kopplung der Muster zwischen zwei Membraninseln. Dazu reduzieren wir die Beweglichkeit der Proteine in der Pufferlösung durch Zugabe der Zuckerverbindung Ficoll.

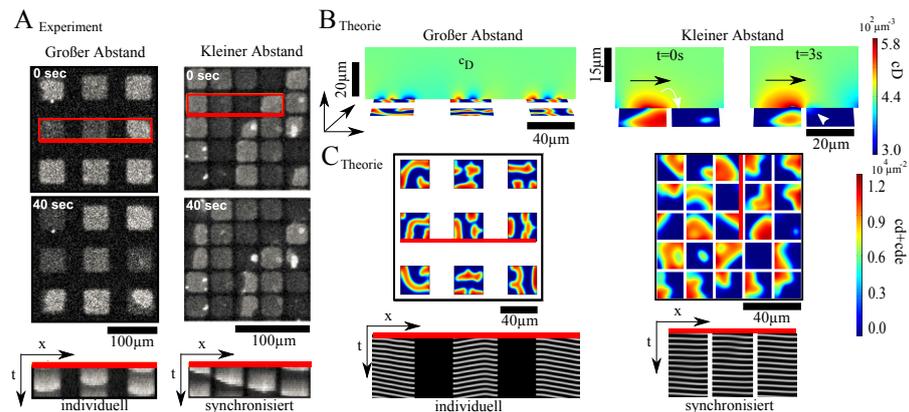


Abbildung 26: **Kopplung von Min-Protein-Wellen zwischen isolierten benachbarten Membraninseln.** A) Experimentelle Ergebnisse für große und kleine Abstände zwischen benachbarten Membranen. Oben: Verteilung von membrangebundenem MinE zu verschiedenen Zeitpunkten und für unterschiedliche Membranabstände. Die Kymographen zeigen die jeweilige Fluoreszenzintensität entlang der breiten Linie des roten Rechtecks als Funktion der Zeit. B) Zytoplasmische Verteilung von MinD unmittelbar oberhalb der Membranen. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Laufrichtung der Welle, die weißen Pfeile, das Bindevverhalten von MinD. C) Verteilung von membrangebundenem MinD. Die Kymographen zeigen die zeitliche Entwicklung von membrangebundenem MinD entlang der roten Linien. Die experimentellen Daten entstammen der Referenz [63].

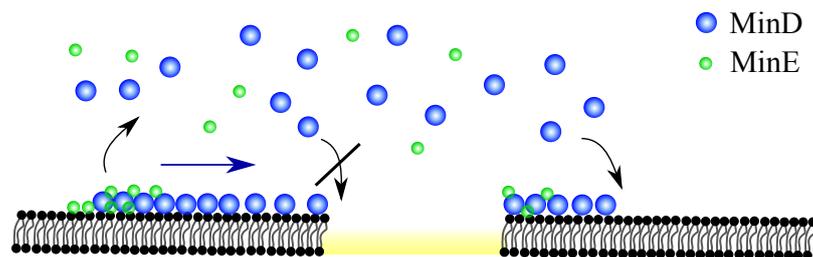


Abbildung 27: **Schematische Darstellung des Proteinaustauschs zwischen zwei dicht benachbarten Membranen.** Trifft eine Welle auf die Begrenzung zur Goldschicht, kann MinD nicht mehr in der Wellenfront binden. Stattdessen bildet sich eine Akkumulation von zytoplasmischem MinD oberhalb der Lücke. Proteine von dort binden an die benachbarte Membran. Nachdem MinE, MinD von der Membran gelöst hat, löst es sich selbst und bindet ebenfalls an die benachbarte Membran. Die Welle läuft in ihrer ursprünglichen Richtung weiter.

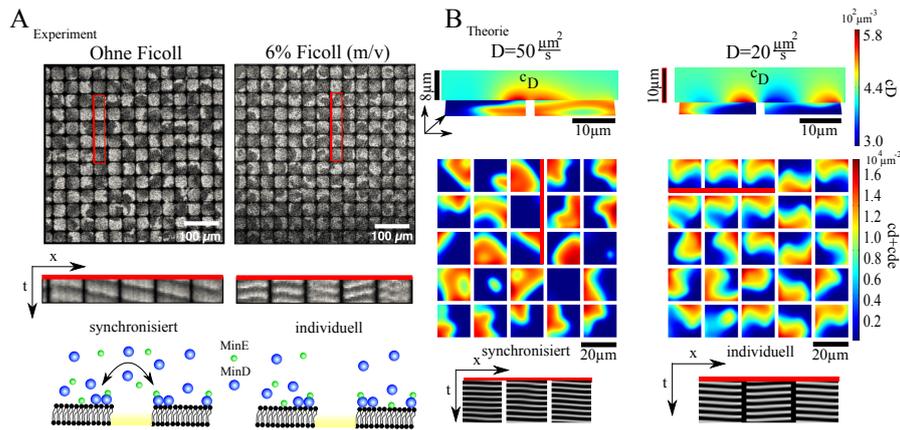


Abbildung 28: **Einfluss einer reduzierten zytosolischen Diffusion auf die Kopplung der Min-Protein-Wellen.** A) Experimentelle Ergebnisse bei Reduktion der Diffusion durch Zugabe von 6% Ficoll. Ohne Ficoll lässt sich eine Kopplung der Wellen zwischen benachbarten Membranen beobachten, die bei Zugabe von Ficoll verschwindet. Oben: Verteilung von membrangebundenem MinE. Mitte: Kymographen von membrangebundenem MinE, aufgenommen entlang der breiteren Linie des roten Rechtecks. Unten: Schematische Darstellung des Einflusses einer reduzierten Diffusion auf die Kopplung. B) Ergebnisse der Simulation bei normaler und reduziertes Diffusionskonstante. Für genügend kleine Diffusionskonstanten ( $D < 20 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) findet keine Kopplung benachbarter Membranen statt. Die Kymographen zeigen die zeitliche Entwicklung von membrangebundenem MinD entlang der roten Linie. Die experimentellen Daten entstammen der Referenz [63].

Die Zugabe von 6% Ficoll verringert die zytosolische Diffusionskonstante von anfänglich  $65 \mu\text{m}^2/\text{s}$  auf etwa  $25 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Dies führt in den Experimenten zu einer Verringerung der charakteristischen Wellenlänge von etwa  $65 \mu\text{m}$  auf circa  $56 \mu\text{m}$ . Da die Wellenlänge maßgeblich durch die Mobilität der wechselwirkenden Proteine beeinflusst wird, ist es bemerkenswert, dass bei einer Abnahme der Diffusionskonstante um circa 60%, die Wellenlänge sich nur um etwa 14% verringert. Die genauen Abhängigkeiten der Diffusionskonstanten und der Wellenlänge von der Ficoll-Konzentration findet sich in den Ergänzungen der Arbeit von Schweizer et. al. [34]. Um nun experimentell zu untersuchen, wie sich eine reduzierte Diffusion der Moleküle in Lösung auf die Kopplung der Muster auswirkt, werden Membranen verwendet, die in geringem Abstand zueinander angeordnet sind. Auf dieser Anordnung ist eine Kopplung der Wellen zwischen benachbarten Membranen beobachtbar, siehe rechte Seite von Abbildung 28A. Nun wird Ficoll zugeführt und gewartet bis sich das System in einem stationären Zustand befindet. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 28A zu sehen. Um dies mit Hilfe der Simulationen zu untersuchen, reduzieren wir die Diffusionskonstanten  $D_D$  und  $D_E$  von  $50 \mu\text{m}^2/\text{s}$  auf  $15 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und vergleichen die entstehenden Muster mit

den ursprünglichen Mustern, Abbildung 28B. Sowohl im Experiment als auch in den Simulationen sehen wir, dass durch Zugabe von Ficoll bzw. für reduzierte Diffusionskonstanten der Proteine in Lösung, keine Kopplung der Wellen zwischen benachbarten Membranen zu beobachten ist. Auf den einzelnen Membranen bilden sich Spiralddefekte und Wellen unterschiedlicher Ausrichtung, die entkoppelt zu sein scheinen.

Dies entspricht dem Verhalten der Min-Proteine in *E.coli* Bakterien während der Schließung des Z-Rings. Zu Beginn des Prozesses findet ein Austausch von zytosolischen Proteinen zwischen den beiden Zellhälften statt. Mit zunehmender Schließung reduziert sich dieser Austausch sukzessiv, wodurch sich zwei voneinander unabhängige Oszillationen bilden.

### 5.3 BEEINFLUSSUNG DER MUSTERBILDUNG DURCH DIE OBERFLÄCHENTOPOLOGIE DER MEMBRAN

In den bisherigen Untersuchungen des *in vitro* Systems wurden ausschließlich flache Membranen verwendet. Die Oberflächentopologie der Membran, kann jedoch die Kinetik von Proteinen beeinflussen. Das Enzym ArfGAP<sub>1</sub> beispielsweise, welches für den Abbau des COPI-Mantels verantwortlich ist, ist auf Liposomen, die die gleiche Größe eines realen Transportvesikels haben (Radius  $R \approx 35nm$ ) bis zu 100 mal aktiver als auf großen Liposomen mit einem Radius von 150nm [65]. So sind etwa junge COPI-Mäntel in Zellen, welche die Membran nur schwach krümmen vor dem Abbau durch ArfGAP<sub>1</sub> geschützt. Ein anderes Enzym wie etwa Dynamin, welches im Prozess der Abspaltung von Vesikeln einen Bund um die mit Clathrin ummantelten Knospe bildet und deren Abspaltung durch eine Reihe von Konformationsänderungen herbeiführt, besitzt sowohl Sensoren für die Detektion der Krümmung als auch die Fähigkeit die Membran aktiv zu verformen [66, 67, 65].

In *E.coli* ist die Membran an den Polen am stärksten gekrümmt. Aus Kapitel 4 wissen wir jedoch, dass es keiner Abhängigkeit der Proteinkinetik von der Morphologie der Membran bedarf, um alle bisher bekannten Min-Protein-Muster in lebenden Zellen zu reproduzieren. In *in vitro* Experimenten, die die Musterbildung der Min-Proteine auf Membranen untersuchen, deren Oberfläche strukturiert ist, konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die Ausbreitungsrichtung der Min-Protein-Wellen durch die Oberflächenstruktur der Membran beeinflusst wird [68]. In den Experimenten wird dazu ein mikrostrukturiertes PDMS-Substrat mit Furchenmuster erzeugt, welches mit einer Membran umkleidet ist und in eine Pufferlösung aus

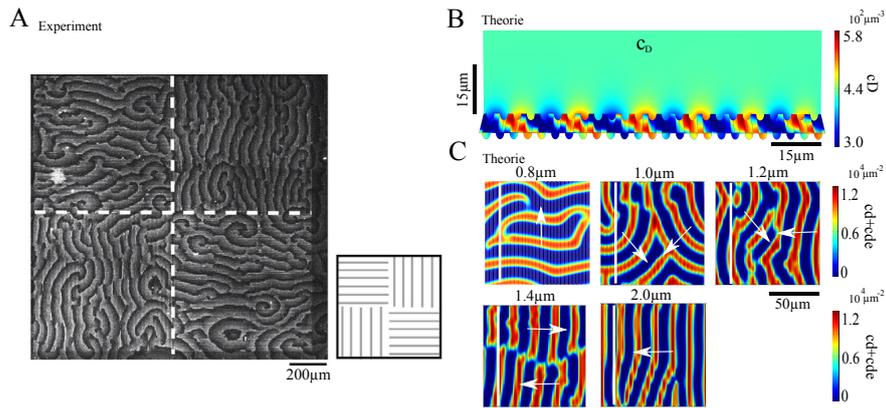


Abbildung 29: **Musterbildung der Min-Protein-Wellen auf Membranen mit Vertiefungen.** A) Muster der Min-Proteine auf Membranen, die sich auf einem PDMS-Substrat mit parallel angeordneten Furchen befinden. Die Orientierung der Furchen ist schematisch dargestellt. Die Wellenfronten neigen dazu sich parallel zu den Furchen zu orientieren und breiten sich senkrecht zu den Furchen aus. Die Abbildung entstammt [68]. B) Nahaufnahme der Pufferkonzentration von MinD in einem Schnitt durch das System. Auf der Membran ist die Verteilung von membrangebundenem MinD zu sehen. Orientierung der Min-Protein Wellen auf Membranen unterschiedlicher Furchentiefen zwischen  $0.8\mu\text{m}$  und  $2\mu\text{m}$ . Die Furchenbreite in allen Rechnungen beträgt  $2.1\mu\text{m}$ .

MinC, MinD, MinE und ATP eingetaucht wird. Die Min-Proteine organisieren sich auf diesen Membranen in laufende Wellen, deren Fronten sich vornehmlich parallel zu den PDMS-Furchen orientieren, siehe Abbildung 29A. Anzumerken ist hier, dass der Abstand zwischen zwei benachbarten Furchen  $5\mu\text{m}$  ist und dies im Vergleich zur Periodizität der Wellenmuster, klein ist [68].

In den Simulationen kann für genügend große Furchentiefen ein qualitativ ähnliches Verhalten der Wellen beobachtet werden. In Abbildung 29C ist hierzu die Verteilung von membrangebundenem MinD für verschiedene Furchentiefen dargestellt. Während sich die Wellen für Furchentiefen kleiner als  $0.8\mu\text{m}$  unbeeinflusst ausbreiten, findet mit zunehmender Tiefe eine Ausrichtung der Wellenfronten parallel zu den Vertiefungen statt. Für Furchentiefen ab  $1.4\mu\text{m}$  breiten sich die Wellen stets senkrecht zu den Furchen aus. Der Grund dafür ist die abnehmende Proteindichte in den Furchen mit wachsender Vertiefung. MinD und MinE binden verstärkt in den Bereichen der Membran, die tiefer in die Pufferlösung ragen, siehe Abbildung 30A. Aufgrund der Kooperativität von MinD führt dies zu einer Abnahme der Dichten in den Vertiefungen, was das Bilden geschlossener Wellenfronten senkrecht zur den Furchen verhindert. Stattdessen kommt es zu einer Akkumulation der Min-Proteine entlang der Membranhöhungen, wodurch sich geschlossene Wellenfronten bilden, die parallel zu den Furchen orientiert sind. Durch die Interaktion mit MinE,

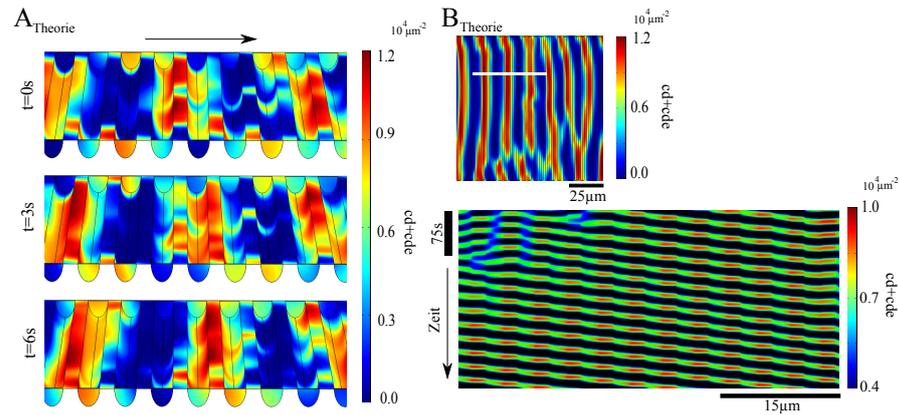


Abbildung 30: **Verteilung von MinD auf Membranen mit parallel angeordneten Vertiefungen.** A) Nahaufnahme der Verteilung von membrangebundenem MinD zu kurz aufeinanderfolgenden Zeiten. Die Konzentrationsmaxima bilden sich vornehmlich auf den Erhebungen der Membran. Der schwarze Pfeil kennzeichnet die Laufrichtung der Welle. B) Oben: Darstellung der Proteinverteilung auf der gesamten Membran. Unten: Kymograph von membrangebundenem MinD, aufgenommen entlang der weißen Linie (oben). Die Konzentrationsmaxima bilden sich vornehmlich auf den Erhebungen der Membran, wodurch die Oberflächentopologie der Membran durch den Farbkode des Kymographen reflektiert wird.

wird MinD von einer Erhebung gelöst und bildet an einer benachbarten Erhebung ein neues Maxima. Dadurch breiten sich die Wellenfronten senkrecht zu den Vertiefungen aus, siehe Abbildung 30B.

In den Simulationen sind weder die Eigenschaften einzelner Proteine noch die Lipidverteilung der Membran von der Oberflächentopologie abhängig. Die theoretischen Ergebnisse zeigen, dass das charakteristische Verhalten der Wellen in Abbildung 29A, alleine in der lokalen Beeinflussung der Musterbildung durch die Oberflächentopologie der Membran liegt.

## ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

---

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden auf Basis experimenteller Daten, theoretische Annahmen über die molekularen Prozesse der bakteriellen Proteine MinD und MinE gemacht. Diese Prozesse wurden sowohl in stochastischen Simulationen implementiert als auch durch einen Satz von partiellen Differentialgleichungen beschrieben und damit die Musterbildung der Proteine *in vivo* und *in vitro* untersucht. Ziel der Arbeit war es eine möglichst einfache theoretische Beschreibung zu finden, die alle bis dato bekannten Min-Protein Muster reproduzieren kann. In unserer theoretischen Beschreibung beschränkten wir uns ausschließlich auf die molekularen Prozesse, für die es starke experimentelle Hinweise gibt. Dies ist zum einen das kooperative Binden von zytosolischem MinD an die Plasmamembran [37, 40, 41, 42] und zum anderen das durch MinE-induzierte Ablösen von membrangebundenen MinD Molekülen [36, 37]. Neu in unserer Beschreibung ist die Fähigkeit von MinE, nach dem Ablösen eines MinD Moleküls kurzzeitig an der Membran zu verweilen, an ein weiteres MinD Molekül zu binden und dieses dann von der Membran zu lösen. Diese Eigenschaft von MinE bezeichnen wir als MinE-Prozessivität. Hinweise dazu liefern Messungen der Residenzzeit einzelner membrangebundener Min-Proteine [32] als auch biochemische Strukturanalysen der Proteine MinE und MinD [33].

### 6.1 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

#### 6.1.1 Die Musterbildung *in vivo*

- Unter Berücksichtigung des transienten Bindens von MinE an die Membran und der damit verbundenen Prozessivität, bilden unsere dynamischen Gleichungen alle Min-Protein-Muster die bis heute in lebenden Zellen gefunden wurden.
- Wir konnten zwei neue Muster der Min-Proteine in lebenden *E.coli* Zellen entdecken, die zuvor nicht bekannt waren. Dies sind zum einen laufende Wellen in genügend langen Zellen bei einem erhöhten Protein-Expressionslevel als auch sich bewegende räumlich begrenzte Anhäufungen von membrangebundenen Min-Proteinen, die sich in dicken Zellen ausbilden und die Zel-

le umkreisen. Beide theoretischen Voraussagen konnten experimentell durch Fluoreszenzmikroskopie verifiziert werden.

- Unsere Beschreibung des Min-Systems ist in der Lage die Struktur des Phasenraums der *in vivo* Musterbildung qualitativ zu reproduzieren. So können wir mit einem Satz an Parametern einerseits die Abfolge der Muster wachsender Zellen reproduzieren, als auch das stochastische Schalten und die laufenden Wellen in Zellen mit erhöhter Proteinkonzentration.
- In Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten zeigt auch diese Arbeit, dass molekulares Rauschen nur einen geringfügigen Einfluss auf die *in vivo* Musterbildung hat. Makroskopische Auswirkungen von molekularem Rauschen zeigen sich nur unter bestimmten Bedingungen. In kurzen Zellen bei einer erhöhten Proteinkonzentration schalten die Proteine stochastisch zwischen den beiden Zellpolen und in dicken Zellen verändert die sich bewegende, räumlich begrenzte Anhäufung von Min-Proteinen stochastisch ihre Bewegungsrichtung.
- Als Folge der sehr einfachen Reaktionsterme, ist unsere theoretische Beschreibung nicht in der Lage alle experimentellen Details zu reproduzieren. Beispielsweise sind die Fluktuationen in den Kymographen von Abbildung 6A und B stärker als in den experimentellen Kymographen in Abbildung 2. Der MinE-Ring ist in unseren Simulationen nicht oder nur minimal ausgeprägt. Grund für dessen Bildung in den experimentellen Systemen, könnte eine kooperative Wechselwirkung zwischen membranengebundenen MinE Molekülen sein. D.h. MinE bevorzugt das Binden in Regionen der Membran, in denen es schon in erhöhter Konzentration vorliegt. Ein weiterer Grund könnte das erschwerte Binden von MinE in Regionen der Membran sein, die durch membrangebundenes MinD besetzt sind. Dies würde dazu führen, dass MinE in einer Pol-Pol Oszillation vor allem in dem Bereich des MinD Clusters bindet der Nahe der Zellmitte liegt, da dort die Proteindichte geringer ist. Die

### 6.1.2 Die Musterbildung *in vitro*

- Sowohl im Experiment als auch in den Simulationen bilden sich auf großen rechteckigen Membranen, deren räumliche Ausdehnung einer Vielzahl der Periodizität der Wellen beträgt, Spiralen von denen sich laufende Wellen chaotisch in alle Richtungen der Membran ausbreiten. Verkleinert man nun eine Seite der Mem-

bran auf die Größenordnung der Wellenlänge, orientieren sich die Wellen stets in Längsrichtung der Membran.

- Sowohl im Experiment als auch in der Theorie besitzen die Wellen eine starke Affinität dazu, sich auf rechteckigen Membranen mit unterschiedlichen Seitenverhältnissen entlang der Diagonalen auszubreiten. Die Ausrichtung der Wellen entlang der Diagonalen demonstriert die hohe Sensitivität des Min-Systems, die Längsachse der jeweiligen Geometrie zu detektieren.
- Auf gekrümmten Membranen, passen die Wellen flexibel ihre Laufrichtung dem kurvigen Membranverlauf an und folgen dem längsten Weg. Alle charakteristischen Merkmale, die Wellen beim Durchlaufen der L-förmigen Membran zeigen, werden durch die Wellen aus den Simulationen qualitativ wiedergegeben.
- Auf Membranen die durch inerte Bereiche voneinander getrennt sind, kann es zu einem Austausch und somit zu einem synchronisierten Verhalten der Proteine benachbarter Membranen kommen. Diese Synchronisation erlaubt es den Wellen sich über die inerten Bereiche hinweg auszubreiten.
- Auf Membranen mit parallel angeordneten Vertiefungen, organisieren sich die Wellenfronten parallel zu den Vertiefungen und breiten sich senkrecht zu ihnen aus [68]. Unsere theoretische Beschreibung kann dieses Verhalten reproduzieren und wir können zeigen, dass die Ausrichtung der Wellen, eine Folge der lokalen Beeinflussung der Musterbildung durch die Oberflächentopologie der Membran ist.
- Die sehr einfache Beschreibung der Dynamik des Min-Systems führt dazu, dass nicht jedes Charakteristikum der *in vitro* Musterbildung reproduziert werden kann. Die Wellenprofile in Abbildung 16 unterscheiden sich von den experimentell bestimmten Profilen in Abbildung 4B. Des Weiteren unterscheiden sich die experimentellen und theoretischen Residenzzeiten von membrangebundenem MinD und MinE in den unterschiedlichen Segmenten der Welle. In der theoretischen Beschreibung nimmt die Residenzzeit von MinD zum Heck der Welle ab. Dies ist durch die ansteigende Konzentration von MinE in Richtung des Hecks zu erklären. In den Experimenten hingegen ist trotz hoher MinE Konzentration die Residenzzeit von MinD am Heck der Welle am höchsten [32]. Eine mögliche Erklärung können intermolekulare Wechselwirkungen zwischen membrangebundenen MinD Molekülen sein, welche die Membraninteraktion sta-

bilisieren. Diese werden in unserer theoretischen Beschreibung nicht berücksichtigt.

## 6.2 AUSBLICK

Vergleicht man die Bildung stehender Wellen *in vivo* in unserem Modell mit dem Modell von Huang et al. [28], so zeigt sich, dass die MinE-Prozessivität durch eine erhöhte Binderate von MinE an membrangebundenes MinD substituiert werden kann. Zusätzlich benötigen Huang et al. eine endliche ATP-ADP Austauschrate des zytosolischen MinD Moleküls um stehende Wellen mit mehreren Knoten zu stabilisieren. Beide theoretischen Beschreibungen liefern unterschiedliche Mechanismen, die den Pol-Pol Oszillationen zu Grunde liegen. Welcher der beiden Mechanismen nun in lebenden Zellen die Oszillation realisiert, bleibt experimentell zu klären.

Um alle Charakteristika der Musterbildung der Min-Proteine zu reproduzieren, benötigen wir einen tieferen Einblick in die molekularen Details der involvierten Proteine. Weitere genetische, physiologische und strukturelle Untersuchungen der Min-Proteine sind notwendig um die Diskrepanzen zwischen Theorie und Experiment weiter zu verringern.

Außerdem sind für einen quantitativen Vergleich auf der Basis einzelner Zellen, präzise Messungen der Konzentrationen von MinD und MinE notwendig. Diese könnten genutzt werden um die *in vivo* Phasendiagramme aus Abbildung 10 experimentell zu realisieren.

Unsere Beschreibung der Dynamik des Min-Systems kann verwendet werden um neue *in vitro* Experimente zu konzipieren mit deren Hilfe wir einen tieferen Einblick in die Wechselwirkung zwischen Min-Protein Dynamik und der Bildung des Z-Rings in lebenden Zellen erlangen können. Ein Beispiel hierfür. Zusätzlich können wir mit unserer Beschreibung die Bedingungen bestimmen, bei denen Min-Protein Mustern in Vesikeln in *in vitro* Systemen entstehen können. Experimente dieser Art stellen wichtige Schritte dar, ein synthetisches System zu generieren, welches in der Lage ist, sich selbstständig zu teilen. Dies wäre der erste Schritt zur synthetischen Zelle.

Die Wahrnehmung ihrer Umwelt ist für das Überleben von Zellen von fundamentaler Bedeutung. Um Signale ihrer Umwelt wahrzunehmen, detektieren Zellen mittels spezifischer Rezeptoren externe Reize, beispielsweise in Form von mechanischem Druck, von Licht oder chemischen Gradienten, und wandeln sie in zellinterne Signale um. Die Weiterleitung des Signals ins Innere der Zelle erfolgt in Abhängigkeit des Rezeptortyps über zwei Wege. Ein Typ von Rezeptoren leitet das Signal weiter, indem er seine cytoplasmatische Domäne in eine Andockstation für zelluläre Signalproteine umwandelt, ein anderer Typ setzt mittels Effektoren Botenstoffe wie etwa  $\text{Ca}^{2+}$ , DAG oder cAMP frei, die ihrerseits wiederum Signalproteine aktivieren [1, 69]. Doch völlig gleich welcher Weg gewählt wurde, die Aktivierung eines Rezeptors, führt zur Aktivierung eines intrazellulären Signalproteins, das an der ersten Stelle eines Signalübertragungsweges steht. Dieses Protein kann bei dem ihm nachgeschalteten Protein eine Konformationsänderung bewirken, wodurch es aktiviert bzw. inhibiert wird [69]. Auf diese Weise bildet sich eine kaskadenhafte Abfolge von Aktivierungen bzw. Inhibierungen spezifischer Signalproteine, die das Signal an den Ort der Zelle leiten, in dem die Zellantwort generiert wird.

Neben der reinen Existenz eines externen Signals nehmen Zellen auch die räumliche Modulation von Signalen wahr. So sind Zellen beispielsweise in der Lage, sich in der Umgebung eines Repulsivstoffes in die Richtung fortzubewegen, in dem die Konzentration des Repellent abnimmt. Zellen, die sich auf Oberflächen oder in Zellverbänden befinden, bilden in Abhängigkeit ihrer Kontaktstellen fokale Adhäsionspunkte, um sich zu bewegen bzw. Informationen mit Nachbarzellen auszutauschen. Um die räumliche Aspekte externer Signale zu erfassen, benötigen Zellen Mechanismen, die die räumliche Modulation dieser Signale in eine intrazelluläre Information überführen.

Bei dieser Überführung spielen voraussichtlich sekundäre Botenstoffe wie etwa  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP oder DAG aufgrund ihrer räumlichen Diversität eine entscheidende Rolle. So breitet sich cAMP etwa in Form von laufenden Wellen und Spiralen in vielzelligen Verbänden von *Dictyostelium* aus [70].  $\text{Ca}^{2+}$  erscheint innerhalb einer Zelle, sowohl in Form von globalen Wellen und Oszillationen als auch in Form elementarer räumlich beschränkter  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen [71, 72]. Wäh-

rend cAMP und Ca<sup>2+</sup> zytosolisch sind, ist DAG membrangebunden und breitet sich vom Ort seiner Entstehung durch Diffusion aus. Da viele Signalproteine durch einen bzw. eine Kombination mehrerer sekundärer Botenstoffe aktiviert werden, überträgt sich die räumliche und zeitliche Modulation der Botenstoffe auf die Signalproteine, die diese wiederum auf ihre Zielproteine übertragen usw.

Eine Gruppe von Signalproteinen, die in einem breiten Spektrum von Signalkaskaden integriert ist und somit eine Vielzahl von zellulären Funktionen reguliert, ist die Proteinkinase C [73, 74, 75, 76]. Als Kinasen katalysieren sie den Transfer einer Phosphatgruppe von Nucleosidtriphosphaten auf die Seitenketten-Hydroxy-Gruppe einer Aminosäure. Man bezeichnet diesen Prozess als Phosphorylierung. Da die Phosphatgruppe polar ist, hat dies in der Regel eine Konformationsänderung des phosphorylierten Proteins zur Folge, was sich in einer Änderung von dessen Aktivität zeigt. Eine wichtige Untergruppe der Proteinkinase C ist die Gruppe der konventionellen Proteinkinasen C (cPKCs). Sie setzt sich aus den Proteinen PKC $\alpha$ , PKC $\beta$  und PKC $\gamma$  zusammen. Die Proteine dieser Gruppe werden in einem großen Spektrum von lebenden Zellen exprimiert und durch die beiden sekundären Botenstoffe Ca<sup>2+</sup> und DAG aktiviert, wodurch sie an die räumliche Modulation der beiden Botenstoffe gekoppelt sind und als Koinzidenzdetektor dienen können [7]. D.h. die Aktivierung des Proteins ist an das zeitgleiche Vorhandensein der beiden Kofaktoren an einem Ort gekoppelt. In dieser Arbeit beschränken wir uns auf die Analyse

der Dynamik von PKC $\alpha$  als Repräsentant dieser Gruppe. PKC $\alpha$  wird ubiquitär exprimiert und spielt in einem großen Spektrum von zellulären Funktionen wie beispielsweise der Zellproliferation, der Apoptose oder der Zellteilung eine wichtige Rolle [77]. Als Mitglied der konventionellen PKCs (cPKCs) wird PKC $\alpha$  durch das Binden der beiden Kofaktoren Ca<sup>2+</sup> und Diacylglycerol (DAG) aktiviert.

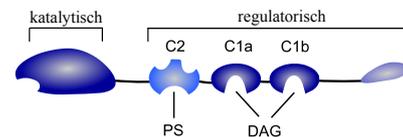


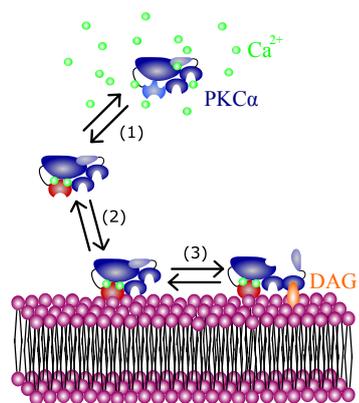
Abbildung 31: **Schematische Darstellung der Domänenstruktur von PKC $\alpha$ .** PKC $\alpha$  besteht aus einer katalytischen und einer regulatorischen Domäne. Die regulatorische Domäne setzt sich aus der C2-Domäne, den Domänen C1a und C1b sowie dem Pseudosubstrat zusammen. Die C2-Domäne des Proteins bindet Ca<sup>2+</sup>-abhängig an die Phosphatidylserine (PS) in der Membran. Via C1-Domäne bindet das Protein an den membrangebundenen sekundären Botenstoff Diacylglycerol (DAG).

Abbildung 31 zeigt die Domänenstruktur des Proteins. PKC $\alpha$  besteht aus einer N-terminalen regulatorischen und einer C-terminalen katalytischen Region, die sich aus den vier konservierten Domänen C1-C4 zusammensetzen [78, 79]. Die C1-Domäne beinhaltet ein Cys-

reiches Motiv, welche die Bindestelle für DAG/Phorbolster bildet [80]. Die C<sub>1</sub>-Domäne ist unmittelbar einer autoinhibitorischen Pseudosubstratsequenz vorangestellt [81, 79]. Diese bindet an die katalytische Domäne von PKC $\alpha$  und inhibiert die Kinaseaktivität des Proteins. Die C<sub>2</sub>-Domäne beinhaltet die Erkennungsstelle für Lipide und die Ca<sup>2+</sup>-Bindestelle [82]. Die Domänen C<sub>3</sub> und C<sub>4</sub> bilden die ATP- und Substratbindestellen [83]. Die regulatorische und katalytische Hälften sind durch eine Gelenkregion miteinander verbunden. Diese wird instabil sobald PKC $\alpha$  an die Phospholipide der Membran bindet [79].

Abbildung 32 illustriert die Aktivierung von PKC $\alpha$ . In inaktiver Form liegt PKC $\alpha$  als zytosolisches Protein vor und ist homogen verteilt. Das Binden von Ca<sup>2+</sup>-

Ionen an die C<sub>2</sub>-Domäne des Proteins führt zu einer Konformationsänderung der Domäne, was die Bindeaffinität der C<sub>2</sub>-Domäne für Phospholipide erhöht. Die Lebenszeit des Ca<sup>2+</sup>-besetzten Zustandes von zytosolischem PKC $\alpha$  beträgt etwa 12-15 ms, wird jedoch durch das Binden der C<sub>2</sub>-Domäne an die Phospholipide der Membran um



das 5-fache vergrößert [84, 85, 7]. Im membrangebundenen Zustand bindet PKC $\alpha$  mittels C<sub>1</sub> $\alpha$ -Domäne an den sekundären Botenstoff DAG, was die Stabilität der Membraninteraktion weiter stabilisiert. Das simultane Binden von zwei Ca<sup>2+</sup>-Ionen, dem Phospholipid und DAG, führt zur Freisetzung der katalytischen Domäne durch das Pseudosubstrat, was zur maximalen Aktivierung der Kinase führt. In dieser Konformation kann PKC $\alpha$

Abbildung 32: **Regulation von PKC $\alpha$  durch die Kofaktoren Ca<sup>2+</sup> und Diacylglycerol (DAG).** 1) Im inaktiven Zustand liegt PKC $\alpha$  als zytolisches Protein vor. Das Pseudosubstrat blockiert die katalytische Domäne des Proteins. Das Binden von Ca<sup>2+</sup>-Ionen an die C<sub>2</sub>-Domäne führt zu einer Konformationsänderung der C<sub>2</sub>-Domäne, wodurch PKC $\alpha$  an die Phosphatidylserine (PS) in der Membran binden kann. 2) PKC $\alpha$  transloziert zur Plasmamembran und bindet mittels aktiver C<sub>2</sub>-Domäne an PS in der Membran. 3) PKC $\alpha$  bindet mittels C<sub>1</sub> $\alpha$ -Domäne an DAG, was zur Freisetzung der katalytischen Domäne und damit zur Aktivierung der Kinaseaktivität des Proteins führt.

Zielproteine phosphorylieren. Anzumerken ist hier, dass die Lebenszeit des Ca<sup>2+</sup>-C<sub>2</sub> Komplexes von membrangebundenem PKC $\alpha$  mit 60-75 ms sehr kurz ist, wenn man berücksichtigt, dass die maximale Phosphorylierungsrate etwa 6 Phosphorylierungen pro Sekunde ist [86, 87, 7].

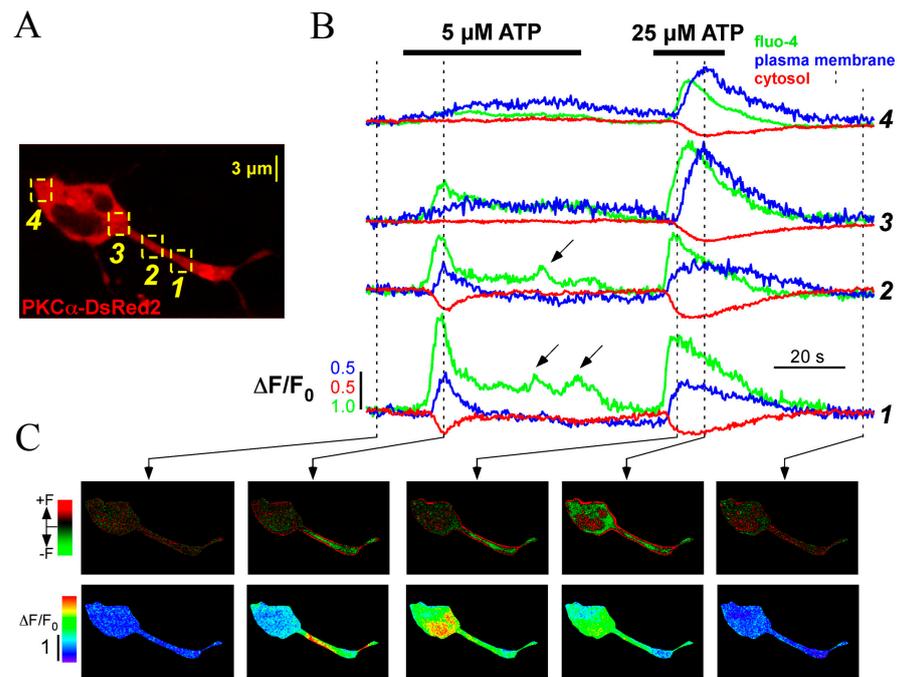


Abbildung 33: **Räumlich eingeschränkte PKC $\alpha$  Translokation, induziert durch ein räumlich beschränktes Ca<sup>2+</sup>-Signal.** A) HEK-Zelle transfiziert mit PKC $\alpha$ -DsRed2 und fluo-4. Die vier gelb markierten Regionen kennzeichnen die Orte der Messung. B) Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz von membrangebundenem PKC $\alpha$ -DsRed2 (blau), von PKC $\alpha$ -DsRed2 im angrenzenden Zytosol (rot) und fluo-4 (grün) in den vier in (A) gekennzeichneten Regionen. Die schwarzen horizontalen Balken kennzeichnen die Zeitspanne der ATP-Stimulation. C) Räumliche Verteilung von PKC $\alpha$ -DsRed2 (oben) und räumliche Verteilung von aktivem fluo-4 (unten) zu den in (B) markierten Zeitpunkten. Die Abbildung ist aus [7].

Die Lokalisation und die zeitliche Dynamik von membrangebundenem PKC $\alpha$  hängt stark von den räumlichen und zeitlichen Eigenschaften des zugrundeliegenden Ca<sup>2+</sup>-Signals ab. Ca<sup>2+</sup>-Signale unterliegen einer starken raumzeitlichen Heterogenität und reichen von lokalen Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungen, wie etwa dem Ca<sup>2+</sup>-Puff oder Ca<sup>2+</sup>-Spark mit einer räumlichen Ausdehnung von 1-3  $\mu$ m und einer Dauer von  $\sim$  1s-2s, bis hin zu globalen Ca<sup>2+</sup>-Wellen, die die gesamte Zelle durchziehen und mehrere Sekunden andauern können [71, 72]. Da die Translokation von PKC $\alpha$  zur Plasmamembran durch Ca<sup>2+</sup> reguliert wird, unterliegt auch die Verteilung von PKC $\alpha$  einer starken raumzeitlichen Heterogenität.

Abbildung 33 zeigt die Verteilung von PKC $\alpha$  in HEK293-Zellen als Folge eines räumlich ausgedehnten Ca<sup>2+</sup>-Signals. Die Stimulation der Zelle mit einer anfänglich geringen Konzentration von 5  $\mu$ M ATP, führt zur Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> in einem eingeschränkten Zellbereich, was eine Translokation von PKC $\alpha$  in dieser Region zur Folge hat. Eine weitere ATP-Stimulation der Zelle mit einer erhöhten

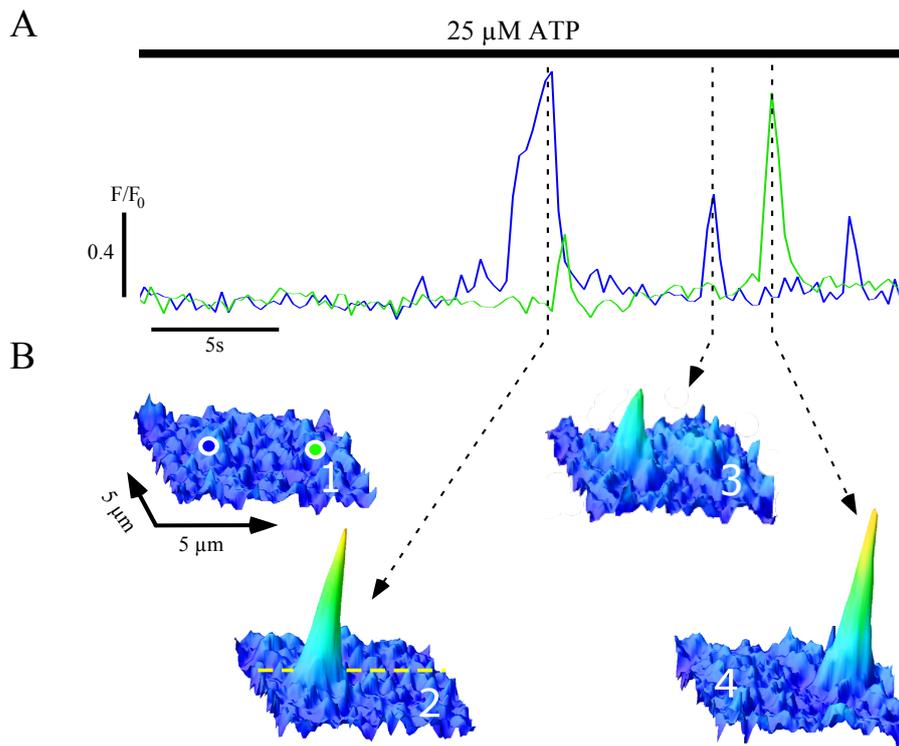


Abbildung 34: **Kurzlebige PKC $\alpha$ -Cluster.** Bildung kurzlebiger PKC $\alpha$ -Cluster in einer mit PKC $\alpha$ -EYFP transfizierten COS1-Zelle nach der Stimulation mit  $25 \mu\text{M}$  ATP. A) Relative Fluoreszenz als Funktion der Zeit für die in (B,1) gekennzeichneten Punkte der Membran. B) Schnappschüsse der räumlichen Fluoreszenzverteilung von PKC $\alpha$ -EYFP auf der Plasmamembran zu den in (A) markierten Zeitpunkten. Schnappschuss (1) zeigt die Orte der beiden Messpunkte. Die Abbildung entstammt [7]. Sie wurde modifiziert.

Konzentration von  $25 \mu\text{M}$  führt zu einer globalen Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ . In allen vier Messregionen kommt es nahezu zeitgleich zu einem Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, was eine globale Translokation von PKC $\alpha$  zur Plasmamembran bewirkt, siehe Abbildung 33B, C. Ein Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenz von fluo-4 mit der Fluoreszenz von PKC $\alpha$ -DsRed2 zeigt die unmittelbare räumliche und zeitliche Kopplung der Signale. Die Translokation von PKC $\alpha$  spiegelt sowohl die räumlichen als auch die zeitlichen Eigenschaften des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals wider [7].

Neben globalen Translokationen von PKC $\alpha$  zur Plasmamembran, lassen sich in Zellen auch räumlich stark begrenzte Translokationen beobachten, die wir als PKC $\alpha$ -Cluster bezeichnen, siehe Abbildung 34 und Abbildung 35. Bzgl. ihrer Lebenszeit, lassen sie sich in zwei Population unterteilen: Kurzlebige PKC $\alpha$ -Cluster mit einer Lebenszeit zwischen 500 ms und 1500 ms und langlebige Cluster mit einer Lebenszeit, die länger als 4s andauert [7]. Abbildung 34 zeigt das Beispiel zweier kurzlebiger PKC $\alpha$ -Cluster. Bei deren Entstehung nimmt

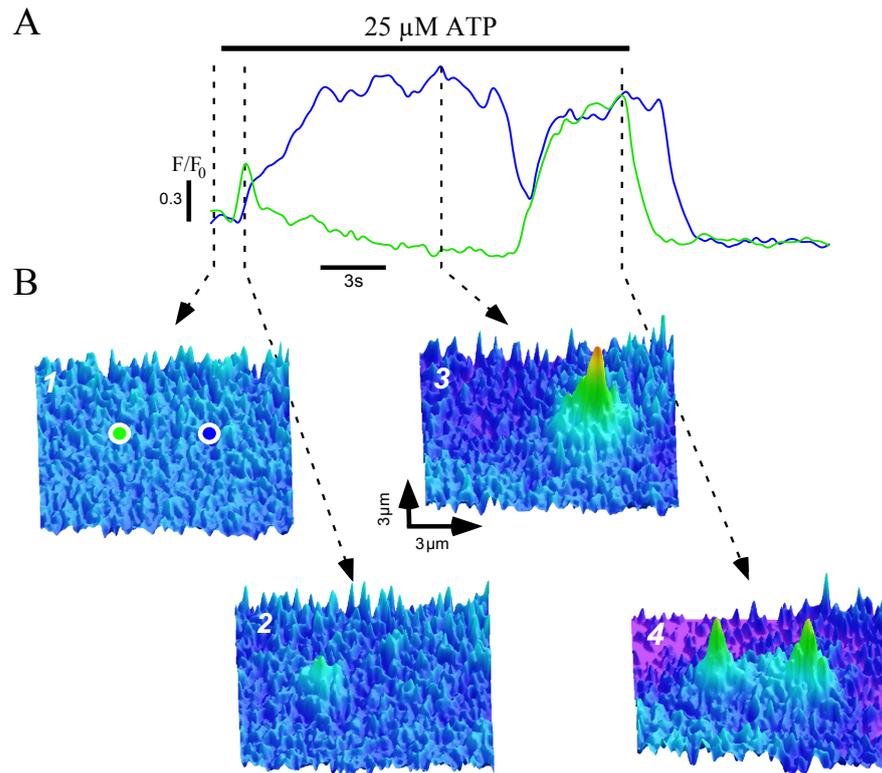


Abbildung 35: **Langlebige PKC $\alpha$ -Cluster.** Bildung langlebiger PKC $\alpha$ -Cluster in einer mit PKC $\alpha$ -EYFP transfizierten COS1-Zelle nach der Stimulation mit 25  $\mu$ M ATP. A) Relative Fluoreszenz als Funktion der Zeit für die in (B,1) gekennzeichneten Punkte der Membran. Die Fluoreszenzkurven langlebiger PKC $\alpha$ -Cluster zeigen einen charakteristischen Verlauf. Die Fluoreszenz nimmt zu, sättigt und bildet eine Plateauphase. In dieser Phase sind die Proteine stabil mit der Membran verbunden. Nach einer gewissen Zeit lösen sich die Proteine nahezu zeitgleich von der Membran ab, wodurch die Fluoreszenz schlagartig abnimmt. B) Schnappschüsse der räumlichen Fluoreszenzverteilung von PKC $\alpha$ -EYFP auf der Plasmamembran zu den in (A) markierten Zeitpunkten. Die Abbildung entstammt [7].

die Fluoreszenz von membrangebundenem PKC $\alpha$  lokal zu und nach Erreichen ihres Maximalwertes unmittelbar ab. Da die räumliche Ausdehnung ( $< 4 \mu$ m) als auch die Lebenszeit ( $\sim 1$ s-2s) dieser Cluster der Ausdehnung und Dauer von Ca $^{2+}$ -Puffs entspricht, liegt es nahe, dass sie die direkte Folge einer lokalen und kurzzeitigen Freisetzung von Ca $^{2+}$  unmittelbar oberhalb der Membran sind [7]. Eine genaue experimentelle Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Ca $^{2+}$ -Freisetzung und lokalen PKC $\alpha$ -Translokationen steht aus.

Abbildung 35 zeigt die räumliche Verteilung der Fluoreszenz und den zeitlichen Verlauf deren maximalen Intensität am Beispiel zweier langlebiger PKC $\alpha$ -Cluster. Während im Fall kurzlebiger PKC $\alpha$ -Cluster die Fluoreszenzintensität nach dem Erreichen ihres Maximums unmittelbar abnimmt, bildet sie bei langlebigen Clustern eine Plateau-

phase, die mehrere Sekunden anhält und danach schlagartig abfällt, siehe Abbildung 35A. Auch hier gehen wir davon aus, dass die räumlich stark abgegrenzte Akkumulationen von PKC $\alpha$ , siehe Abbildung 35B, die Folge einer lokalen Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> direkt oberhalb der Membran ist. Die Lebenszeit der beiden Cluster ( $\approx 6$ s und  $\approx 4$ s) überschreitet die maximale Dauer elementarer Ca<sup>2+</sup> Freisetzungen ( $\approx 1$ s) signifikant. Eine mögliche Ursache dieser verlängerten Lebenszeit, könnte in der Interaktion von PKC $\alpha$  mit dem membrangebundene Botenstoff DAG liegen, der die Bindung des Proteins zur Membran stabilisiert und damit deren Lebenszeit verlängert [7]. Für die Bildung der Plateauphase und der anschließenden, schlagartigen Abnahme der Fluoreszenz in Abbildung 35A liefert das Vorhandensein von DAG jedoch keine Erklärung. Da die Bindung zu DAG lediglich die Lebenszeit einzelner PKC $\alpha$  Moleküle im membrangebundenen Zustand erhöht, würde unmittelbar nach dem Erreichen der Maximalintensität in Abbildung 35, die Intensität exponentiell abnehmen. Im Vergleich zu der Situation ohne DAG, wäre die charakteristische Zeitkonstante der Intensitätsabnahme größer, es würde sich jedoch keine Plateauphase bilden an deren Ende die Intensität schlagartig abnimmt.

In Abbildung 36 sind die Eigenschaften von 160 untersuchten PKC $\alpha$ -Clustern zusammengefasst. Wie zu Beginn beschrieben, lassen sich zwei Populationen von Lebenszeiten unterscheiden, siehe Abbildung 36A. Kurzlebige Cluster mit einer Lebenszeit  $< 2$ s und langlebige Cluster mit Lebenszeiten, die größer als 4s sind. Die Häufigkeitsverteilung der maximalen Fluoreszenzintensität  $\Delta f / f_0$ , der in den 160 Zellen untersuchten PKC $\alpha$ -Cluster, zeigt zwei lokale Maxima bei etwa 0.4 und 1.2, siehe Abbildung 36B. Setzt man nun die Lebenszeit in Beziehung mit der maximalen Fluoreszenzintensität, siehe Abbildung 36C, so zeigt dies, dass eine notwendige Bedingung langer Lebenszeiten, eine hohe Fluoreszenzintensität und damit eine möglichst dichte Anordnung der Proteine im PKC $\alpha$ -Cluster ist [7]. Abbildung 36D zeigt die Häufigkeitsverteilung der räumlichen Ausdehnung der 160 untersuchten PKC $\alpha$ -Cluster. Die Ausdehnung elementarer Ca<sup>2+</sup> Signale liegt gewöhnlich zwischen  $1\mu\text{m}$  und  $6\mu\text{m}$  [88] und liegt damit in guter Übereinstimmung mit der räumlichen Ausdehnung der untersuchten PKC $\alpha$  Cluster, was einen weiteren Hinweis für die direkte Kopplung zwischen lokaler Ca<sup>2+</sup> Freisetzung und der Bildung von PKC $\alpha$ -Clustern darstellt.

In den nun folgenden drei Kapiteln untersuchen wir welche Mechanismen für die Bildung langlebiger PKC $\alpha$  Cluster verantwortlich sind. Dazu entwickeln wir eine theoretische Beschreibung, deren zentraler Mechanismus die intermolekulare Wechselwirkung membrangebun-

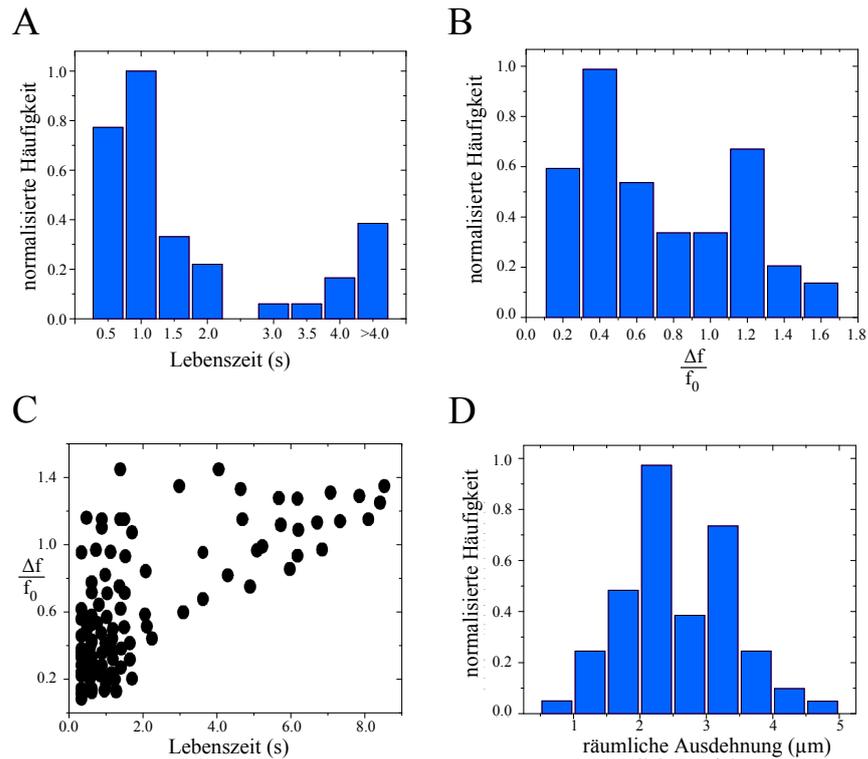


Abbildung 36: **Eigenschaften von PKC $\alpha$ -Clustern in COS1-Zellen.** COS1-Zellen wurden mit PKC $\alpha$ -EYFP bzw. PKC $\alpha$ -EGFP transfiziert und mit  $25\mu\text{M}$  ATP stimuliert. A) Häufigkeitsverteilung der Lebenszeiten von PKC $\alpha$ -Clustern. Die Lebenszeit entspricht dem Abstand der Zeitpunkte in denen die Fluoreszenz 50% ihres Maximalwertes beträgt. B) Häufigkeitsverteilung der maximalen Fluoreszenz von PKC $\alpha$ -Clustern. C) Maximale Fluoreszenz als Funktion der Lebenszeit. D) Häufigkeitsverteilung der räumlichen Ausdehnung von PKC $\alpha$ -Cluster. Die Abbildung entstammt [7]. Sie wurde modifiziert.

dener PKC $\alpha$  Moleküle ist. Um unsere Annahme zu überprüfen, führen wir Fluoreszenzmessungen an lebenden HEK-Zellen durch, die sowohl YFP- als auch CFP-markierte PKC $\alpha$  Moleküle zeitgleich exprimieren und vergleichen die experimentellen Ergebnisse mit den entsprechenden Ergebnissen der stochastischen Simulationen. Die Experimente wurden von Xin Hui und Lars Kaestner in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Lipp durchgeführt.



Ausgehend von den molekularen Eigenschaften von PKC $\alpha$ , als auch dessen durch Fluoreszenzmessung bestimmten Translokations- und Bindeverhaltens, entwickeln wir in diesem Kapitel eine theoretische Beschreibung, die es erlaubt, das charakteristische Verhalten langlebiger PKC $\alpha$ -Cluster zu erklären. Damit ist diese Beschreibung in der Lage, das gesamte durch Ca<sup>2+</sup>-induzierte raumzeitliche Spektrum der PKC $\alpha$ -Dynamik qualitativ zu reproduzieren. Sie basiert sowohl auf einer allosterischen Regulation des Proteins als auch auf einer intermolekularen Wechselwirkung membrangebundener PKC $\alpha$ -Moleküle.

Wie wir im letzten Abschnitt gesehen haben, ist PKC $\alpha$  höchstwahrscheinlich in der Lage, die komplexe raumzeitliche Dynamik von Ca<sup>2+</sup>-Signalen auszulesen und sie in eine Translokation zur Plasmamembran zu übersetzen. Während sich die Bildung kurzlebiger Cluster und globale Translokationen von PKC $\alpha$  qualitativ durch die Wechselwirkung der C<sub>2</sub>-Domäne mit den Phospholipiden der Membran bzw. der C<sub>1</sub>-Domäne mit DAG erklären lassen, sind die charakteristischen Eigenschaften langlebiger PKC $\alpha$ -Cluster durch diese Interaktionen nicht zu beschreiben.

Neben der Interaktion der C<sub>2</sub>-Domäne zu PS und der C<sub>1</sub>-Domäne zu DAG, schlagen wir dazu eine weitere Interaktion von membrangebundenem PKC $\alpha$  vor. Dies ist die intermolekulare Wechselwirkung membrangebundener PKC $\alpha$ -Moleküle. Eine solche Wechselwirkung könnte die Ca<sup>2+</sup>-gebundene Konformation des membrangebundenen PKC $\alpha$  Moleküls stabilisieren und damit die Lebenszeit des Proteins auf der Membran verlängern. Gleichsam könnte sich durch die intermolekulare Wechselwirkung der Proteine Konformationsänderungen im gesamten Komplex ausbreiten, die zu dessen Destabilisierung und somit zu einem schlagartigen Ablösen der Proteine von der Membran führen. Abbildung 37 zeigt schematisch die Prozesse von PKC $\alpha$ , die wir in unserer theoretischen Beschreibung berücksichtigen.

In Abhängigkeit der Anzahl der gebundenen Ca<sup>2+</sup>-Ionen, existieren drei Zustände von PKC $\alpha$ : Ca<sup>2+</sup>-loses PKC $\alpha$  sowie Proteine deren C<sub>2</sub>-Domäne an ein bzw. zwei Ca<sup>2+</sup>-Ionen gebunden sind. PKC $\alpha$  Moleküle, deren C<sub>2</sub>-Domäne an ein Ca<sup>2+</sup>-Ion gebunden ist, bezeichnen wir im Folgenden mit PKC $\alpha^{1Ca^{2+}}$ . PKC $\alpha$  Moleküle mit Bindung an zwei Ca<sup>2+</sup>-Ionen werden mit PKC $\alpha^{2Ca^{2+}}$  bezeichnet. Die Dynamik

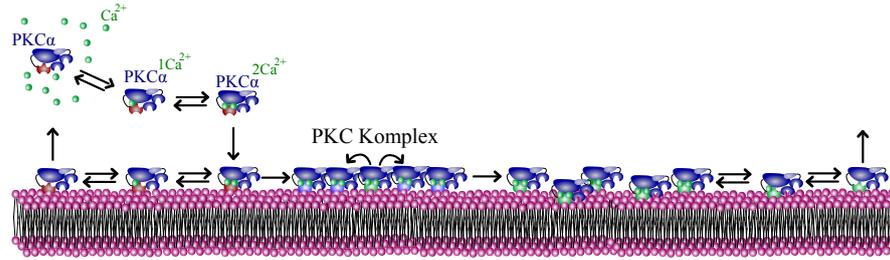
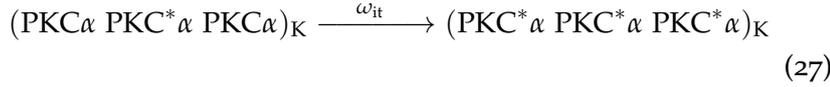
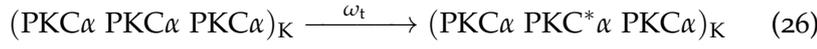


Abbildung 37: **Schematische Darstellung der molekularen Prozesse.** Es existieren drei Zustände von zytosolischem PKC $\alpha$ : Ca $^{2+}$ -loses PKC $\alpha$ , PKC $\alpha$ Ca $^{2+}$  mit Bindung zu einem Ca $^{2+}$ -Ion, sowie PKC $\alpha$ 2Ca $^{2+}$  mit Bindung zu zwei Ca $^{2+}$ -Ionen. Ausschließlich PKC $\alpha$ 2Ca $^{2+}$  bindet an die Membran. Stoßen im membran-gebundenen Zustand PKC $\alpha$ 2Ca $^{2+}$  zusammen, bilden sie Komplexe, wodurch die Ca $^{2+}$ -Bindung der Moleküle stabilisiert wird. Im Komplex kommt es spontan zu Konformationsänderungen, welche sich im gesamten Komplex ausbreiten und ihn destabilisieren. PKC $\alpha$ -Moleküle in der neuen Konformation verlieren die Fähigkeit neue Komplexe zu bilden.

von Ca $^{2+}$  wird in unserer Beschreibung nicht explizit berücksichtigt. Stattdessen nehmen wir die Dichte von Ca $^{2+}$  im gesamten System als homogen und konstant an und drücken die Binderaten von PKC $\alpha$  zu Ca $^{2+}$  als Funktion der globalen Ca $^{2+}$  Dichte  $c_{Ca^{2+}}$  aus. Die Zustandsänderung von zytosolischem PKC $\alpha$ , die durch das Binden eines Ca $^{2+}$  Ions entsteht, erfolgt mit der Rate  $\bar{\omega}_{b,c} \cdot c_{Ca^{2+}}$ . Die Zustandsänderung von zytosolischem PKC $\alpha$  durch das Ablösen eines Ca $^{2+}$ -Ions findet mit der konstanten Rate  $\bar{\omega}_{d,c}$  statt. Ausschließlich PKC $\alpha$  Moleküle welche an zwei Ca $^{2+}$ -Ionen gebunden sind, besitzen eine genügend hohe Membranaffinität und binden mit der Rate  $\omega_a$  an die Membran. Dort kann PKC $\alpha$ 2Ca $^{2+}$  als frei diffusives Molekül oder in einem Komplex vorliegen. Außerhalb eines Komplexes erfolgt das Ablösen von Ca $^{2+}$  mit der Rate  $\bar{\omega}_{d,m}$ . Neue Ca $^{2+}$ -Ionen binden mit der Rate  $\bar{\omega}_{b,m} \cdot c_{Ca^{2+}}$ . Ca $^{2+}$ -loses PKC $\alpha$  löst sich mit der Rate  $\bar{\omega}_d$  von der Membran ab. Im Komplex wird die Bindung von Ca $^{2+}$  zu PKC $\alpha$  durch die Interaktion benachbarter Proteine stabilisiert. Die Ablöserate von Ca $^{2+}$  eines Moleküls mit  $n$  Nachbarmolekülen bestimmt sich zu  $\bar{\omega}_{d,mc}(n) = \bar{\omega}_{d,m}e^{-\alpha n}$ . PKC $\alpha$ -Moleküle im Komplex ändern spontan mit der Rate  $\omega_t$  ihre Konformation. Moleküle in dieser Konformation erhöhen die Umwandlungsrate ihrer direkten Nachbarn von  $\omega_t$  auf  $\omega_{it}$ . PKC $\alpha$  Moleküle in der neuen Konformation verlieren die Fähigkeit sich in Komplexen zu organisieren und setzen Ca $^{2+}$  erneut mit hoher Rate  $\bar{\omega}_{d,m}$  frei.

Um die Dynamik von PKC $\alpha$  zu analysieren, die durch die betrachteten Prozesse entstehen, verwenden wir eine teilchen-basiertes stochastisches Modell. In diesem Modell entspricht jedes Molekül einem Teilchen, welches sich im Zytoplasma als auch auf der Membran zu-

fällig bewegt und den folgenden sich stochastisch ereignenden Reaktionen unterliegt. Das verwendete Reaktionsschema sieht wie folgt aus:



Wir ignorieren in unseren Simulationen die räumlichen Inhomogenitäten im Zytoplasma und in der Membran, die in lebenden Zellen etwa durch Variationen in der Lipidzusammensetzung oder durch die Verdrängung des Zytoplasmas durch Zellorganellen hervorgerufen werden.

Die in den Simulationen verwendeten Parameter sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Diffusionskonstante  $D_c$  von zytosolischem PKC $\alpha$  wird durch die Kombination von experimentellen und theoretischen Methoden bestimmt. Zur Bestimmung verwenden wir FLAP (*Fluorescence Localisation After Photobleaching*) und simulieren die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenzverteilung durch das Lösen der Diffusionsgleichung in den jeweiligen Zellgeometrien. Durch den Vergleich der zeitlichen Entwicklung der Fluoreszenzverläufe in Experiment und Theorie bestimmen wir anschließend den Wert der Diffusionskonstanten.

In den Experimenten wird hierzu PKC $\alpha$ -Dendra2 in einer möglichst kleinen Region der Zelle photoaktiviert und der zeitliche Verlauf der räumlich gemittelten Fluoreszenz in der Aktivierungsregion gemessen. Abbildung 38A zeigt Schnappschüsse der Fluoreszenzverteilung zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Während unmittelbar nach der Photoaktivierung ausschließlich die Proteine in der Aktivierungsregion fluoreszieren, erfolgt durch Diffusion, die Verbreitung der Fluoreszenz in der gesamten Zelle. Zusätzlich zur Diffusion, führt

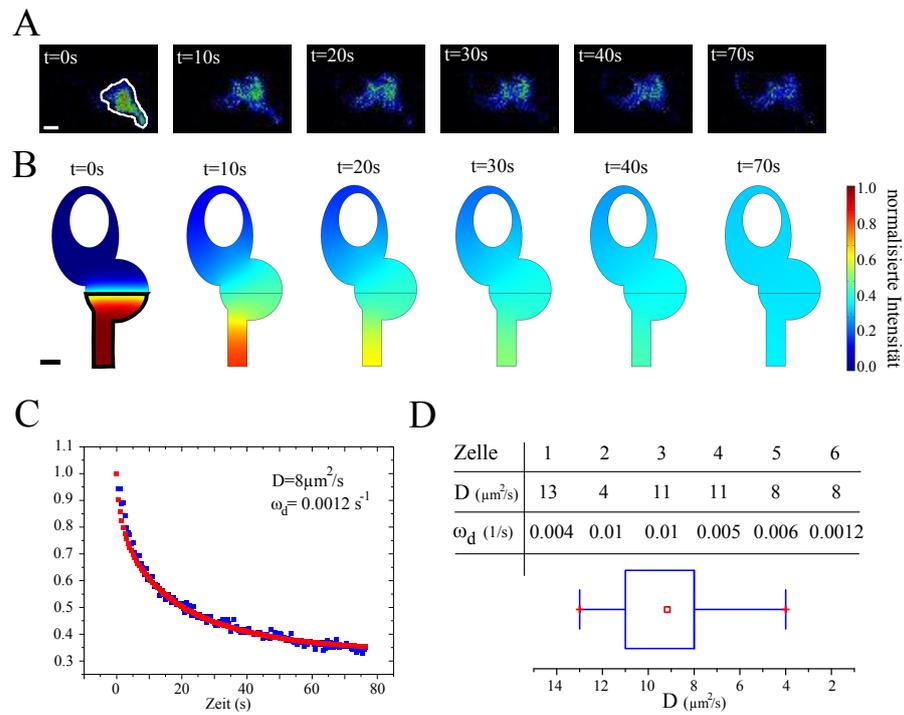


Abbildung 38: **Bestimmung der Diffusionskonstanten von zytosolischem PKC $\alpha$  mittels FLAP.** A) Zeitserie der Verteilung von PKC $\alpha$ -Dendraz2 nach der Aktivierung von Dendraz2 im weiß markierten Bereich. B) Lösung der Diffusionsgleichung in einer der Zelle in (A) nachkonstruierten zweidimensionalen Geometrie. C) Räumlich gemittelte Intensität im weiß umrandeten Gebiet in (A) als Funktion der Zeit (blaue Messpunkte) und entsprechender Fit aus den Simulationen (rote Kurve). Der Fit-Parameter ist die Diffusionskonstante, die Rate  $\omega_d$ , welche den Fluoreszenzverlust als Folge des Bleachings beschreibt, wird direkt aus den experimentellen Daten bestimmt. D) Tabelle der ermittelten Diffusionskonstanten und Fluoreszenzverlustraten  $\omega_d$  für verschiedene Zellen (oben) und Box-Whisker-Plot der Diffusionskonstante (unten). Die Maßstäbe sind  $10\mu\text{m}$  (Experiment) und  $5\mu\text{m}$  (Simulation).

ein weiterer Prozess zu Abnahme der Fluoreszenz in der Aktivierungsregion. Dies ist das Zerstören der Farbstoffe durch die Photoaktivierung (*Photobleaching*). Um das Photobleaching zu berücksichtigen wird die zeitliche Abnahme der Gesamtfluoreszenz exponentiell approximiert und die Abfallrate  $\omega_d$  aus der Fitkurve bestimmt. Um nun die Diffusionskonstante  $D$  von zytosolem PKC $\alpha$  zu bestimmen, wird die Diffusionsgleichung

$$\frac{\partial}{\partial t}c = D\nabla^2c - \omega_d c \quad (28)$$

in der nachkonstruierten Zellgeometrie gelöst. Abbildung 38B zeigt die Lösung der Diffusionsgleichung zu verschiedenen Zeitpunkten der Simulation in einer der realen Zellen in Abbildung 38A nachempfundenen Geometrie. Zur Bestimmung der Diffusionskonstanten wird der zeitliche Verlauf der räumlich gemittelten Intensität im schwarz umrandeten Gebiet in Abbildung 38B mit dem zeitlichen Verlauf der räumlich gemittelten Intensität im weiß umrandeten Gebiet in Abbildung 38A verglichen. Durch Variation der Diffusionskonstanten wird so die beste Fitkurve ermittelt. Abbildung 38C zeigt die experimentelle (blau) und gefittete Kurve (rot) für die Zelle in Abbildung 38A. In Abbildung 38D sind die auf diese Weise ermittelten Diffusionskonstanten  $D$  und Abfallraten  $\omega_d$  der sechs untersuchten Zellen tabellarisch dargestellt. Der Mittelwert der Diffusionskonstanten liegt bei etwa  $9\mu\text{m}^2/\text{s}$ . Der Wert der Rate  $\omega_d$  variiert von Zelle zu Zelle. Dies könnte die Folge von unterschiedlich starken Belichtungsintensitäten sein, die verwendet wurden um die räumliche Verteilung der Fluorophore sichtbar zu machen.

Die Diffusionskonstante  $D_c$  von zytosolischem PKC $\alpha$  wird auf Basis der experimentell ermittelten Diffusionskonstanten in den Simulationen auf  $10\mu\text{m}^2/\text{s}$  aufgerundet. Die Diffusionskonstante  $D_m$  der membrangebundenen Proteine wird auf  $1\mu\text{m}^2/\text{s}$  gesetzt und liegt damit in der typischen Größenordnung von Diffusionskonstanten membrangebundener Proteine. Die Lebenszeit des zytosolischen Ca $^{2+}$ -PKC $\alpha$ -Komplexes wurde experimentell bestimmt und liegt bei etwa 12ms-15ms. Das Binden der C2-Domäne an PS verlängert die Lebenszeit um das etwa 5-fache [84, 85, 7]. Dies führt zu einer Ca $^{2+}$ -Ablöserate von  $\bar{\omega}_{d,c} = 65\text{s}^{-1}$  im Zytoplasma und von  $\bar{\omega}_{d,c} = 16\text{s}^{-1}$  auf der Membran. Die Interaktion mit DAG stabilisiert den Ca $^{2+}$ -PKC $\alpha$ -Komplex zusätzlich. Dies berücksichtigen wir in den Simulationen, indem wir die Ca $^{2+}$ -Ablöserate reduzieren. Die Binderate von Ca $^{2+}$ -Ionen an zytosolisches als auch membrangebundenes PKC $\alpha$  wird in den Simulationen so gewählt, dass sie in der Größenordnung ( $10^6$  –

|                      | ohne DAG  | mit DAG   |
|----------------------|---|---|
| $D_c$                | $10 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$             | $10 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$             |
| $D_m$                | $1 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$              | $1 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$              |
| $\alpha$             | 1.4   | 3.0   |
| $\bar{\omega}_{d,c}$ | $65 \frac{1}{\text{s}}$                         | $65 \frac{1}{\text{s}}$                         |
| $\bar{\omega}_{b,m}$ | $5 \cdot 10^7 \frac{1}{\text{M}\cdot\text{s}}$  | $5 \cdot 10^7 \frac{1}{\text{M}\cdot\text{s}}$  |
| $\bar{\omega}_{b,c}$ | $25 \cdot 10^7 \frac{1}{\text{M}\cdot\text{s}}$ | $25 \cdot 10^7 \frac{1}{\text{M}\cdot\text{s}}$ |
| $\bar{\omega}_{d,m}$ | $16 \frac{1}{\text{s}}$                         | $4 \frac{1}{\text{s}}$                          |
| $\omega_{it}$        | $200 \frac{1}{\text{s}}$                        | $200 \frac{1}{\text{s}}$                        |
| $\omega_a$           | $100 \frac{1}{\text{s}}$                        | $800 \frac{1}{\text{s}}$                        |
| $\omega_d$           | $100 \frac{1}{\text{s}}$                        | $100 \frac{1}{\text{s}}$                        |
| $\omega_t$           | $0.003 \frac{1}{\text{s}}$                      | $0.001 \frac{1}{\text{s}}$                      |

Tabelle 2: Parametersätze, welche für die Simulationen der stochastischen Dynamik (17)-(27) verwendet werden. Da wir DAG nicht als eigenständiges Teilchen simulieren, verwenden wir zwei unterschiedliche Parametersätze, die die Membraninteraktion von PKC $\alpha$  einmal mit und einmal ohne Bindung zu DAG charakterisiert.

$10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) experimentell bestimmter Ca<sup>2+</sup>-Binderaten anderer Proteine liegt [89]. Die übrigen Parameter wurden so gewählt, dass die Simulationen die experimentellen Daten qualitativ reproduzieren können.

## KOMPLEXBILDUNG MEMBRANGEBUNDENER PKC $\alpha$ MOLEKÜLE

---

In diesem Kapitel untersuchen wir mittels experimenteller und theoretischer Methoden, ob die Bildung von PKC $\alpha$ -Komplexen einen möglichen Mechanismus darstellt, mit dessen Hilfe sich das räumliche und zeitliche Verhalten des Proteins erklären lässt. Dazu überprüfen wir in einem ersten Schritt, ob die theoretische Beschreibung die Bildung von PKC $\alpha$ -Clustern reproduzieren kann, die sich durch die lokale Freisetzung von zytosolischem Ca<sup>2+</sup> bilden können. Danach analysieren wir die Auswirkung globaler Ca<sup>2+</sup>-Signale auf die Translokation und Membraninteraktion von PKC $\alpha$ .

Der experimentellen Raum zur Untersuchung dieser Dynamik liefern HEK-Zellen, die sowohl YFP- als auch CFP-markierte PKC $\alpha$ -Moleküle in nahezu gleicher Konzentration simultan exprimieren. In einem ersten Schritte untersuchen wir die Dynamik von PKC $\alpha$  unter physiologischen Bedingungen und stimulieren die Zellen mit dem natürlichen Agonisten ATP, was zur Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> und DAG führt. Da wir die räumliche Verteilung von DAG und dessen Konzentration experimentell nicht messen können, vereinfachen wir unsere Untersuchungen und beschränken uns im zweiten Schritt auf die Interaktion zwischen Ca<sup>2+</sup>, PKC $\alpha$  und der Plasmamembran. Dazu tauchen wir die Zellen in eine Ca<sup>2+</sup>-Lösung und geben den Ionophor Ionomycin hinzu, welcher Ca<sup>2+</sup>-Ionen durch die Plasmamembran transportiert, ohne DAG freizusetzen. Dies führt zu einem globalen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, dessen Höhe sich durch die extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration regulieren lässt. Um die Wechselwirkung membrangebundener PKC $\alpha$  Moleküle nachzuweisen, verwenden wir in den Experimenten FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*).

Zur Charakterisierung der PKC $\alpha$ -Dynamik messen wir in den Experimenten den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensitäten von zytosolischem und membrangebundenem PKC $\alpha$ , sowie den zeitlichen Verlauf der berechneten FRET-Effizienz. In den Simulationen werden die Fluoreszenzen nicht explizit modelliert. Stattdessen sind 50% der Proteine mit dem Label „YFP“ und die übrigen 50% mit dem Label „CFP“ gekennzeichnet. Bis auf ihre Kennzeichnung sind die Proteine in allen molekularen Eigenschaften identisch. Befindet sich nun ein CFP-Molekül in direktem Kontakt zu einem YFP-Molekül in einem

Komplex, so findet in den Simulationen ein Energietransfer zwischen den Teilchen statt. Da wir nur an einem qualitativen Vergleich der experimentellen und theoretischen Ergebnisse interessiert sind, normieren wir die Höhe der transferierten Energie zwischen zwei Teilchen auf 1. Das gesamte FRET-Signal der Moleküle auf der Membran entspricht somit der Summe aller CFP-Moleküle in Komplexen, die mindestens ein YFP-Molekül als direkten Nachbarn haben. Zwischen zytosolischen bzw. frei beweglichen membrangebundenen Proteinen wird in den Simulationen keine Wechselwirkung der Fluorophore berücksichtigt.

In den Experimenten wird durch die Stimulation der HEK-Zellen mit ATP im Gegensatz zu der Stimulierung mit Ionomycin auch DAG freigesetzt, welches die Bindung von PKC $\alpha$  zur Plasmamembran weiter stabilisiert. Da uns der Ort der Freisetzung, die Konzentration an freigesetztem DAG als auch dessen Dynamik auf der Membran nicht bekannt sind, simulieren wir DAG in unseren Simulationen nicht explizit als eigenständige Teilchen. Stattdessen verwenden wir zwei Parametersätze, die die Dynamik von PKC $\alpha$  mit und ohne Bindung zu DAG beschreiben. Da DAG die Affinität des Proteins zur Membran erhöht und die Bindung zur Membran stabilisiert, verwenden wir in den Simulationen mit DAG eine erhöhte Binde rate von PKC $\alpha$  zur Plasmamembran, eine geringere Umwandlungsrate in die komplexzerstörende Konformation und eine geringere Ca $^{2+}$ -Ablöserate von membrangebundenem PKC $\alpha$ .

Da wir weder die genauen Dichten von PKC $\alpha$  in den analysierten Zellen kennen, noch die genauen Reaktionsraten mit denen sich die Reaktionen zwischen PKC $\alpha$ , Ca $^{2+}$ , DAG und der Plasmamembran ereignen, findet der Vergleich zwischen den experimentellen und theoretischen Daten ausschließlich auf qualitativer Ebene statt.

### 9.0.1 Lokale Aktivierung von PKC $\alpha$

Wir beginnen unsere Untersuchungen mit der Bildung von PKC $\alpha$ -Komplexen, die als Folge einer lokalen Freisetzung von zytosolischem Ca $^{2+}$  entstehen. Da wir Ca $^{2+}$  in den Rechnungen nicht explizit berücksichtigen, starten wir die Simulationen mit einer kugelförmigen Akkumulation von zytosolischem PKC $\alpha^{2Ca^{2+}}$  unmittelbar oberhalb der Membran, siehe Abbildung 39A. Für die globale Konzentration von Ca $^{2+}$  gilt in diesen Simulationen  $c_{Ca^{2+}} = 0$ . Zu Beginn untersuchen wir den Einfluss des Abstandes der Ca $^{2+}$ -Quelle von der Membran. Dazu variieren wir die Distanz zwischen der zytosolischen Anfangsverteilung von PKC $\alpha^{2Ca^{2+}}$  und der Membran und bestimmen die maximale Anzahl der membrangebundenen Moleküle in Abhängig-

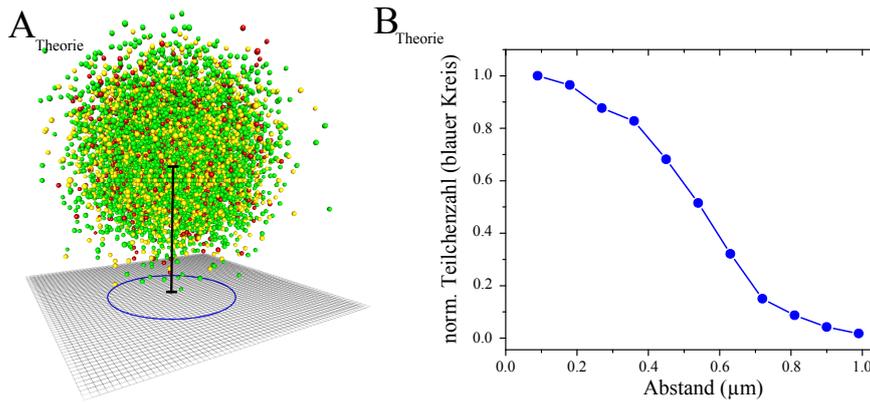


Abbildung 39: **Aktivierung von PKC $\alpha$  in Abhängigkeit des Abstandes zur Membran.** A) Schnappschuss der Anfangsverteilung zytosolischer PKC $\alpha$ -Moleküle kurz nach dem Start der Simulation. Der Abstand zwischen dem Mittelpunkt der Verteilung und der Membran beträgt  $1\mu\text{m}$ . B) Normierte Maximalanzahl an Proteinen im blau umrandeten Gebiet in (A) als Funktion des Abstandes zwischen dem Mittelpunkt der zytosolischen Anfangsverteilung und der Membran. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 2 (ohne DAG) angegeben.

keit des Abstandes. Mit wachsender Distanz nimmt die Teilchenzahl rapide ab, so dass für Distanzen  $>1\mu\text{m}$ , so gut wie keine Proteine mehr an die Membran binden, siehe Abbildung 39B. Da der Durchmesser der zytosolischen Anfangsverteilung etwa  $1\mu\text{m}$  beträgt, lässt sich aus den Daten schließen, dass der Ca $^{2+}$ -PKC $\alpha$  Komplex etwa  $0.5\mu\text{m}$  zurücklegen kann, bevor er zerfällt. Eine grobe Abschätzung bestätigt das Ergebnis der Simulation. Bei einer Diffusionskonstanten von  $D_c=10\mu\text{m}^2/\text{s}$  und einer mittleren Lebenszeit des zytosolischen Ca $^{2+}$ -PKC $\alpha$  Komplexes von  $\bar{\omega}_{d,c}^{-1} \approx 15\text{ms}$ , ergibt sich für die mittlere zurückgelegte Wegstrecke des Komplexes, bevor sich Ca $^{2+}$  löst,  $\lambda \approx 0.4\mu\text{m}$ .

Abbildung 40 zeigt die räumlichen und zeitlichen Eigenschaften eines PKC $\alpha$ -Clusters bei einer lokalen Aktivierung des Proteins ohne die Interaktion mit DAG. In Abbildung 40A sind Schnappschüsse der Proteinverteilung von PKC $\alpha$  in den Simulationen dargestellt. Zum Zeitpunkt  $t = 0\text{s}$  sind die Moleküle, welche zweifach Ca $^{2+}$  gebunden sind, halbkugelförmig oberhalb der Membran angeordnet. Die Ausdehnung dieser Anordnung entspricht etwa  $2\mu\text{m}$  und liegt damit in der Größenordnung der räumlichen Ausdehnung von PKC $\alpha$ -Clustern in COS1-Zellen, siehe Abbildung 36D. Der Abstand zwischen Membran und unterster Proteinschicht der zytosolischen Verteilung beträgt  $0.12\mu\text{m}$ . Aufgrund der anfänglich lokalen Verteilung der Proteine im Zytoplasma, bildet sich eine räumlich begrenzte Verteilung der Proteine auf der Membran. Ohne die Interaktion von PKC $\alpha$  mit DAG, bilden die Proteine in den Simulationen kleinere isolierte Komplexe, die ihre Bindung zur Membran stabilisieren. Abbil-

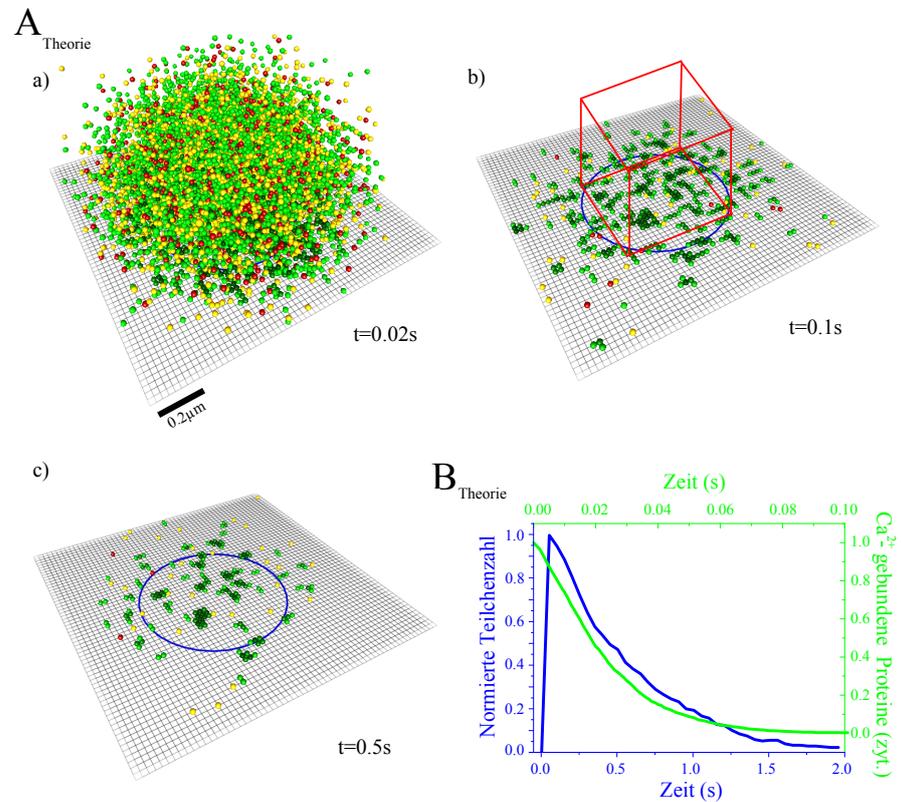


Abbildung 40: **Bildung eines kurzlebigen PKC $\alpha$ -Clusters in den Simulationen.** A) Schnappschüsse zu verschiedenen Zeitpunkten der Simulation. In (a) ist die Verteilung der zytosolischen Proteine zu Beginn der Simulation dargestellt. In (b) und (c) die Verteilungen der Proteine auf der Membran zu verschiedenen Zeitpunkten. B) Zeitliche Entwicklung der Anzahl von PKC $\alpha$  auf der Membran (blau) sowie der Anzahl von zytosolischen PKC $\alpha$  (grün). Die Teilchenzahl der Ca<sup>2+</sup>-gebundenen zytosolischen Proteine wird innerhalb des roten Kubus, die Teilchenzahl der membrangebundenen Proteine innerhalb der blauen Kreises gemessen. Farbcode: Ca<sup>2+</sup>-loses PKC $\alpha$  (rot), einfach Ca<sup>2+</sup>-gebundenes PKC $\alpha$  (gelb), zweifach Ca<sup>2+</sup>-gebundenes PKC $\alpha$  (grün), PKC $\alpha$  in komplexerstörender Konformation (blau, unabhängig der Anzahl der gebundenen Ca<sup>2+</sup>-Ionen). Je dunkler der Grünton der Proteine im Komplex, desto geringer ist die Ca<sup>2+</sup>-Ablöserate. Die Gesamtteilchenzahl ist 8000. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 2 (ohne DAG) angegeben.

Abbildung 40B zeigt die zeitliche Entwicklung der Proteine auf der Membran innerhalb des blau markierten Kreises (blau) sowie die Anzahl an zytosolischen Proteinen innerhalb des roten Würfels (grün). Die starke Lokalisierung der Proteine im Zytoplasma zu Beginn der Simulation nimmt aufgrund der Diffusion sehr schnell ab. Ein Teil der Proteine bindet an die Membran, was zu einem Anstieg der Proteine im blau umrandeten Gebiet führt, die nach Erreichen ihres Maximums unmittelbar abnimmt. Die Simulationsergebnisse zeigen, dass der lokale Charakter eines Ca<sup>2+</sup>-Signals nur sehr kurzzeitig durch PKC $\alpha$  konserviert werden kann, sofern keine Interaktion mit DAG stattfindet. Wenn man berücksichtigt, dass die maximale Phosphorylierungsrate etwa 6 Phosphorylierungen pro Sekunde ist und es zusätzlich eine gewisse Zeit benötigt, bis PKC $\alpha$  auf das entsprechende Zielprotein trifft, so kann man sagen, dass kurzzeitige PKC $\alpha$ -Cluster keine relevanten Signaltransmitter darstellen.

In Abbildung 41 sind die Ergebnisse der Simulation unter Verwendung des Parametersatzes, der die Interaktion von PKC $\alpha$  mit DAG berücksichtigt, dargestellt. Teil A zeigt die räumliche Verteilung der Proteine. Die lokale Aktivierung von zytosolischem PKC $\alpha$  direkt oberhalb der Membran (a) führt zur Bildung eines großen PKC $\alpha$ -Komplexes (b). Jedes Protein im Komplex stabilisiert die Membraninteraktion seiner direkten Nachbarmoleküle, wodurch sich die Lebenszeiten der Proteine auf der Membran und somit auch die Lebenszeit des gesamten Komplexes verlängern. Spontan kommt es zur Umwandlung in die komplexzerstörende Konformation des Proteins (c), welcher sich schnell im gesamten Komplex ausbreitet (d). In diesem Zustand unterliegt das Protein einer starken Ca<sup>2+</sup>-Ablösedynamik, wodurch es sich mit hoher Affinität von der Membran löst (e). Die blaue Kurve in Abbildung 41B stellt die normierte Teilchenzahl im blau umrandeten Gebiet als Funktion der Zeit dar. Die grüne Kurve zeigt entsprechend Abbildung 40 die normierte Anzahl von Ca<sup>2+</sup>-gebundenen Molekülen direkt oberhalb der Membran. Im Gegensatz zu den kurzzeitigen PKC $\alpha$ -Clustern, sättigt der zeitliche Verlauf der Teilchenzahl von membrangebundenem PKC $\alpha$  nach Erreichen des Maximums in eine Plateauphase, die etwa 4s anhält. Anschließend nimmt die Teilchenzahl als Folge der Umwandlungsdynamik schlagartig ab. Dies entspricht qualitativ dem zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz langlebiger PKC $\alpha$ -Cluster in den Experimenten. Durch die Interaktion mit DAG und der Fähigkeit Komplexe zu bilden, ist membrangebundenes PKC $\alpha$  in der Lage den lokalen Charakter des flüchtigen Ca<sup>2+</sup>-Signals über längere Zeit zu konservieren. Vergleicht man die theoretischen Verläufe mit den experimentellen Verläufen der Fluoreszenz aus Abbildung 34 bzw. Abbildung 35, so zeigt sich, dass die

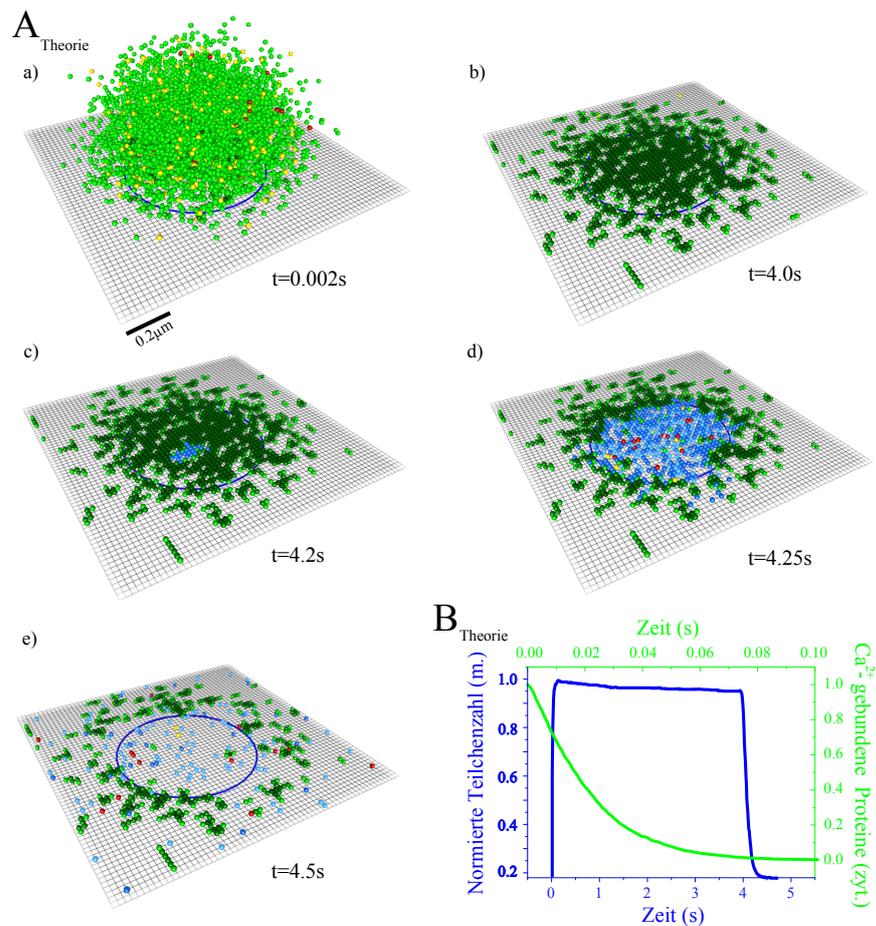


Abbildung 41: **Bildung eines langlebigen PKC $\alpha$ -Cluster in den Simulationen.** A) Schnappschüsse zu verschiedenen Zeitpunkten der Simulation. a) Zytosolische Verteilung von PKC $\alpha$  zu Beginn der Simulation. 8000 Proteine sind halbkugelförmig unmittelbar oberhalb der Membran angeordnet. Der Abstand zwischen Membran und unterster zytosolischer Proteinschicht ist  $0.12\mu\text{m}$ . b) Verteilung von PKC $\alpha$  auf der Membran. Die Proteine bilden Komplexe (grün), wodurch ihre Bindung zur Membran stabilisiert wird. c) Umwandlung einzelner Komplexproteine in die komplexzerstörende Proteinkonfiguration (blau). (d) Ausbreitung der komplexzerstörende Proteinkonfiguration im gesamten Komplex und Ablösung der Proteine. e) Verteilung der Proteine nach der Umwandlungsdynamik. In (b), (c), (d), (e) sind die zytosolischen Proteine unsichtbar. B) Zeitliche Entwicklung der Proteinanzahl innerhalb des blau umrandeten Gebiets (blau) und zeitliche Entwicklung der Anzahl der Ca<sup>2+</sup>-gebundenen zytosolischen Proteine (grün). Messgebiet der zytosolischen Proteine wurde wie in Abbildung 40 gewählt. Farbcode: Ca<sup>2+</sup>-loses PKC $\alpha$  (rot), einfach Ca<sup>2+</sup>-gebundenes PKC $\alpha$  (gelb), zweifach Ca<sup>2+</sup>-gebundenes PKC $\alpha$  (grün), PKC $\alpha$  in komplexzerstörender Konformation (blau, unabhängig der Anzahl der gebundenen Ca<sup>2+</sup>-Ionen). Je dunkler der Grünton der Proteine im Komplex, desto geringer ist die Ca<sup>2+</sup>-Ablöserate. Die verwendeten Parameter stehen in Tabelle 2 (mit DAG).

theoretische Beschreibung die Phänomenologie der uns bekannten lokalen PKC $\alpha$ -Cluster reproduzieren kann.

In Abbildung 42 ist die Analyse der Lebenszeiten der PKC $\alpha$ -Komplexe dargestellt. Teil A zeigt die Ergebnisse der Simulationen für den Parametersatz der zu der Situation ohne DAG gehört. In Teil B sind die entsprechenden Simulationen mit DAG dargestellt. Zur Bestimmung der Lebenszeit wird ein Komplex mit bekannter Anzahl von Proteinen kreisförmig auf die Membran gesetzt, so dass es keine Fehlstellen zwischen den Proteinen gibt. Die Lebenszeit des Komplexes definieren wir als die Zeit, die vergeht, bis sich 50% der Proteine von der Membran gelöst haben.

In Simulationen ohne DAG wird die Lebenszeit von Komplexen durch zwei unabhängige Ablösevorgänge der Proteine bestimmt. Dies ist einerseits die Umwandlung einzelner Proteine in die komplexzerstörende Konformation, wodurch der gesamte Komplex schlagartig destabilisiert wird und sich ein Großteil der Proteine rapide von der Membran löst, als auch durch das spontane Freisetzen von Ca<sup>2+</sup>-Ionen einzelner PKC $\alpha$ -Moleküle, wodurch sich die Proteine sukzessiv von der Membran lösen und der Komplex langsam abgebaut wird. Da beide Vorgänge auf unterschiedlichen Zeitskalen ablaufen, zeigt die Häufigkeitsverteilung der Lebenszeit in Abbildung 42A zwei lokale Maxima. In Simulationen mit DAG sind die Proteine im Komplex stärker stabilisiert, wodurch das spontane Freisetzen von Ca<sup>2+</sup>-Ionen nur äußerst selten stattfindet. Damit wird die Lebenszeit des Komplexes maßgeblich durch den Zeitpunkt bestimmt, zudem das erste Protein in die komplexzerstörende Konformation überführt wird. Dies führt zu einer Häufigkeitsverteilung der Lebenszeiten die logarithmisch normalverteilt ist, siehe Abbildung 42B.

Die mittlere Lebenszeit nimmt sowohl in den Simulationen mit als auch ohne DAG mit wachsender Teilchenzahl ab, siehe rechte Seite von Abbildung 42A, B. Dies liegt darin begründet, dass mit zunehmender Molekülanzahl  $n$  im Komplex, die Wahrscheinlichkeit  $p_n = 1 - (1 - \omega_t \Delta t)^n$  zunimmt, mit der eine Umwandlungsdynamik im Zeitintervall  $\Delta t$  initiiert wird. Für wachsende Teilchenzahlen  $n$  nimmt damit die Wahrscheinlichkeit langlebiger PKC $\alpha$ -Komplexe ab und damit auch deren mittlere Lebenszeit.

### 9.0.2 Globale Aktivierung von PKC $\alpha$

Im vorangegangenen Abschnitt konnten wir zeigen, dass sich das dynamische Verhalten der Proteine auf der Membran im Fall lokaler PKC $\alpha$  Translokationen, durch die Bildung von PKC $\alpha$ -Komplexen erklären lässt. Um nun auch experimentell zu überprüfen, ob PKC $\alpha$ -

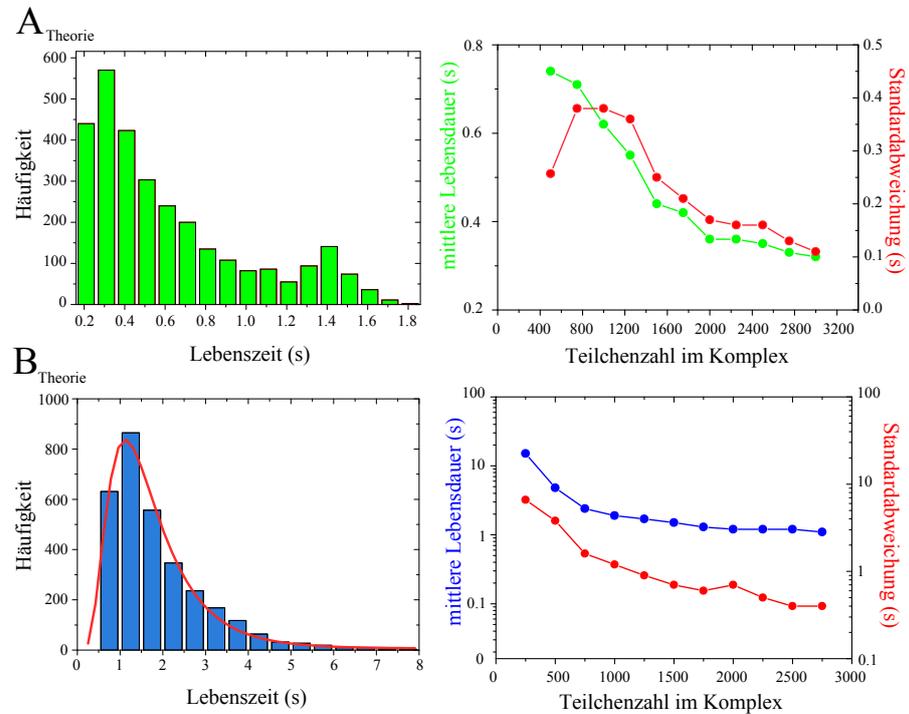


Abbildung 42: **Lebenszeit von PKC $\alpha$ -Komplexen.** A) Lebenszeit von PKC $\alpha$ -Komplexen ohne DAG. Links: Häufigkeitsverteilung der Lebenszeiten von PKC $\alpha$ -Komplexen mit 1000 Molekülen. Rechts: Mittlere Lebenszeit als Funktion der Teilchenzahl im Komplex und deren Standardabweichung. B) Lebenszeit von PKC $\alpha$ -Komplexen mit DAG. Links: Häufigkeitsverteilung der Lebenszeit eines PKC $\alpha$ -Komplexes mit 1000 Teilchen. Die rote Kurve entspricht der Log-Normalverteilung  $y_0 + A/(\sqrt{2\pi}wx)\exp(-\ln(x/x_c)^2/(2w^2))$  mit  $y_0 = 5.93 \pm 6.51$ ,  $x_c = 1.51 \pm 0.03$ ,  $w = 0.55 \pm 0.02$  und  $A = 1489.14 \pm 35.40$ . Rechts: Mittlere Lebenszeit als Funktion der Teilchenzahl im Komplex und deren Standardabweichung. Für die Statistiken der Lebenszeiten in A) und B) wurden die Proteine in kreisförmiger dicht gepackter Anordnung auf die Membran gesetzt und die Zeit bestimmt, bis sich 50% der Proteine abgelöst haben. Für die beiden Histogramme wurden 3000 Simulationsläufe durchgeführt. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 2 dargestellt.

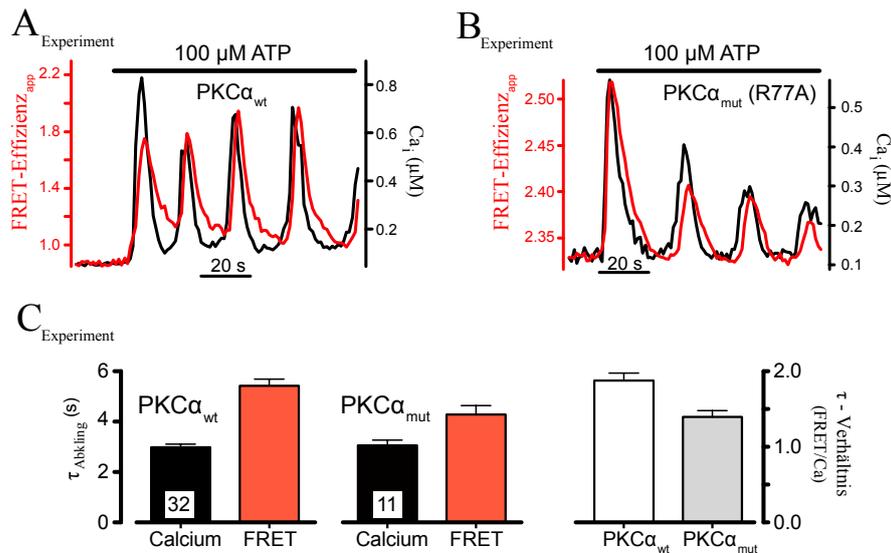


Abbildung 43: **Durch globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen hervorgerufene Oszillationen des FRET-Signals in den Experimenten.** Sowohl in Zellen mit wild-type PKC $\alpha$  (A) als auch in Zellen mit dem PKC $\alpha$  Mutanten PKC $\alpha^{R77A}$ , ruft eine Oszillation der globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (schwarz) eine Oszillation des FRET-Signals (rot) der membrangebundenen Moleküle hervor. C) Statistische Analyse der charakteristischen Abklingzeiten des  $\text{Ca}^{2+}$ - und FRET-Signals. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes dar.

Moleküle intermolekular interagieren, stimulieren wir Wildtyp HEK Zellen mit dem natürlichen Agonisten ATP und messen den zeitlichen Verlauf des Energietransfers zwischen dem Donor/Akzeptor-Paar CFP/YFP (FRET).

Die Stimulation der Zelle mit ATP, führt zu einer Oszillation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, siehe Abbildung 43A. Dem Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals folgt unmittelbar ein Anstieg des FRET-Signals. Dies illustriert deutlich die starke und unmittelbare Kopplung der  $\text{Ca}^{2+}$ - und PKC $\alpha$ -Dynamik. Nimmt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ab, folgt zeitlich leicht versetzt die Abnahme des FRET-Signals. Vergleicht man die Abklingphasen zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ - und FRET-Signal, so zeigt sich, dass beide Signale anfänglich gleich schnell abnehmen, die Abnahme des FRET-Signals im weiteren Verlauf sich jedoch verlangsamt. Eine mögliche Erklärung dieses Verhaltens, lässt sich durch die Bildung langlebiger und kurzlebiger Komplexe verstehen: Durch die Stimulation der Zelle mit ATP wird neben  $\text{Ca}^{2+}$  auch DAG freigesetzt. Auf der Membran, bildet sich dadurch eine Mischung aus langlebigen und kurzlebigen PKC $\alpha$ -Komplexen. Nimmt das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nun ab, nimmt auch die Bildung neuer Komplexe ab und es kommt in der ersten Phase des Abfalls zur Auflösung der kurzlebigen Komplexe, wodurch das FRET-Signal rapide abnimmt. In der zweiten Phasen des Abfalls lösen sich sukzessiv auch die langlebigen Komplexe ab,

wodurch auch die Abnahme des FRET-Signals verlangsamt wird. Um dies zu prüfen, stimulieren wir HEK Zellen, die den PKC $\alpha$  Mutanten PKC $\alpha^{R77A}$  exprimieren mit ATP. Die Mutation des Proteins führt dazu, dass die Bindung zwischen C1-Domäne und DAG blockiert wird.

Abbildung 43B zeigt den zeitlichen Verlauf des FRET- und Ca<sup>2+</sup>-Signals im Fall des PKC $\alpha$ -Mutanten. Die Abklingdauer des FRET-Signals ist im Vergleich zur Abklingdauer des Ca<sup>2+</sup>-Signals weiterhin leicht erhöht. Der Effekt ist jedoch weniger stark ausgeprägt. In Abbildung 43C ist eine quantitative Analyse des Abklingverhaltens des Ca<sup>2+</sup>- und FRET-Signals dargestellt. Dazu wurde die Abklingphasen der Signale exponentiell approximiert. Die charakteristische Zeitkonstante der Approximation entspricht der charakteristischen Abklingzeit  $\tau$  in Abbildung 43C. Abbildung 43C zeigt deutlich, dass durch die Interaktion von PKC $\alpha$  mit DAG die Abklingzeit des FRET-Signals vergrößert wird. Das Verhältnis von  $\tau_{\text{FRET}}$  zu  $\tau_{\text{Ca}^{2+}}$  liegt bei wild-type PKC $\alpha$  bei etwa 1.9. Wird nun die Interaktion des Proteins mit DAG blockiert, führt dies zu einer Annäherung des Abklingverhalten von FRET- und Ca<sup>2+</sup>-Signal, wobei jedoch ein signifikanter Unterschied in den charakteristischen Abklingzeiten bestehen bleibt. Das Verhältnis von  $\tau_{\text{FRET}}$  zu  $\tau_{\text{Ca}^{2+}}$  ist nun etwa 1.4. Da die Lebenszeit von PKC $\alpha^{R77A}$  alleine durch die nur sehr kurzzeitige Membraninteraktion mittels C2-Domäne ( $\approx 60\text{ms}$ ) erfolgt, liefern die experimentellen Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass es einen weiteren Mechanismus gibt, der die Interaktion des Proteins mit der Membran stabilisiert. Aufgrund des gemessenen FRET-Signals wäre ein naheliegender Mechanismus die intermolekulare Wechselwirkung membrangebundener PKC $\alpha$  Moleküle.

Um dieser Vermutung weiter nachzugehen, untersuchen wir die Dynamik von PKC $\alpha$  mit Hilfe von Simulationen, bei denen die globale Ca<sup>2+</sup> Konzentration, äquivalent zu den experimentellen Daten, oszilliert. Wir verwenden hierzu die experimentellen Verläufe der Ca<sup>2+</sup>-Signale. Als Parametersatz verwenden wir den Parametersatz, der die Membraninteraktion von PKC $\alpha$  ohne DAG beschreibt. Um die Wirkung der PKC $\alpha$ -PKC $\alpha$ -Wechselwirkung auf das Abklingverhalten des FRET-Signals zu analysieren, vergleichen wir die charakteristischen Abklingzeiten in Simulationen mit und ohne intermolekularer Wechselwirkung. In Abbildung 44 sind die Ergebnisse der theoretischen Untersuchungen dargestellt.

Unter Berücksichtigung der intermolekularen Wechselwirkung, führt die Oszillation des Ca<sup>2+</sup>-Signals zu einer Oszillation der Zahl der membrangebundenen Proteine und zeitgleich zu einer Oszillation des FRET-Signals, siehe Abbildung 44A. Wie in den experimentellen Daten, liegen die lokalen Maxima der FRET- und Fluoreszenz-

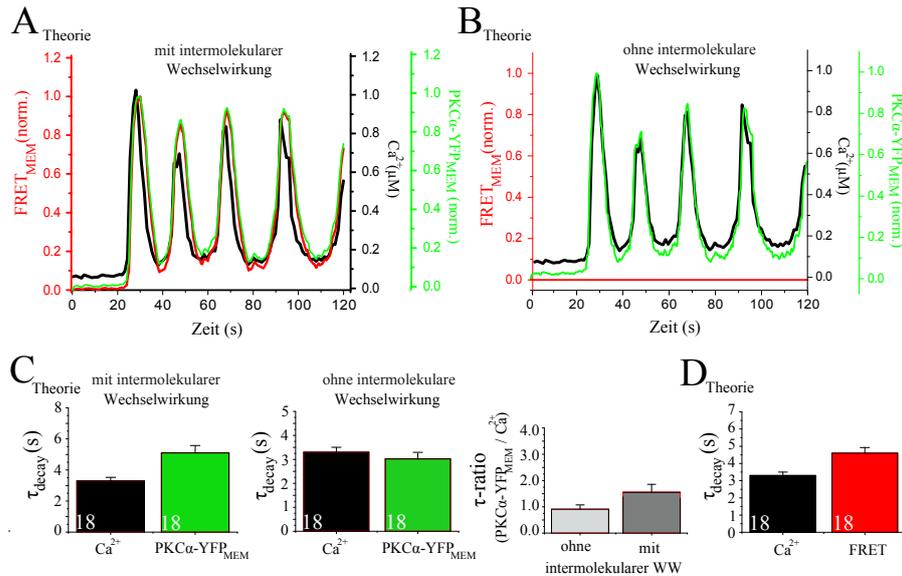


Abbildung 44: **Durch Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen hervorgerufene Oszillationen des FRET-Signals in den Simulationen.** Zeitlicher Verlauf der globalen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (schwarz), der Teilchenzahl von membrangebundenem PKC $\alpha$ -YFP (grün) und des FRET-Signals (rot) für Simulationen mit (A) und ohne (B) intermolekularer Wechselwirkung membrangebundener PKC $\alpha$ -Moleküle. Der zeitliche Verlauf des Ca<sup>2+</sup>-Signals entstammt aus den Experimenten. C) Statistische Analyse der charakteristischen Abklingzeiten des Ca<sup>2+</sup>- und FRET-Signals. D) Statistische Analyse der charakteristischen Abklingzeiten des Ca<sup>2+</sup>- und PKC $\alpha$ -YFP-Signals. Die Fehlerbalken in (C) und (D) stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. Zur statistischen Analyse in (C) und (D) wurden 18 Abklingverläufe analysiert. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 2 (ohne DAG) angegeben.

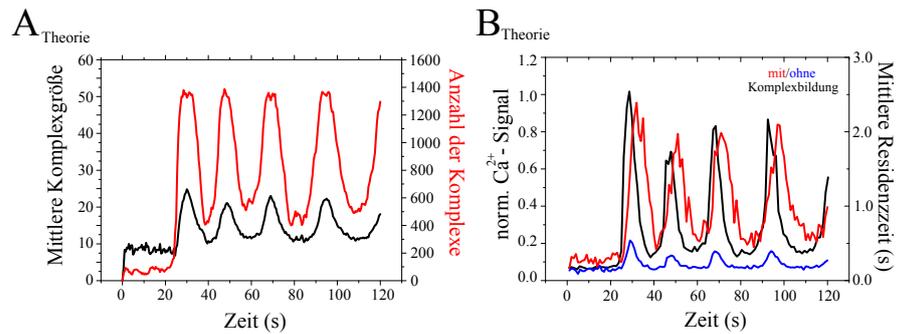


Abbildung 45: **Analyse der Komplexbildung und mittlere Lebenszeit von membrangebundenem PKC $\alpha$ .** A) Mittlere Komplexgröße (schwarz) und Anzahl an PKC $\alpha$ -Komplexen (rot) als Funktion der Zeit für die in Abbildung 44A dargestellte Ca $^{2+}$ -Dynamik. B) Zeitlicher Verlauf der mittlere Verweildauer von PKC $\alpha$  auf der Membran. Die rote Kurve zeigt den Verlauf mit, die blaue Kurve ohne intermolekulare Wechselwirkung. Die schwarze Kurve stellt den zeitlichen Verlauf des Ca $^{2+}$ -Signals dar. Die zeitliche Mittelung der Residenzzeiten erfolgte in Intervallen der Länge 1s. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 2 (ohne DAG) angegeben.

kurve zeitlich leicht versetzt hinter den entsprechenden Maxima der Ca $^{2+}$ -Kurve. Abbildung 44B zeigt die entsprechenden Verläufe aus Simulationen ohne intermolekulare Wechselwirkung. Da die Proteine in diesen Simulationen keine Komplexe bilden können, ist ihre Lebensdauer auf der Membran nur sehr kurz. Dies hat zur Folge, dass das FRET-Signal konstant Null ist und die Ca $^{2+}$ - und Fluoreszenzkurve in den Spitzen nahezu deckungsgleich sind.

Der Grund für die leicht verzögerte Abnahme des FRET-Signals, liegt in der Bildung der PKC $\alpha$ -Komplexe, deren Größe und Anzahl zeitlich mit dem Ca $^{2+}$ -Signal oszillieren, siehe Abbildung 45A. Die Komplexe stabilisieren die Bindung der Proteine auf der Membran, wodurch sich deren Residenzzeit deutlich erhöht, siehe rote Kurve in Abbildung 45B. Damit bleiben die Proteine selbst nachdem die globale Ca $^{2+}$ -Konzentration abgesunken ist, kurzzeitig membrangebunden, was sich in der verzögerten Abnahme der Residenzzeit zeigt, vgl. schwarze und rote Kurve in Abbildung 45B. Fehlt die stabilisierende Wirkung der intermolekularen Wechselwirkung, so ist die Verweildauer der Proteine nur sehr kurz und einer Abnahme der globalen Ca $^{2+}$ -Konzentration folgt eine unverzögerte Abnahme der Lebenszeit, vgl. schwarze und blaue Kurve in Abbildung 45B. D.h. die Dauer des Ca $^{2+}$ -Signals bestimmt maßgeblich die Dauer der PKC $\alpha$ -Translokation. Ein Vergleich der charakteristischen Abklingzeiten  $\tau$  der beiden Signale macht dies deutlich, siehe Abbildung 44C. Während deren Verhältnis für Simulationen mit intermolekularer Wechselwirkung etwa 1.5 ist, ist es im Fall ohne Wechselwirkung etwa 1. Das Verhältnis der charakteristischen Abklingzeiten  $\tau_{\text{FRET}}/\tau_{\text{Ca}^{2+}}$  ist

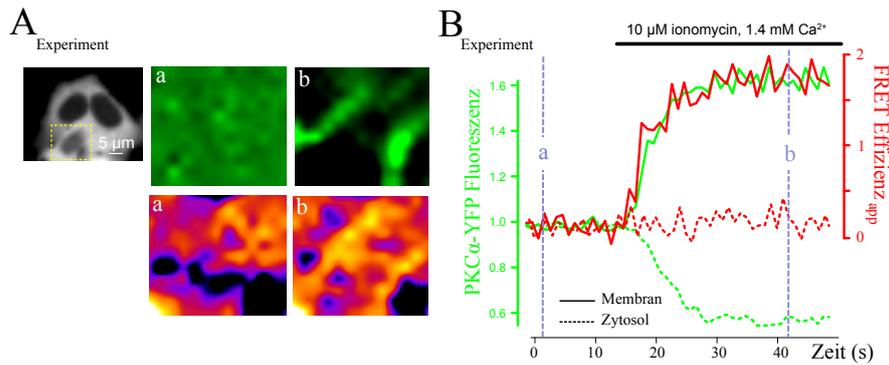


Abbildung 46: **Räumliche Verteilung des Fluoreszenz- und des FRET-Signals vor und nach der Ca<sup>2+</sup> - induzierten Translokation von PKC $\alpha$ .** A) Obere Zeile: DIC-Aufnahme der untersuchten Zelle gefolgt von der Verteilung von PKC $\alpha$ -YFP in der gelb umrandeten Region vor (a) und nach (b) der Stimulation mit 10 μM Ionomycin. Unterer Zeile: Entsprechende räumliche Verteilung des errechneten FRET-Signals. B) Räumlich gemittelte Fluoreszenz (grün) - und FRET (rot) - Signal im gelb umrandeten Gebiet in (A) als Funktion der Zeit. Die gestrichelten Linien zeigen den zeitlichen Verlauf der Signale im Zytoplasma, während die durchgezogenen Linien die zeitlichen Verläufe an der Membran darstellen. Die Markierungen (a) und (b) kennzeichnen die Zeiten der Aufnahmen in (A).

in den Simulationen etwa 1.4 und liegt somit in guter Übereinstimmung mit dem experimentellen Wert, der ebenfalls bei etwa 1.4 liegt. Hierzu wurden das Verhältnis der mittleren Abklingzeiten aus Abbildung 44D mit dem entsprechenden Verhältnis der mittleren Abklingzeiten des PKC $\alpha$ -Mutanten PKC $\alpha$ <sup>R77A</sup> in Abbildung 43C verglichen.

Um die Freisetzung von DAG zu verhindern und damit dessen Beeinflussung auf die Membraninteraktion von PKC $\alpha$  auszuschalten, untersuchen wir im Folgenden die Dynamik von PKC $\alpha$  in HEK-Zellen, die in eine Ca<sup>2+</sup>-Lösung eingetaucht werden und mit 10 μM Ionomycin behandelt werden. Die Höhe der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration innerhalb der Zelle regulieren wir über die Konzentration der Ca<sup>2+</sup>-Ionen in der Lösung. Im Gegensatz zu Ca<sup>2+</sup>-Signalen, die durch die Stimulation der Zelle mit ATP entstehen, kann die zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in den mit Ionomycin behandelten Zellen über lange Zeiten hinweg nahezu konstant gehalten werden. Abbildung 46A zeigt die räumliche Verteilung der Fluoreszenz und der FRET-Effizienz von PKC $\alpha$ -YFP in einer HEK-Zelle, die sich in einer 1.4 mM Ca<sup>2+</sup>-Lösung befindet, vor (a) und nach (b) der Behandlung mit 10 μM Ionomycin. Während vor der Zugabe des Ionophors die Fluoreszenz nahezu gleichverteilt ist, kommt es nach der Zugabe zu einer Verdichtung der Fluoreszenz in bestimmten Zellregionen. Gleichsam kommt es in diesen Regionen zu einer Erhöhung der FRET-Effizienz. In Abbildung 46B ist die Fluoreszenz und die FRET-Effizienz als Funktion

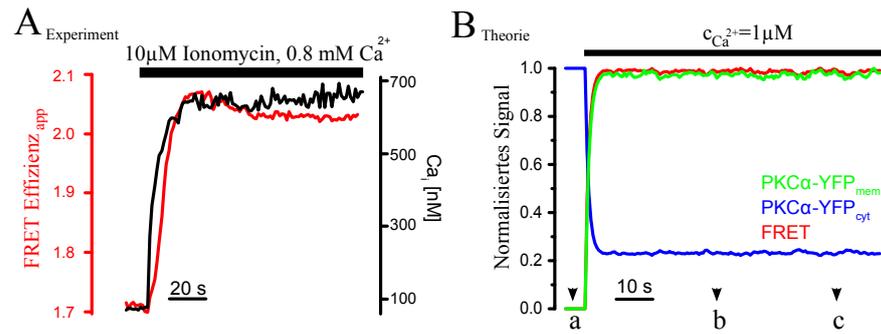


Abbildung 47: **Zeitlicher Verlauf des FRET-Signals bei geringem zytosolischem  $Ca^{2+}$ -Level.** A) Zeitlicher Verlauf der intrinsischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration (schwarze Kurve) und des FRET-Signals (rote Kurve) von PKC $\alpha$  in einer lebenden HEK Zelle. Die Zelle befindet sich in einer  $0.8\mu M$   $Ca^{2+}$ -Lösung und wird nach 10s mit  $10\mu M$  Ionomycin stimuliert. B) Zeitlicher Verlauf der YFP-markierten PKC $\alpha$  Moleküle und des FRET-Signals in den Simulationen. Sowohl im Experiment als auch in den Simulationen nimmt das FRET-Signal nach Zufuhr von  $Ca^{2+}$  zu, sättigt und bleibt nahezu konstant. Die zeitlichen Markierungen a, b und c in B) kennzeichnen die Zeiten in denen die Schnappschüsse in Abbildung 48 gemacht wurden. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 2 (ohne DAG) angegeben.

der Zeit aufgetragen. Die durchgezogenen Kurven kennzeichnen die Größen auf der Membran, die gestrichelten Kurven die entsprechenden Größen im Zytoplasma dar. Nach der Zugabe von Ionomycin nach etwa 15s, kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenz auf der Membran, während die Fluoreszenz im Zytoplasma in gleichem Maße abnimmt. Die FRET-Effizienz von membrangebundenem PKC $\alpha$  nimmt zeitgleich mit der Membranfluoreszenz zu, während sie im Zytoplasma über die gesamte Messung nahezu konstant bleibt.

Es zeigt sich, dass sich PKC $\alpha$  in denen mit Ionomycin behandelten Zellen qualitativ ähnlich verhält, wie in Zellen, die mit ATP stimuliert wurden: Ein Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt in beiden Fällen zu einer Translokation der Proteine zur Membran. Dort angekommen, kommt es zu einer Interaktion zwischen den Proteinen, was sich in einem Anstieg der FRET-Effizienz zeigt. Die experimentellen Daten zeigen, dass zur Bildung von PKC $\alpha$ -Komplexen kein DAG benötigt wird.

Um nun die Dynamik der Proteine auf der Plasmamembran in Abhängigkeit der globalen  $Ca^{2+}$ -Konzentration näher zu untersuchen, variieren wir die  $Ca^{2+}$ -Konzentration der Lösung und bestimmen das FRET-Signals als Funktion der Zeit. Wir starten unsere Untersuchungen mit einer Zelle, die sich in einer  $0.8\text{ mM } Ca^{2+}$ -Lösung befindet. Nach Zugabe von  $10\mu M$  Ionomycin, kommt es zu einem Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentration innerhalb der Zelle auf etwa  $0.7\mu M$ . Abbildung 47A zeigt die FRET-Effizienz und das intrinsische  $Ca^{2+}$ -Signal

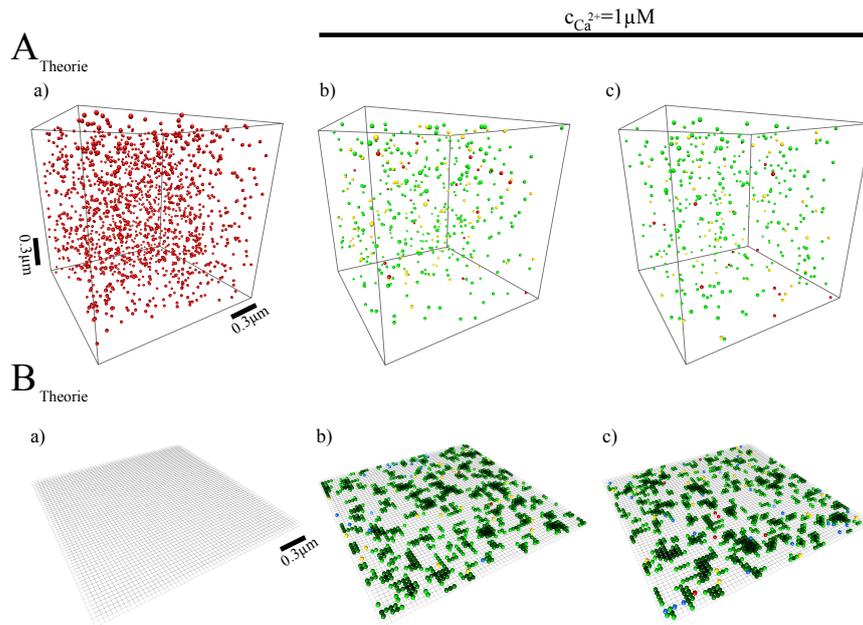


Abbildung 48: **Schnappschüsse aus den Simulationen bei geringem zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$ -Level.** A) Verteilung der Proteine im Zytoplasma vor (a) und nach (b,c) der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ . B) Entsprechende Verteilung der Proteine auf der Membran. Die Aufnahmezeiten der Schnappschüsse sind in Abbildung 47B gekennzeichnet. Farbcode:  $\text{Ca}^{2+}$ -loses PKC $\alpha$  (rot), einfach  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenes PKC $\alpha$  (gelb), zweifach  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenes PKC $\alpha$  (grün), PKC $\alpha$  in komplexzerstörender Konformation (blau, unabhängig der Anzahl der gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen). Je dunkler der Grünton der Proteine im Komplex, desto geringer ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ablöserate. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 2 (ohne DAG) angegeben.

als Funktion der Zeit. Die intrinsische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Zelle nimmt unmittelbar nach Zugabe von Ionomycin zu und geht in Sättigung. Nahezu zeitgleich mit der Zunahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nimmt auch die FRET-Effizienz zu, fällt jedoch nach dem Erreichen ihres Maximums leicht ab, stabilisiert sich und bleibt konstant.

Abbildung 47B zeigt die zeitlichen Verläufe der Fluoreszenzen und der FRET-Effizienz in den Simulationen. Die intrinsische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $c_{\text{Ca}^{2+}}$  ist  $1\mu\text{M}$  und entspricht somit in etwa der maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Experiment. Nach dem Einschalten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nimmt die Dichte von membrangebundenem PKC $\alpha$  unmittelbar zu und geht in Sättigung. Zeitgleich nimmt die Dichte an zytosolischem PKC $\alpha$  ab. Das FRET-Signal nimmt ebenfalls zu und sättigt. Abbildung 48 zeigt die räumliche Verteilung der Moleküle im Zytoplasma und auf der Membran. Vor dem Einschalten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals befinden sich alle PKC $\alpha$  Moleküle in zytosolischer Konfiguration. Nach dem Einschalten binden die Proteine und bilden Komplexe. Dies führt zu einer Zunahme der Dichte von membrangebun-

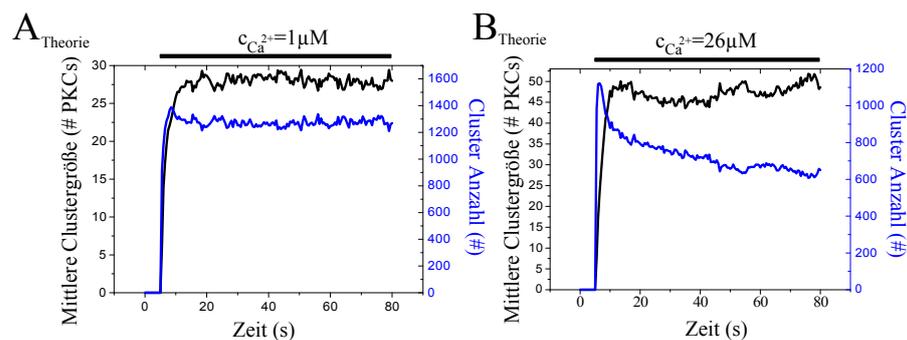


Abbildung 49: **Zeitliche Entwicklung der mittleren Größe und der Anzahl der PKC $\alpha$ -Komplexe in den Simulationen.** A) Mittlere Komplexgröße und Anzahl der PKC $\alpha$ -Komplexe als Funktion der Zeit für geringe Ca $^{2+}$ -Konzentrationen. Die mittlere Komplexgröße und die Anzahl an PKC $\alpha$ -Komplexen bleibt nach Erhöhung der globalen Ca $^{2+}$ -Konzentration auf  $1\mu\text{M}$  weitestgehend konstant. B) Mittlere Komplexgröße und Anzahl der PKC $\alpha$  Komplexe als Funktion der Zeit für eine Ca $^{2+}$ -Konzentration von  $26\mu\text{M}$ . Sowohl die mittlere Komplexgröße als auch die Anzahl der Komplexe nehmen nach Erreichen ihres Maximums unmittelbar nach der Zugabe von Ca $^{2+}$  mit wachsender Zeit ab und erreichen nach etwa 40s ihren stationären Wert. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 2 (ohne DAG) angegeben.

denem PKC $\alpha$ , der Abnahme der zytosolischen Dichte und zu einem Anstieg des FRET-Signals. Als Folge der Umwandlungsdynamik und des spontanen Ablösens der Proteine lösen sich die Komplexe auf und die so freiwerdenden Moleküle gehen in Lösung. Im Zytoplasma angekommen binden sie erneut an die Membran und bilden neue Komplexe. Dadurch bildet sich ein Gleichgewicht zwischen dem Auflösen und dem Bilden von Komplexen, wodurch deren mittlere Größe und Anzahl zeitlich konstant bleiben, siehe Abbildung 49A. Da das FRET-Signal durch die Proteine in den Komplexen bestimmt wird, bleibt es konstant. Abbildung 50A zeigt die Fluoreszenz und die FRET-Effizienz als Funktion der Zeit für eine Zelle mit einer intrazellulären Ca $^{2+}$ -Konzentration von etwa  $3,5\mu\text{M}$ . Abbildung 50B zeigt die Abnahme des FRET-Signals bei einer maximalen Ca $^{2+}$ -Konzentration von etwa  $20\mu\text{M}$ . Während die zeitlichen Verläufe der Fluoreszenz nach Erreichen der Sättigung konstant bleiben, nimmt die FRET-Effizienz auf circa 50% ihres Maximalwertes ab, stabilisiert sich und bleibt danach konstant. Würde das FRET-Signal dadurch induziert werden, dass sich membrangebundene PKC $\alpha$  Moleküle als Folge der Überfüllung der Membran sehr Nahe kämen, wäre es ebenfalls konstant. Die Abnahme liefert damit einen weiteren wichtigen Hinweis für die Interaktion der Moleküle. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass das FRET-Signal bei Konstanz aller weiteren Signale abnimmt, wodurch die Abnahme weder durch eine Änderung der globalen

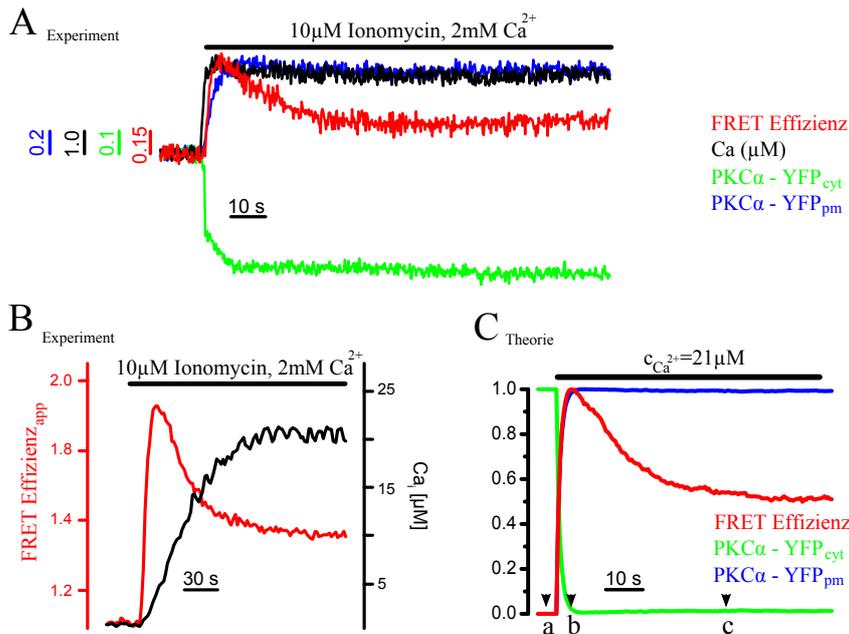


Abbildung 50: **Zeitlicher Verlauf des FRET-Signals bei hohem zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$ -Level.** A) Fluoreszenz-Signale von PKC $\alpha$ -YFP im Zytoplasma (grün) und der Membran (blau) als Funktion der Zeit, sowie der zeitliche Verlauf der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (schwarz) und des FRET-Effizienz (rot) von PKC $\alpha$ . Die Zelle befindet sich in einer  $1.4\text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung und wird nach  $10\text{ s}$  mit  $10\mu\text{M}$  Ionomycin stimuliert. B) Zeitlicher Verlauf der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und des FRET-Signals als Funktion der Zeit. Die Zelle befindet sich in einer Lösung mit  $2\text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  und wird nach  $30\text{ s}$  mit  $10\mu\text{M}$  stimuliert. C) Entsprechende zeitliche Verläufe der Fluoreszenzen und des FRET-Signals aus den Simulationen. Die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration wird  $5\text{ s}$  nach Beginn der Simulation von anfänglich  $0\mu\text{M}$  auf  $21\mu\text{M}$  erhöht. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 2 (ohne DAG) angegeben.

$\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, noch durch eine Änderungen der zytosolischen und membrangebundenen Dichten induziert wird, sondern die Folge der Konformationsänderung membrangebundener PKC $\alpha$ -Moleküle ist.

Um nun zu überprüfen, ob die Abnahme des FRET-Signals auch in den Simulationen stattfindet, erhöhen wir die globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von anfänglich  $1\mu\text{M}$  auf  $21\mu\text{M}$ . Abbildung 50C zeigt den zeitlichen Verlauf des FRET-Signals und der Teilchenzahlen der zytosolischen und membrangebundenen Moleküle. Nach Einschalten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nimmt die Teilchenzahl im Zytoplasma ab und die auf der Membran zu. Das FRET-Signal nimmt hingegen nach Erreichen seines Maximalwerts um etwa  $50\%$  ab, stabilisiert sich und bleibt danach konstant. Abbildung 51 zeigt Schnappschüsse aus den Simulationen zu unterschiedlichen Zeiten, welche in Abbildung 50C mar-

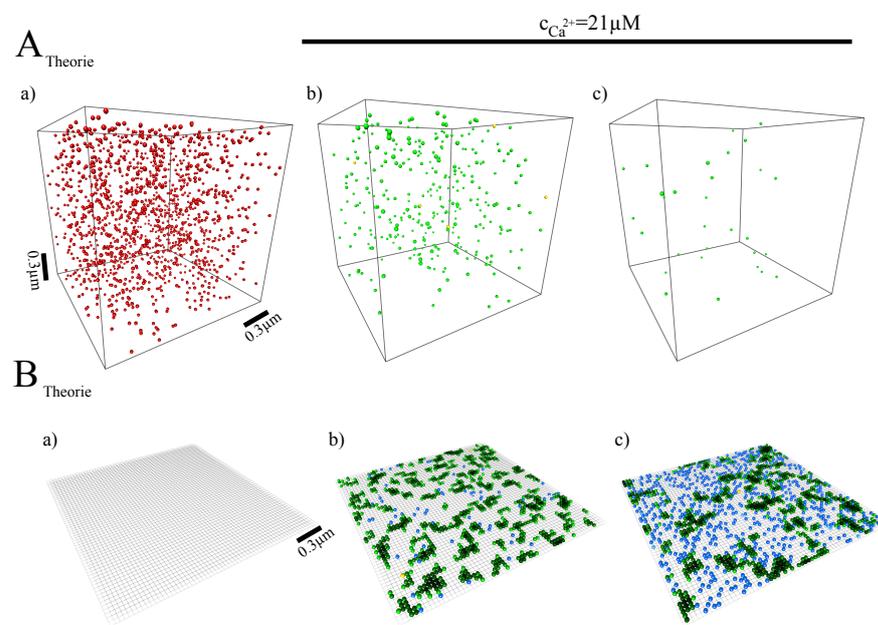


Abbildung 51: **Schnappschüsse aus den Simulationen mit hohem zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$ -Level.** A) Verteilung der Proteine im Zytoplasma vor (a) und nach (b,c) der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ . B) Entsprechende Verteilung der Proteine auf der Membran. Unmittelbar nach dem Einschalten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals befindet sich ein großer Teil der Proteine in Komplexen (grün). Im Verlauf ändern die Proteine ihren Zustand (blau) womit sie membrangebunden bleiben können, jedoch keine Komplexe mehr bilden können. Dies führt zu einer Reduzierung des FRET-Signals ohne eine Abnahme der membrangebundenen PKC $\alpha$  Moleküle. Die Aufnahmezeiten der Schnappschüsse sind in Abbildung 50C gekennzeichnet. Farbcode:  $\text{Ca}^{2+}$ -loses PKC $\alpha$  (rot), einfach  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenes PKC $\alpha$  (gelb), zweifach  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenes PKC $\alpha$  (grün), PKC $\alpha$  in komplexzerstörender Konformation (blau, unabhängig der Anzahl der gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen). Je dunkler der Grünton der Proteine im Komplex, desto geringer ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ablöserate. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 2 (ohne DAG) angegeben.

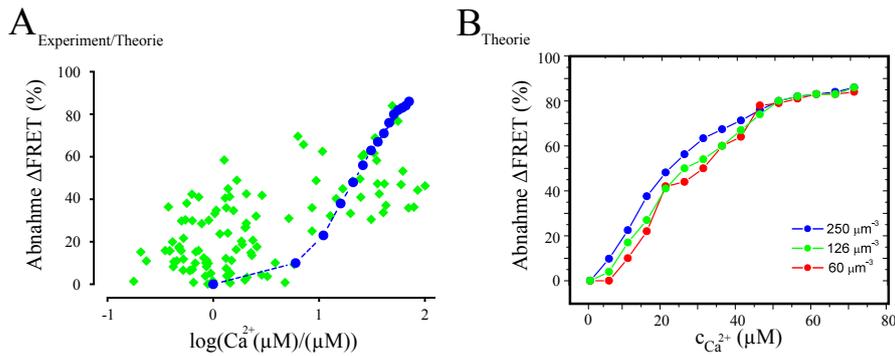


Abbildung 52: **Abfall des FRET-Signals als Funktion der inneren Ca<sup>2+</sup>-Konzentration.** A) Prozentuale Abnahme der FRET-Effizienz als Funktion der inneren Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in lebenden HEK Zellen (grün). Die blaue Kurve zeigt die Abnahme des FRET-Signals in den Simulationen. Der Korrelationskoeffizient von Pearson ist  $\rho = 0.66$ . Die Gesamtkonzentration in den Simulationen entspricht  $250\mu\text{m}^{-3}$ . B) Prozentuale Abnahme des FRET-Signals als Funktion der inneren Ca<sup>2+</sup>-Konzentration aus den Simulationen für drei verschiedene Gesamtkonzentrationen von PKC $\alpha$ . Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 2 (ohne DAG) angegeben.

kiert sind. Vor dem Einschalten des Ca<sup>2+</sup>-Signals befinden sich alle Proteine im Zytoplasma, die Membran ist leer. Nach dem Einschalten translozieren die Proteine an die Membran, binden und bilden Komplexe. Dies führt zu einem Anstieg des FRET-Signals. Es kommt nun zu spontanen Zustandsänderungen einzelner Proteine in die komplexerstörende Konformation, was zu lawinenartigen Zustandsänderungen der Proteine in den Komplexen führt. Da die Proteine in diesem Zustand nicht in der Lage sind, mit Proteinen zu interagieren, lösen sich die Komplexe auf. Während bei geringen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen, die aus den Komplexen freiwerdenden Proteine unmittelbar Ca<sup>2+</sup> freisetzen und sich von der Membran lösen, binden bei hohen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen stets neue Ca<sup>2+</sup>-Ionen an die Moleküle was die Verweildauer der Proteine auf der Membran verlängert. Um neue Komplexe bilden zu können, müssen die Proteine die Membran verlassen, da sie nur in zytosolischer Konfiguration ihre Konformation ändern können. Je höher nun die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ist, desto weniger Proteinen gelingt dies, was zu einer Abnahme der Anzahl von Proteinen in den Komplexen führt, siehe Abbildung 49B und somit auch zu einer Abnahme des FRET-Signals. Abbildung 52 zeigt die Abnahme des FRET-Signals  $\Delta\text{FRET}$  als Funktion der inneren Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Sowohl in den Experimenten als auch in den Simulationen führt eine Zunahme der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zu einer stärkeren Abnahme des FRET-Signals. Für sehr hohe Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen bleiben faktisch alle Proteine im membrangebundenen Zustand, nachdem sich als Folge der Umwandlungsdynamik, die Komplexe aufge-

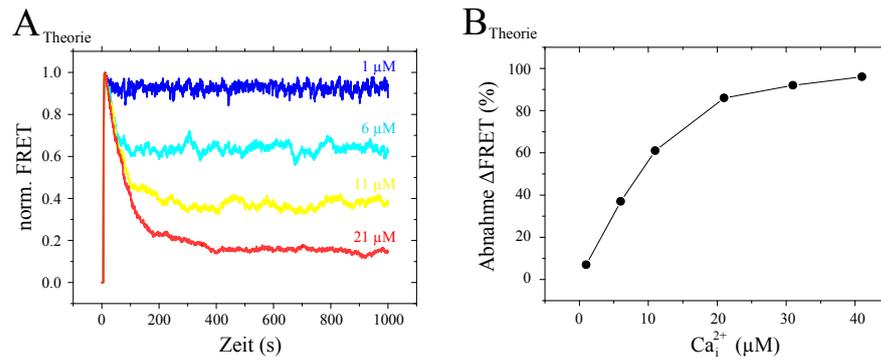


Abbildung 53: **FRET-Signal in Simulationen mit DAG.** A) FRET-Signal membranboundener PKC $\alpha$  Moleküle als Funktion der Zeit für vier unterschiedliche Konzentrationen von globalem  $Ca^{2+}$ . B) Prozentuale Abnahme des FRET-Signals als Funktion der globalen  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Die globale PKC $\alpha$ -Konzentration ist  $250\mu m^{-3}$ . Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 2 (mit DAG) angegeben.

löst haben. Eine weitere Zunahme der  $Ca^{2+}$ -Konzentration hat somit keine weitere Auswirkung auf die Abnahme des FRET-Signals. Dies zeigt sich im Sättigungsverhalten der theoretischen FRET-Kurven für hohe  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen.

Um den Einfluss von DAG auf den zeitlichen Verlauf des FRET-Signals zu untersuchen, verwenden wir für die folgenden Simulationen den Parametersatz, der die Interaktion des Proteins mit DAG berücksichtigt, siehe Tabelle 2. In Abbildung 53A ist der zeitliche Verlauf des FRET-Signals für unterschiedlich starke  $Ca^{2+}$  dargestellt. Wie in den Simulationen ohne DAG, nimmt nach dem Erreichen des Maximums die Stärke des FRET-Signals ab, stabilisiert sich und bleibt danach konstant. Je höher die globale  $Ca^{2+}$ -Konzentration ist, desto geringer ist das finale FRET-Signal. Aufgrund der Stabilisierung der Komplexe durch DAG, ist die Abklingzeit des Signals tendenziell größer als in den Simulationen ohne DAG. Abbildung 53B zeigt die prozentuale Abnahme des FRET-Signals als Funktion der globalen  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Das Sättigungsverhalten mit wachsender  $Ca^{2+}$ -Konzentration tritt in den Simulationen mit DAG früher ein als in den Simulationen ohne DAG. Der Grund dafür ist die Stabilisierung der Membraninteraktion der Proteine durch DAG. Durch diese Stabilisierung sind schon geringere Konzentrationen von globalem  $Ca^{2+}$  ausreichend um die Proteine an der Membran zu verankern. Da das Ablösen, das Neubinden und das Bilden neuer Komplexe damit seltener stattfindet, führt eine Zunahme der  $Ca^{2+}$ -Konzentration, verglichen mit den Simulationen ohne DAG, zu einem stärkeren Anstieg und einer schnelleren Sättigung.

PKC $\alpha$ :ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde mit Hilfe von experimentellen und theoretischen Methoden untersucht, ob PKC $\alpha$ -Moleküle im membrangebundenen Zustand Komplexe bilden und durch die intermolekulare Interaktion im Komplex ihre Bindung zur Plasmamembran stabilisieren.

Die Membraninteraktion von PKC $\alpha$  erfolgt über zwei Domänen des Proteins. Mittels C2-Domäne bindet PKC $\alpha$ , Ca<sup>2+</sup>-abhängig an die Phosphatidylserine (PS) der Membran und mittels C1-Domäne interagiert es mit dem sekundären Botenstoff DAG. Nur solange PKC $\alpha$  sowohl Ca<sup>2+</sup> als auch DAG gebunden ist, ist es aktiv und kann Zielproteine phosphorylieren. Die Lebenszeit des Ca<sup>2+</sup>-besetzten Zustandes der C2-Domäne ist mit  $\approx 65 \text{ ms}$  jedoch sehr kurz [84, 85, 7], wenn man berücksichtigt, dass nachdem der Ca<sup>2+</sup>-PKC $\alpha$ -Komplex an die Membran gebunden hat, das Protein erst DAG und danach ein Zieprotein finden muss. Die maximale Phosphorylierungsrate von PKC $\alpha$  wurde in *in vitro* Experimenten zu etwa 6 Phosphorylierungen pro Sekunde bestimmt [86, 87, 7]. Es stellt sich somit die Frage, ob es einen weiteren Mechanismus gibt, mit dem PKC $\alpha$ -Moleküle die Lebenszeit des Ca<sup>2+</sup>-C2-PS-Komplexes als limitierenden Faktor ihrer Aktivierung vergrößern.

Zur experimentellen Untersuchung dieser Fragestellung wurden HEK-Zellen verwendet, die YFP- und CFP-markierte PKC $\alpha$ -Moleküle simultan exprimieren. Zur Charakterisierung der Proteindynamik wurden die Fluoreszenzintensität von PKC $\alpha$  in der Membran und im Zytoplasma, sowie der Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) als Funktion der Zeit bestimmt. Zur Analyse der experimentellen Daten, wurde eine teilchenbasierende stochastische Simulation verwendet. Die zentralen molekularen Mechanismen, die in den Simulationen berücksichtigt wurden, sind die allosterische Regulation des Proteins durch Ca<sup>2+</sup> und die intermolekulare Wechselwirkung der Moleküle auf der Membran. Die intermolekulare Wechselwirkung führt zur Bildung von Molekülkomplexen, die die Bindung zwischen Ca<sup>2+</sup> und membrangebundenem PKC $\alpha$  stabilisieren. Konformationsänderungen können sich aufgrund der Molekülwechselwirkung innerhalb des Komplexes ausbreiten und führen zu dessen Destabilisierung.

## 10.1 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

- Die intermolekulare Wechselwirkung membrangebundener PKC $\alpha$  Molekülen stellt einen möglichen Mechanismus dar, die Bildung, die Stabilisierung und das rapide Ablösen langlebiger PKC $\alpha$ -Clustern zu erklären. Unsere theoretische Beschreibung kann die Phänomenologie der uns bekannten lokalen PKC $\alpha$  Akkumulationen in ihrer Gesamtheit reproduzieren.
- Die Analyse der Residenzzeit von PKC $\alpha$ -Molekülen auf der Membran, nach Stimulation der Zelle mit ATP, lässt auf drei Mechanismen schließen, die die Lebenszeit des Proteins auf der Membran bestimmen. Neben der schon bekannten Ca<sup>2+</sup>- unabhängige Membraninteraktion via C1-Domäne und der Ca<sup>2+</sup>- abhängigen mittels C2-Domäne, lassen sowohl die experimentellen als auch die theoretischen Untersuchungen auf einen dritten Mechanismus schließen, der sich in einer direkten PKC $\alpha$ -PKC $\alpha$ -Wechselwirkung zeigt.
- Wir konnten zeigen, dass die Bindung zwischen Ca<sup>2+</sup> und membrangebundenem PKC $\alpha$ , voraussichtlich durch die direkte PKC $\alpha$ -PKC $\alpha$ -Wechselwirkung stabilisiert wird.
- Durch Umgehen der DAG-Freisetzung, konnten wir zeigen, dass die Bildung von PKC $\alpha$ -Komplexen, ein rein Ca<sup>2+</sup>- getriebener Prozess ist. Für die Bildung von PKC $\alpha$ - Komplexen benötigt es keine Bindung der C1a- Domäne zu DAG. Die Bindung des Proteins zu DAG wirkt lediglich stabilisierend und erhöht damit die Lebenszeit der Komplexe.
- Die Kombination von theoretischen und experimentellen Untersuchungen konnte zeigen, dass die Bildung von PKC $\alpha$ - Komplexen, einen möglichen Mechanismus darstellt, den lokalen Charakter von elementaren Ca<sup>2+</sup>-Signalen sowohl zeitlich als auch räumlich zu konservieren.

## 10.2 AUSBLICK

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Dynamik von PKC $\alpha$  untersucht. Wie wir in unseren Analysen gesehen haben, spielen die Domänen des Proteins, eine wesentliche Rolle in der Bildung und den Eigenschaften der PKC $\alpha$ -Komplexe. Aufgrund ihrer Eigenschaft mit den sekundären Botenstoffen Ca<sup>2+</sup> und DAG zu interagieren, sind diese Domänen jedoch Bestandteil einer Vielzahl weiterer Signalmoleküle. Ob sich unsere Ergebnisse auf andere Proteine der Protein-

kinase C Familie bzw. auf weitere Proteine mit ähnlicher Domänenstruktur übertragen lassen, stellt ein Untersuchungsfeld für zukünftige Arbeiten dar.

Um die Musterbildung von PKC $\alpha$  auf der Membran in *in vivo* besser zu verstehen, wird es wichtig sein, eine quantitative Beziehung zwischen Ca<sup>2+</sup>, DAG und PKC $\alpha$  herzustellen. Damit kämen wir von der qualitativen Beschreibung unseres Modells weg, hin zu einer quantitativen Beschreibung, mit dessen Hilfe wir zukünftige experimentelle Untersuchungen weiter optimieren können.

Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass ein möglicher Mechanismus zur Stabilisierung lokaler PKC $\alpha$ -Cluster die Interaktion der Proteine mit dem sekundären Botenstoff DAG ist. Um dies näher zu untersuchen, ist ein entscheidender Schritt die kontrollierte Erzeugung lokaler PKC $\alpha$ -Komplexe in lebenden Zellen bzw. in entsprechenden *in vitro* Systemen. Durch die gezielte Erzeugung der Komplexe in lebenden Zellen wäre es zusätzlich möglich die funktionalen Aspekte der Komplexbildung von Signalproteinen näher zu analysieren.



## BISTABILE PROTEINVERTEILUNGEN IN STÄBCHENFÖRMIGEN BAKTERIEN

---

Wie wir am Beispiel der Min-Proteine und der Proteinkinase PKC $\alpha$  sehen konnten, sind Proteine in der Lage durch Diffusions- und Reaktionsprozesse, räumliche Muster bzw. Strukturen zu bilden, die unmittelbar an die Funktion der Proteine gekoppelt sind. So bilden die Min-Proteine polare Akkumulationen, die von Zellpol zu Zellpol oszillieren und damit die Cytokinese auf die Zellmitte beschränken. Im Fall des Signalproteins PKC $\alpha$  bilden sich Protein-Komplexe auf der Plasmamembran, die die Membraninteraktion der einzelnen Proteine stabilisieren und damit für eine sichere Weiterleitung des Signals sorgen. Da bei der Bildung dieser räumlichen Muster bzw. Strukturen oft nur eine geringe Anzahl an Proteinen beteiligt sind, könnten sie durch molekulares Rauschen zerstört werden, wodurch das ordnungsgemäße Funktionieren von Zellen beeinträchtigt würde.

In einigen Fällen scheint molekulares Rauschen keinen großen Einfluss auf die Musterbildung zu haben. Zum Beispiel zeigen unsere theoretische Untersuchungen in Kapitel 4 und vorausgehende Untersuchungen der Min-Protein Dynamik *in vivo*, dass die physiologisch relevanten Muster der Min-Proteine, robust gegenüber molekularem Rauschen sind [53, 54, 56]. Ein weiteres Beispiel zeigen die Proteine SpooJ/Soj des Bakteriums *B.subtilis*. Diese schalten stochastisch zwischen den zwei Kernäquivalenten, ohne die Funktionsfähigkeit des Bakteriums zu beeinträchtigen [11, 12].

Der Einfluss von molekularem Rauschen auf bakterielle Prozesse wurde intensiv in den letzten Jahren untersucht [90]. In diesem Zusammenhang wurde die Aufmerksamkeit speziell auf bistabile Systeme gelenkt [91]. Räumlich ausgedehnte bistabile Systeme wurden hingegen weitestgehend vernachlässigt. Beispiele hierfür sind etwa das oben genannte SpooJ/Soj System [11, 12, 92], als auch das Min-System in *E.coli*. Wie wir in Abschnitt 4.4 sehen konnten, bilden die Min-Proteine in kurzen Zellen bei einem leicht erhöhten Expressionslevel, polare Akkumulationen, die stochastisch zwischen den beiden Zellhälften schalten.

In diesem Kapitel untersuchen wir die Stabilität räumlicher Muster in räumlich ausgedehnten Systemen. Dazu verwenden wir ein einfaches Reaktions-Diffusions-System, welches in der Lage ist, ähnlich dem Min-System in *E.coli*, polare Akkumulationen von Proteinen zu

bilden, die stochastisch zwischen den beiden Zellpolen schalten. Der zentrale Mechanismus dieses Modellsystems ist ähnlich dem in dieser Arbeit diskutierten Min-Systems, das kooperative Binden von Proteinen an die Membran. Der molekulare Ursprung des kooperativen Bindens ist weitgehend unverstanden, konnte jedoch zur Schaffung inhomogener Verteilungen in Untersuchungen zur SpooJ/Soj Dynamik [92] als auch der Dynamik des Min-Systems erfolgreich eingesetzt werden [28, 10].

Um die Stabilität der Muster unter dem Einfluss von molekularem Rauschen zu analysieren, untersuchen wir das Schalten der polaren Akkumulationen von Zellpol zu Zellpol im Grenzfall von schwachem Rauschen. Für das in dieser Arbeit untersuchte Reaktions-Diffusions-System lässt sich kein Potential definieren, mit dessen Hilfe sich das System vollständig beschreiben lässt. Damit kann auch die Ratentheorie von Kramers nicht angewendet werden. Stattdessen verwenden wir eine verallgemeinerte Kramers Theorie. Im biologischen Kontext wurde diese Theorie sowohl zur Untersuchung bistabiler genetischer Schalter verwendet [93, 94], als auch zur Analyse des bidirektionalen Transports von molekularen Motoren [95, 96].

Im nun folgenden Kapitel werden wir zu Beginn das zu untersuchende Modellsystem definieren, welches danach mit Hilfe stochastischer Simulationen untersucht wird. Um ein tieferes Verständnis für das System zu erhalten, werden wir einen Mean-Field-Ansatz durchführen und den Ansatz in [13] verfolgen, um die entsprechende Fokker-Planck Gleichung der relevanten Moden herzuleiten. Mit Hilfe der Wentzell-Freidlin Theorie werden wir die Fokker-Planck Gleichung lösen und entsprechend der Vorgehensweise in [14, 15] die Schaltzeiten in Abhängigkeit der Gesamtanzahl von Proteinen bestimmen.

## 11.1 STOCHASTISCHE DYNAMIK ZUR BILDUNG VON CLUSTERN AUF DER MEMBRAN

### 11.1.1 *Die chemische Mastergleichung*

Inspiziert durch die Dynamik des Min-Systems in Kapitel 3, entwickeln wir in diesem Abschnitt ein vereinfachtes Reaktions-Diffusions-System, welches in der Lage ist polare Cluster auf der Membran zu bilden. In diesem System existiert im Gegensatz zum Min-System nur eine Molekülart. Die Moleküle können zytosolisch, als auch im membrangebundenen Zustand vorliegen. Sie diffundieren in beiden Zuständen und unterliegen den folgenden Reaktionen, siehe Abbildung 54A. Zytosolische Moleküle können spontan an die Membran

binden (a), bevorzugen jedoch das Binden in Regionen, in denen Moleküle schon gebunden sind (b). Da wir in diesem System zur Vereinfachung, keinen Antagonisten berücksichtigen, die die Moleküle von der Membran ablösen, gehen wir von einem spontanen Ablösen der membrangebundenen Molekülen aus (c).

Zur weiteren Vereinfachung untersuchen wir die Dynamik unseres Systems in einer eindimensionalen Geometrie, die in ihrer Längsrichtung in Kompartimente der Länge  $l$  unterteilt ist, siehe Abbildung 54B. Die Kompartimentgröße  $l$  ist so gewählt, dass die Teilchen als gut durchmischt angesehen werden können. Mit der Wahl der Geometrie, beschränken wir unsere Aufmerksamkeit auf Verteilungen der Moleküle, welche rotationssymmetrisch bzgl. der Zylinderachse eines stäbchenförmigen Bakteriums sind. Die hier untersuchte eindimensionale Geometrie besitzt die Gesamtlänge  $L$  und beinhaltet  $\Omega$  Teilchen. An den Rändern der Geometrie werden No-Flux-Randbedingungen angewendet. Geht man davon aus, dass die Teilchendichte in einem stäbchenförmigen Bakterium homogen bzgl. dessen Längsachse ist und setzt man die gleiche Dichte in azimuthaler als auch longitudinaler Richtung voraus, so lässt sich eine Beziehung zwischen der Teilchenzahl  $\Omega$  in der eindimensionalen Geometrie und der Teilchenzahl  $N_{tot}$  der stäbchenförmigen dreidimensionalen Geometrie zu  $N_{tot} \approx (\Omega/L)^2 \pi d L$  herstellen. Für ein Bakterium mit einem Durchmesser  $d$  von  $0.5 \mu m$ , einer Gesamtlänge  $L$  von  $4 \mu m$  und einer Moleküldichte von  $2000 \mu m^{-3}$ , ergibt sich  $\Omega \approx 63$ . Im weiteren Verlauf werden  $\Omega$  und  $L$  in einer Simulation konstant gehalten. Die spontane Binderate von zytosolischen Proteinen an die Membran wird im Folgenden mit  $\omega_a$  bezeichnet. Die spontane Ablöserate von membrangebundenen Proteinen bezeichnen wir mit  $\omega_d$ . Die Rate für das kooperative Binden im Kompartiment  $i$  ist durch  $\omega_c n_{m,i}(n_{m,i} - 1)/(\Omega^2 \ell^2)$  gegeben. In diesem Ausdruck ist  $n_{m,i}$  die Anzahl an membrangebundenen Molekülen im Kompartiment  $i$ . Die entsprechende Anzahl an zytosolischen Molekülen im Kompartiment  $i$  bezeichnen wir mit  $n_{c,i}$ . Wir skalieren den Term für das kooperative Binden mit der Kompartimentgröße  $l$  und der Gesamtteilchenzahl  $\Omega$ , da wir später den Grenzübergang für große Molekülzahlen  $\Omega \rightarrow \infty$  und den Kontinuumsliches  $\ell \rightarrow 0$  durchführen werden. Anzumerken ist hier, dass wir zum Vergleich von Systemen gleicher Dichte bei unterschiedlichen Längen im Limes  $\Omega \rightarrow \infty$ , in den Abschnitt 11.2 und Abschnitt 11.3,  $\omega_c$  mit  $L^2$  skalieren werden. Die entsprechende

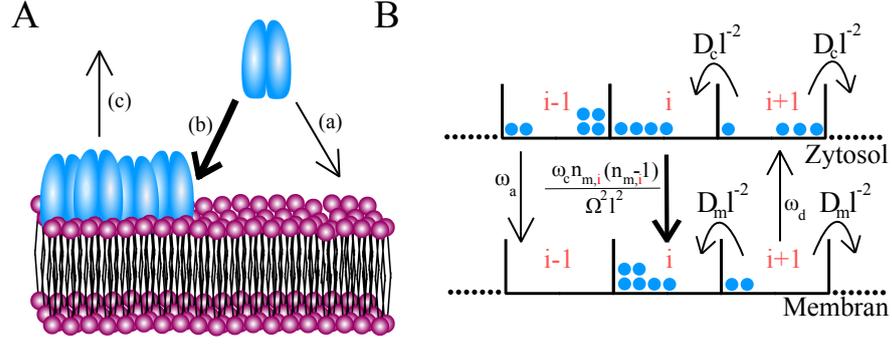


Abbildung 54: **Schematische Darstellung der molekularen Prozesse und der in den Simulationen verwendeten eindimensionalen Geometrie.** A) Schematische Darstellung der molekularen Prozesse der theoretischen Beschreibung. Dazu zählen das spontane und kooperative Binden zytosolischer Proteine an die Membran und das spontane Ablösen der Proteine von der Membran. B) Illustration der verwendeten eindimensionalen Geometrie. Die Geometrie ist in Kompartimente der Länge  $l$  unterteilt und setzt sich aus Membran und Zytoplasma zusammen. Die Moleküle können diffundieren, an die Membran binden und sich ablösen, wodurch sich die Teilchenzahl und somit auch die Konfiguration der entsprechenden Kompartimente ändert.

chemische Mastergleichung für die Entwicklung der Wahrscheinlichkeit  $P(\{n_{c,i}\}_{i=1,\dots,N}, \{n_{m,i}\}_{i=1,\dots,N}; t)$  lautet:

$$\begin{aligned}
\frac{dP}{dt} = & \omega_a \sum_i (\mathbb{E}_{c,i}^+ \mathbb{E}_{m,i}^- - 1) n_{c,i} P + \omega_d \sum_i (\mathbb{E}_{c,i}^- \mathbb{E}_{m,i}^+ - 1) n_{m,i} P \\
& + \frac{\omega_c}{\Omega^2 \ell^2} \sum_i (\mathbb{E}_{c,i}^+ \mathbb{E}_{m,i}^- - 1) n_{c,i} n_{m,i} (n_{m,i} - 1) P \\
& + \frac{D_c}{\ell^2} \sum_i \mathbb{E}_{c,i}^- \mathbb{E}_{c,i+1}^+ n_{c,i+1} P + \frac{D_c}{\ell^2} \sum_i \mathbb{E}_{c,i}^- \mathbb{E}_{c,i-1}^+ n_{c,i-1} P \quad (29) \\
& - 2 \frac{D_c}{\ell^2} \sum_i n_{c,i} P + \frac{D_m}{\ell^2} \sum_i \mathbb{E}_{m,i}^- \mathbb{E}_{m,i+1}^+ n_{m,i+1} P \\
& + \frac{D_m}{\ell^2} \sum_i \mathbb{E}_{m,i}^- \mathbb{E}_{m,i-1}^+ n_{m,i-1} P - 2 \frac{D_m}{\ell^2} \sum_i n_{m,i} P
\end{aligned}$$

In diesem Ausdruck steht  $\mathbb{E}_{c,i}^\pm$  für den Erzeugungs- bzw. Vernichtungsoperator eines Teilchens im Kompartiment  $i$ , so dass etwa  $\mathbb{E}_{c,i}^+ f(\{n_{c,j}\}_{j=1,\dots,N}, \{n_{m,j}\}_{j=1,\dots,N}) = f(\dots, n_{c,i} + 1, \dots, \{n_{m,j}\}_{j=1,\dots,N})$  gilt. Die entsprechenden Operatoren für die Kompartimente der Membran werden mit  $\mathbb{E}_{m,i}^\pm$  bezeichnet. Anzumerken ist hier, dass die Operatoren auf das gesamte Produkt wirken, welches rechts von ihnen steht.

### 11.1.2 Numerische Lösung der chemischen Mastergleichung

Wir lösen die chemische Mastergleichung numerisch mit Hilfe einer Kombination des Gillespie Algorithmus und der Next-Subvolume-Methode [97]. Die Gesamtkonfiguration des Systems zum Zeitpunkt  $t$  wird durch die Gesamtheit aller Konfigurationen der einzelnen Kompartimente zu diesem Zeitpunkt bestimmt, wobei die Konfiguration eines einzelnen Kompartiments durch die Teilchenzahlen der enthaltenen zytosolischen und membrangebundenen Molekülen definiert wird. Zum Lösen der chemischen Mastergleichung bestimmen wir nun in einem gegebenen Zustand des Systems, für jedes Kompartiment  $j$ , die Gesamtrate mit der sich die Teilchenzahl der gebundenen und ungebundenen Moleküle ändert. Danach berechnen wir mit Hilfe des Gillespie Algorithmus für jedes Kompartiment, die Zeit, in der das nächste Ereignis stattfinden wird. In dem Kompartiment  $j_{\min}$  mit der geringsten Wartezeit wird durch ziehen einer zweiten Zufallszahl die durchzuführende Reaktion bestimmt und ausgeführt. Danach werden die Gesamtraten in allen Kompartimente neu berechnet und somit die Konfiguration des gesamten Systems aktualisiert. Danach beginnen die Berechnungen von vorn.

In Abbildung 55 sind die Ergebnisse der stochastischen Simulationen für ein System der Länge  $L = 5.2\mu\text{m}$  dargestellt. Der Kymograph in Abbildung 55A zeigt, dass die Teilchen an den Rändern der Geometrie akkumulieren, was in einer stäbchenförmigen Geometrie der Bildung polarer Cluster entsprechen würde. Diese Akkumulationen schalten stochastisch von einer Zellhälfte zum gegenüberliegenden Zellhälfte. Dieses Verhalten entspricht dem Verhalten des Min-Systems in kleinen Zellen bei einem erhöhten Protein Expressions Level, siehe Abbildung 11. Die Verteilung der Schaltzeiten hat einen Mittelwert von  $\langle \tau \rangle = 4965\text{s}$  und ist mit einer Standardabweichung von  $\sigma_\tau = 5487\text{s}$  breit verteilt, siehe Abbildung 55C. Im Vergleich zu den Schaltzeiten der Min-Proteine sind die Schaltzeiten der Moleküle im vereinfachten System wesentlich höher. Gründe dafür sind das quadratische Eingehen der Teilchenzahl  $n_m$  in die Rate der kooperativen Wechselwirkung und das Fehlen eines Antagonisten, der das Ablösen der membrangebundenen Moleküle bewirkt.

In Abbildung 55B ist ein Vergleich der Proteinverteilung zwischen stochastischer und deterministischer Simulation dargestellt. Zum Bestimmen der stochastischen Proteinverteilung wird ein Zeitintervall gewählt in dem sich die Proteine konstant in einer Zellhälfte befinden. Über dieses Intervall wird zeitlich gemittelt. Das Profil der deterministischen Simulation wird durch das Lösen der dynamischen Gleichungen (41) und (42) bestimmt, die in Abschnitt 11.2.1 hergelei-

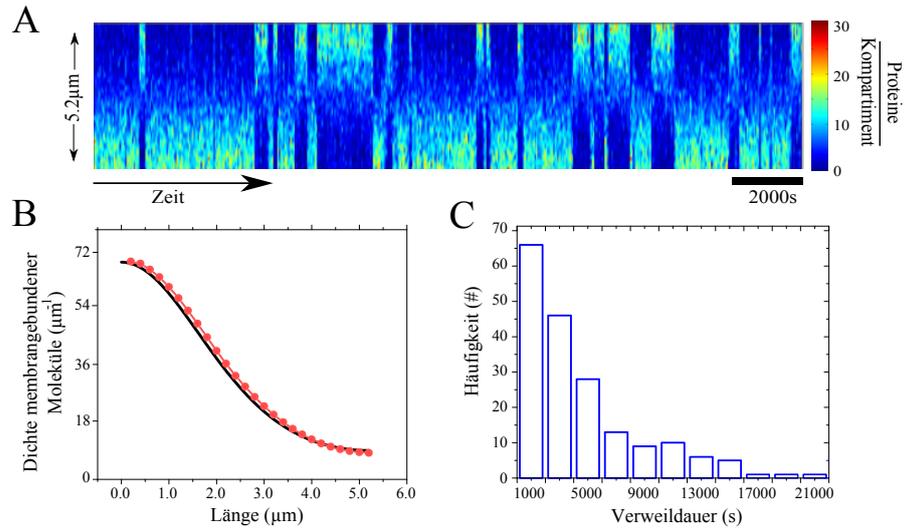


Abbildung 55: **Bildung polarer Molekül-Cluster auf der Membran.** A) Kymograph aus Simulationsdaten, der die räumliche Verteilung der Moleküle als Funktion der Zeit zeigt. B) Vergleich eines durch zeitliche Mittelung erhaltenen Profils aus der stochastischen Simulation (rot) mit dem entsprechenden Profil der Mean-Field-Beschreibung (41)-(42) (schwarz). Die zeitliche Mittelung erfolgt in einem Zeitintervall, in dem die Teilchen fest in einer Hälfte der Geometrie lokalisiert sind. C) Häufigkeitsverteilung der Residenzzeiten. Die verwendeten Parameter sind  $D_c=10\mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $D_m=0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $\omega_a=0.1\text{s}^{-1}$ ,  $\omega_d=0.1\text{s}^{-1}$ ,  $\omega_c L^{-2}=1\text{s}^{-1}$ ,  $L=5.2\mu\text{m}$ ,  $l=0.2\mu\text{m}$ ,  $\Omega=187$ .

tet und in Abschnitt 11.2.2 diskutiert werden. Wichtig zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang, dass die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Mean-Field Theorie und den stochastischen Simulationen stark von der Wahl der Kompartimentgröße  $l$  abhängig ist. Jedes Kompartiment sollte im Mittel eine genügend große Anzahl an Molekülen beinhalten, so dass ein Kontinuumsansatz verwendet werden kann. Zur gleichen Zeit sollte  $l$  klein gegenüber der räumlichen Eigenschaften der Proteinverteilung sein.

## 11.2 DIE FUNKTIONALE FOKKER-PLANCK GLEICHUNG

Um ein tieferes Verständnis für die Dynamik des Systems zu erhalten, werden wir in diesem Abschnitt die funktionale Fokker-Planck Gleichung aus der chemischen Mastergleichung (30) ableiten. Dazu entwickeln wir in einem ersten Schritt die Operatoren  $\mathbb{E}_{c,i}^{\pm}$  bzw.  $\mathbb{E}_{m,i}^{\pm}$ , in der inversen Molekülanzahl  $1/\Omega$  und ersetzen sie entsprechend ihrer Entwicklungen in der chemischen Mastergleichung (30). Dies entspricht formal einer Systemgrößenentwicklung nach van Kampen. Die daraus resultierende Fokker-Planck Gleichung liegt in einer diskreten Form vor. Um sie in eine Kontinuumsbeschreibung zu überführen, betrachten wir in einem zweiten Schritt den Grenzübergang  $l \rightarrow 0$ .

Die so erhaltene Fokker-Planck Gleichung untersuchen wir zuerst im deterministischen Limes  $\Omega \rightarrow \infty$  und anschließend führen wir zur Analyse des molekularen Rauschens eine Galerkin-Approximation durch.

### 11.2.1 Van Kampen Expansion und Kontinuumsliches

Für  $\Omega \gg 1$  und hohen Besetzungszahlen,  $n_{c,i} \gg 1$  und  $n_{m,i} \gg 1$ , entwickeln wir den Erzeugungs- und Vernichtungsoperator der zytosolischen und membrangebundenen Molekülen,  $\mathbb{E}_{c,i}^\pm$  und  $\mathbb{E}_{m,i}^\pm$ , entsprechend

$$\mathbb{E}_{c,i}^\pm \approx 1 \pm \frac{\partial}{\partial n_{c,i}} + \frac{1}{2} \frac{\partial^2}{\partial n_{c,i}^2} \quad (30)$$

$$\mathbb{E}_{m,i}^\pm \approx 1 \pm \frac{\partial}{\partial n_{m,i}} + \frac{1}{2} \frac{\partial^2}{\partial n_{m,i}^2} \quad (31)$$

Dies entspricht formal einer Entwicklung in  $1/\Omega$  bis zur zweiten Ordnung. Aufgrund der inhomogenen Verteilungen der Moleküle im System, können trotz sehr großer Werte von  $\Omega$ , die Approximationen der Operatoren zu ungenau für alle Kompartimente zu allen Zeiten sein, wodurch höhere Ordnungen der Entwicklungen in Betracht gezogen werden müssten. Wir sehen jedoch im Verlauf, dass die Entwicklungen bis zur zweiten Ordnung ausreichen um die wichtigsten Charakteristika des untersuchten Systems zu beschreiben. Als weitere Vereinfachung, ersetzen wir den Term  $(n_{m,i} - 1)$  im Ausdruck  $\sum_i (\mathbb{E}_{c,i}^+ \mathbb{E}_{m,i}^- - 1) n_{c,i} n_{m,i} (n_{m,i} - 1) P$  der Mastergleichung (30) durch  $n_{m,i}$ . Damit erhalten wir aus der chemischen Mastergleichung (30) die folgende Fokker-Planck Gleichung

$$\begin{aligned} \frac{dP}{dt} = & - \sum_i \frac{\partial}{\partial n_{c,i}} \left\{ D_c \partial_x^2 n_{c,j} - \omega_a n_{c,i} + \frac{\omega_c}{\Omega^2 \ell^2} n_{c,i} n_{m,i}^2 - \omega_d n_{m,i} \right\} P \\ & - \sum_i \frac{\partial}{\partial n_{m,i}} \left\{ D_m \partial_x^2 n_{m,i} + \omega_a n_{c,i} + \frac{\omega_c}{\Omega^2 \ell^2} n_{c,i} n_{m,i}^2 - \omega_d n_{m,i} \right\} P \\ & + \sum_i \frac{\partial^2}{\partial n_{c,i}^2} \left\{ D_c \partial_x^2 n_{c,j} + \omega_a n_{c,i} + \frac{\omega_c}{\Omega^2 \ell^2} n_{c,i} n_{m,i}^2 + \omega_d n_{m,i} \right\} P \\ & + \sum_i \frac{\partial^2}{\partial n_{m,i}^2} \left\{ D_m \partial_x^2 n_{m,j} + \omega_a n_{c,i} + \frac{\omega_c}{\Omega^2 \ell^2} n_{c,i} n_{m,i}^2 + \omega_d n_{m,i} \right\} P \\ & - \sum_i \frac{\partial^2}{\partial n_{c,i} \partial n_{m,i}} \left\{ \omega_a n_{c,i} + \frac{\omega_c}{\Omega^2 \ell^2} n_{c,i} n_{m,i}^2 + \omega_d n_{m,i} \right\} P \quad . \end{aligned} \quad (32)$$

Um die diskrete Fokker-Planck Gleichung nun in eine kontinuierliche Formulierung zu überführen, werden wir den Kontinuumslimit  $\ell \rightarrow 0$  ausführen. Dazu führen wir die Dichten  $c_i = n_{c,i}/(\Omega\ell)$  und  $m_i = n_{m,i}/(\Omega\ell)$  für  $i = 1, \dots, N$  ein. Sie geben den Bruchteil aller Moleküle an, welche sich im zytosolischen oder membrangebundenen Zustand im Kompartiment  $i$  befinden, so dass  $\sum_{i=1}^N (c_i + m_i) \ell = 1$  gilt.

Im Grenzübergang  $\ell \rightarrow 0$  werden die diskreten Dichten  $c_i$  und  $m_i$  durch die kontinuierlichen Funktionen  $c$  und  $m$  mit  $c(i\ell) = c_i$  and  $m(i\ell) = m_i$  ausgedrückt. Entsprechend werden die Summen in Gleichung (32) durch Integrale  $\sum_{i=1}^N \ell f_i \rightarrow \int_0^L dx f(x)$  ersetzt, sowie die partiellen Ableitungen durch Funktionalableitungen

$$\frac{\partial f}{\partial n_{c,i}} = \frac{1}{\Omega\ell} \frac{\partial f}{\partial c_i} \rightarrow \frac{1}{\Omega} \frac{\delta f}{\delta c(i\ell)} \quad (33)$$

$$\frac{\partial^2 f}{\partial n_{c,i} \partial n_{c,i}} = \frac{1}{\Omega^2 \ell^2} \frac{\partial^2 f}{\partial c_i \partial c_j} \rightarrow \frac{1}{\Omega^2} \frac{\delta^2 f}{\delta c(i\ell) \delta c(j\ell)} \quad (34)$$

Die übrigen partiellen Ableitungen werden äquivalent ersetzt.

Die resultierende funktionale Fokker-Planck Gleichung für das Wahrscheinlichkeitsfunktional  $P[c(x), m(x), t]$  lautet:

$$\begin{aligned} \frac{\partial P}{\partial t} = & - \int_0^L dx \left\{ \frac{\delta}{\delta c(x)} A_c + \frac{\delta}{\delta m(x)} A_m \right\} P \\ & + \frac{1}{2\Omega} \int_0^L dx \int_0^L dy \left\{ \frac{\delta^2}{\delta c(x) \delta c(y)} B_{cc} \right. \\ & \left. + 2 \frac{\delta^2}{\delta c(x) \delta m(y)} B_{cm} + \frac{\delta^2}{\delta m(x) \delta m(y)} B_{mm} \right\} P \end{aligned} \quad (35)$$

mit

$$A_c = D_c \partial_x^2 c(x) - \omega_a c - \omega_c c m^2 + \omega_d m \quad (36)$$

$$A_m = D_m \partial_x^2 m(x) + \omega_a c + \omega_c c m^2 - \omega_d m \quad (37)$$

$$B_{cc} = \{ D_c \partial_x \partial_y c(x) + \omega_a c + \omega_c c m^2 + \omega_d m \} \delta(x - y) \quad (38)$$

$$B_{mm} = \{ D_m \partial_x \partial_y m(x) + \omega_a c + \omega_c c m^2 + \omega_d m \} \delta(x - y) \quad (39)$$

$$B_{cm} = -2 \{ \omega_a c + \omega_c c m^2 + \omega_d m \} \delta(x - y), \quad (40)$$

Die Terme in  $A_c$  und  $A_m$  beschreiben den deterministischen Anteil, während die Terme in  $B_{cc}$ ,  $B_{cm}$ ,  $B_{mc}$ , und  $B_{mm}$  den Einfluss des Rauschens beschreiben. Wichtig anzumerken ist hier, dass die Terme die das Rauschen beschreiben proportional zur inversen Molekülanzahl  $1/\Omega$  sind. Im Grenzübergang  $\Omega \rightarrow \infty$ , werden diese vernachlässigbar klein und wir erhalten  $P[c(x), m(x), t] = P_0[c(x, t), m(x, t)]$  mit  $P_0[c(x), m(x)] = P[c(x), m(x), t = 0]$ , wobei wir mit  $c(x, t)$  und  $m(x, t)$

die deterministischen Gleichungen  $\partial_t c = A_c$  und  $\partial_t m = A_m$  definieren.

### 11.2.2 Der deterministische Limes

Die dynamischen Gleichungen für die Teilchendichten  $c$  und  $m$  lauten im deterministischen Limes der Fokker-Planck Gleichung

$$\partial_t c = D_c \partial_x^2 c - (\omega_a + \omega_c m^2) c + \omega_d m \quad (41)$$

$$\partial_t m = D_m \partial_x^2 m + (\omega_a + \omega_c m^2) c - \omega_d m \quad . \quad (42)$$

Sie werden ergänzt durch No-Flux Randbedingungen der Diffusionsströme  $-D_c \partial_x c = 0$  und  $-D_m \partial_x m = 0$  an den Rändern bei  $x = 0$  und  $x = L$ .

Durch die Einführung der dimensionslosen Zeit  $t' = t\omega_a$  und der dimensionslosen Länge  $x' = x/\lambda$  mit  $\lambda^2 = D_c/\omega_a$  sowie den dimensionslosen Dichten  $c'$  und  $m'$  durch  $c = c'/\sqrt{\omega_c/\omega_a}$  und  $m = m'/\sqrt{\omega_c/\omega_a}$ , lassen sich die dynamischen Gleichungen in der folgenden Form

$$\partial_t c = \partial_x^2 c - (1 + m^2) c + km \quad (43)$$

$$\partial_t m = D \partial_x^2 m + (1 + m^2) c - km \quad , \quad (44)$$

schreiben, wobei wir die Striche, die die dimensionslosen Größen markieren, zur Vereinfachung der Notation ausblenden.

Die dimensionslose Diffusionskonstante ist  $D = D_m/D_c$  und die dimensionslose Ablöserate ist  $k = \omega_d/\omega_a$ . Anzumerken ist hier, dass die Systemlänge  $L$  im Folgenden in den Einheiten von  $\lambda$  angegeben wird.

Die deterministischen Gleichungen besitzen für den in dieser Arbeit verwendeten Parametersatz eine reelle stationäre homogene Lösung  $c = C_0 = const$  und  $m = M_0 = const$ , welche durch die Gleichungen  $C_0 + M_0 = \sqrt{\bar{\omega}_c/\omega_a}$  und

$$M_0^3 - \sqrt{\bar{\omega}_c/\omega_a} M_0^2 + (1 + k) M_0 + \sqrt{\bar{\omega}_c/\omega_a} = 0 \quad (45)$$

mit  $\omega_c = \bar{\omega}_c L^2$  bestimmt werden. Für eine lineare Stabilitätsanalyse der homogenen stationären Lösung entwickeln wir die Dichten entsprechend

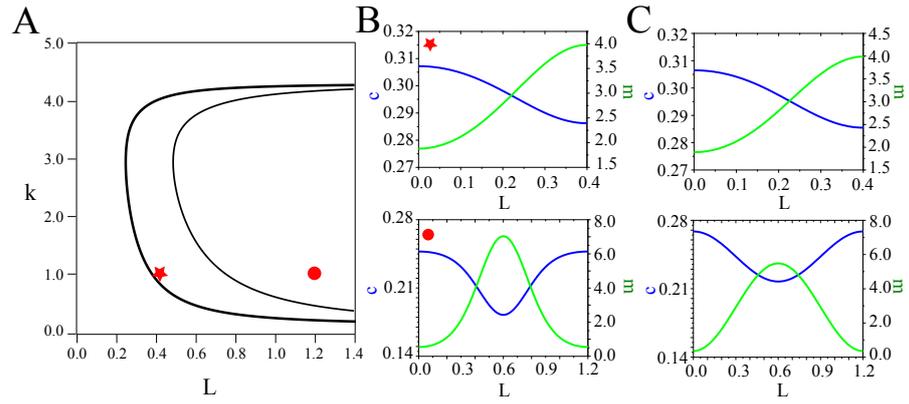


Abbildung 56: **Verhalten des Systems im deterministischen Limes.** A) Phasendiagramm als Funktion der dimensionslosen Systemlänge  $L$  und der dimensionslosen Ablöserate  $k$ . B) Inhomogene stationäre Lösung der dynamischen Gleichungen (43) und (44). C) Dichteverteilung, erhalten durch das Einsetzen der stationären Lösung der Gleichungen (88)-(93) in die Entwicklungen 46-47 mit  $C_n, M_n = 0 \forall n > 2$ . Zur Bestimmung der stationären Lösung der Gleichungen (88)-(93) werden die Moden  $C_0, C_1, C_2$  und  $M_0$  adiabatisch eliminiert. Die Parameterwerte für  $k$  und  $L$  in (B) und (C) sind durch die entsprechenden Symbole in (A) gekennzeichnet. Die übrigen Parameterwerte sind  $D = 0.01$  und  $\bar{\omega}_c/\omega_a = 10$ .

$$c(x, t) = \sum_{n=0}^{\infty} C_n(t) \cos(n\pi x/L) \quad (46)$$

$$m(x, t) = \sum_{n=0}^{\infty} M_n(t) \cos(n\pi x/L) \quad (47)$$

und berücksichtigen ausschließlich die linearen Terme  $C_n$  und  $M_n$ ,  $n = 1, 2, \dots$  in den dynamischen Gleichungen

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} C_n \\ M_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -q_n^2 - 1 - M_0^2 & -2C_0M_0 + k \\ 1 + M_0^2 & -Dq_n^2 + 2C_0M_0 - k \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_n \\ M_n \end{pmatrix}, \quad (48)$$

mit  $q_n = n\pi/L$  und  $n = 1, 2, \dots$

Der homogene Zustand ist für  $L > L_{c,1}$  instabil, falls  $k_{c,1}(L) \geq k \geq k_{c,2}(L)$  mit den kritischen Werten  $k_{c,1}(L)$  und  $k_{c,2}(L)$ , siehe Abbildung 56. Die erste Mode die instabil wird, ist diejenige mit  $n = 1$ , was einer Verteilung entspricht, in der die Moleküle an einem Pol akkumuliert sind. Da die Systemlänge invariant unter der Transformation  $x \rightarrow L - x$  ist, koexistieren zwei spiegelsymmetrische Lösungen. Eine der beiden Lösungen wird spontan durch Symmetriebrechung gewählt, siehe oberer Teil von Abbildung 56B. Oberhalb der kritischen Länge  $L_{c,1}$ , existiert eine zweite Bifurkation für  $L > L_{c,2}$ . Hier bilden

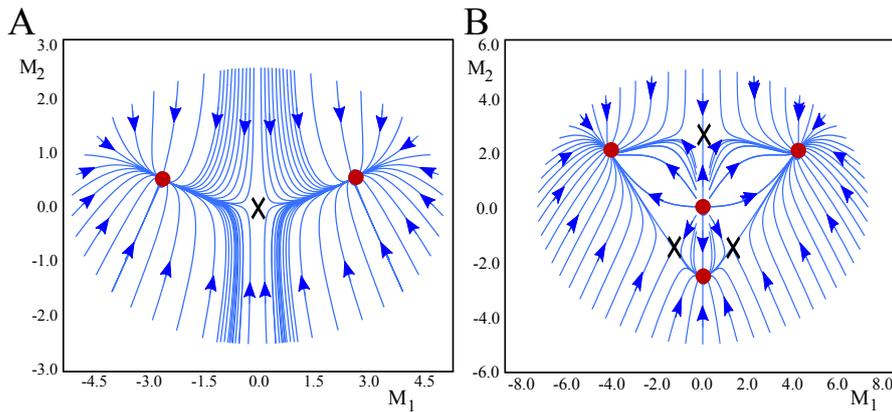


Abbildung 57: **Flusslinien der Moden  $M_1$  und  $M_2$  im deterministischen Limes.** Flusslinien der Moden  $M_1$  und  $M_2$  im deterministischen Limes für  $L_{c,1} \leq L \leq L_{c,2}$  (A) und  $L_{c,2} \leq L$  (B). Die roten Punkte symbolisieren sowohl die stabilen als auch die instabilen Fixpunkte, während die schwarzen Kreuze, die hyperbolischen Fixpunkte kennzeichnen. Die Parameterwerte wurden wie in Abbildung 56 gewählt, mit  $k=1$  und den Systemlängen  $L = 0.52$  (A) und  $L = 1.2$  (B).

sich zwei neue Lösungen des Systems für  $k_{c,3}(L) \leq k \leq k_{c,4}(L)$  mit  $k_{c,3}(L) > k_{c,2}(L)$  und  $k_{c,4}(L) < k_{c,1}(L)$ , in denen die Moleküle entweder im Zentrum der eindimensionalen Zelle, siehe unterer Teil von Abbildung 56B, oder gleichzeitig an den beiden gegenüberliegenden Zellenden akkumuliert sind. Die numerische Lösung der deterministischen Gleichungen (43) und (44) zeigt jedoch, dass nur der Zustand stabil ist, in dem die Proteine im Zellzentrum gebunden sind.

Wir machen nun einen Garlekin-Ansatz und brechen die Reihen (46) und (47) bei einem endlichen Wert für  $n$  ab. Die daraus resultierenden Gleichungen sind im Anhang A.4 dargestellt. Es zeigt sich, dass für  $L \lesssim L_{c,2}$  die Entwicklungen bis zu einer Ordnung  $n = 2$  ausreichen, um die Systemdynamik genügend genau zu beschreiben. Vergleiche hierzu Abbildung 56B und Abbildung 56C.

Des Weiteren relaxieren die Moden  $C_0, C_1, C_2$ , und  $M_0$  auf kürzeren Zeitskalen als die Moden  $M_1$  und  $M_2$ , so dass wir eine adiabatische Näherung durchführen können. Diese erlaubt uns die Moden  $C_0, C_1, C_2$ , und  $M_0$  durch die Moden  $M_1$  und  $M_2$  auszudrücken, wodurch die dynamischen Gleichungen nur noch von  $M_1$  und  $M_2$  abhängen.

In Abbildung 57 zeigen wir das Flussfeld der dynamischen Gleichungen für  $M_1$  und  $M_2$ , nachdem wir  $C_0, C_1, C_2$  und  $M_0$  adiabatisch eliminiert haben. Für  $L_{c,1} \leq L \leq L_{c,2}$  hat das System zwei symmetrische stabile und einen hyperbolischen Fixpunkt, siehe Abbildung 57A. Der hyperbolische Fixpunkt liegt bei  $(0,0,0,0)$  und entspricht dem homogenen Zustand. Für die symmetrischen Fixpunkte gilt  $|M_2| \ll |M_1|$ , so dass sie den Zuständen des Systems entsprechen, in denen die Proteine an einem der beiden Pole akkumuliert

sind. Sobald  $L_{c,2} \leq L$  ist, entstehen zwei neue Fixpunkte. Sie sind hyperbolisch und liegen bei  $M_1 = 0$ , womit sie die symmetrischen Proteinverteilungen kennzeichnen, bei denen die Proteine entweder in der Zellmitte oder an den beiden Zellrändern lokalisiert sind. Eine weitere Vergrößerung von  $L$  führt zu zwei neuen hyperbolischen Fixpunkten. Zur gleichen Zeit werden die Fixpunkte mit  $M_1 < 0$  stabil. Die zwei neuen hyperbolischen Fixpunkte sind mit den stabilen Fixpunkten durch heterokline Orbits verbunden, siehe Abbildung 57B.

### 11.2.3 Garlekin-Näherung der Fokker-Planck Gleichung

In diesem Abschnitt approximieren wir die Fokker-Planck Gleichung (35) mit Hilfe der Garlekin-Methode. Mit dieser Methode und den Entwicklungen (46) und (47), können wir das Funktional  $P[c(x), m(x); t]$  in eine Funktion der Koeffizienten  $C_n$  und  $M_n$  transformieren. Ausgangspunkt der Garlekin-Approximation ist die funktionale Fokker-Planck Gleichung (35). Die darin enthaltenen funktionalen Ableitungen nach  $c(x)$  und  $m(x)$ , werden durch die entsprechenden partiellen Ableitungen nach  $C_n$  und  $M_n$  für  $n = 0, 1, 2, \dots$  ausgedrückt.

Betrachte man das Funktional  $F[c(x), m(x)]$ , welches durch die Entwicklungen (46) und (47), auch eine Funktion  $\bar{F}(C_n, M_n)$  der Moden ist und berücksichtigt man, dass die Variation  $\delta C_n$  der  $n$ -ten Mode der zytosolen Moleküle, zu einer Änderung der Dichte gemäß  $\delta c(x) = \delta C_n \cos(n\pi x/L)$  führt, so folgt

$$\frac{\partial \bar{F}}{\partial C_n} = \int_0^L dx \frac{\delta F}{\delta c(x)} \cos\left(\frac{n\pi x}{L}\right) . \quad (49)$$

Ein analoger Ausdruck erhält man für die Ableitungen  $\partial \bar{F} / \partial M_n$ . Anzumerken ist hier, dass die Variationen von  $C_0$  und  $M_0$  nicht unabhängig voneinander sind. Durch das Einsetzen der Fourierentwicklung von  $\delta F / \delta c(x)$  bzw.  $\delta F / \delta m(x)$  in die Gleichung für  $\partial \bar{F} / \partial C_n$  bzw.  $\partial \bar{F} / \partial M_n$ , erhalten wir durch Koeffizientenvergleich die folgenden Entwicklungen für die Funktionalableitungen

$$\frac{\delta F}{\delta c(x)} = \frac{2}{L} \sqrt{\frac{\omega_c}{\omega_a}} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{\partial \bar{F}}{\partial C_n} \cos\left(\frac{n\pi x}{L}\right) \quad (50)$$

$$\frac{\delta F}{\delta m(x)} = \frac{2}{L} \sqrt{\frac{\omega_c}{\omega_a}} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{\partial \bar{F}}{\partial M_n} \cos\left(\frac{n\pi x}{L}\right) \quad (51)$$

und in ähnlicher Weise

$$\frac{\delta^2 F}{\delta c(x)\delta c(y)} = \frac{4\omega_c}{\omega_a L^2} \sum_{n,m=0}^{\infty} \frac{\partial^2 \bar{F}}{\partial C_n \partial C_m} \cos\left(\frac{n\pi x}{L}\right) \cos\left(\frac{m\pi x}{L}\right) \quad (52)$$

$$\frac{\delta^2 F}{\delta c(x)\delta m(y)} = \frac{4\omega_c}{\omega_a L^2} \sum_{n,m=0}^{\infty} \frac{\partial^2 \bar{F}}{\partial C_n \partial M_m} \cos\left(\frac{n\pi x}{L}\right) \cos\left(\frac{m\pi x}{L}\right) \quad (53)$$

$$\frac{\delta^2 F}{\delta m(x)\delta m(y)} = \frac{4\omega_c}{\omega_a L^2} \sum_{n,m=0}^{\infty} \frac{\partial^2 \bar{F}}{\partial M_n \partial M_m} \cos\left(\frac{n\pi x}{L}\right) \cos\left(\frac{m\pi x}{L}\right). \quad (54)$$

Indem wir die Entwicklungen (46) und (47) in Gleichung (35) einsetzen, die Ausdrücke für die funktionalen Ableitungen (50)-(54) nutzen und die Integrale ausführen, erhalten wir eine Fokker-Planck Gleichung der Wahrscheinlichkeitsdichte  $P(\{C_n\}_{n=0,1,\dots}, \{M_n\}_{n=0,1,\dots}; t)$  mit  $C_0 + M_0 = \text{const.}$ . Sie lautet

$$\begin{aligned} \frac{\partial P}{\partial t} = & - \sum_{n=0}^{\infty} \left\{ \frac{\partial}{\partial C_n} \bar{A}_{c,n} + \frac{\partial}{\partial M_n} \bar{A}_{m,n} \right\} P \\ & + \frac{1}{2\Omega} \sum_{n,m=0}^{\infty} \left\{ \frac{\partial^2}{\partial C_n \partial C_m} \bar{B}_{cc,nm} \right. \\ & \left. + 2 \frac{\partial^2}{\partial C_n \partial M_m} \bar{B}_{cm,nm} + \frac{\partial^2}{\partial M_n \partial M_m} \bar{B}_{mm,nm} \right\} P \quad . \end{aligned} \quad (55)$$

nun verwenden wir die Garlekin-Näherung und beenden die Entwicklungen bei  $n, m = 2$ . Des Weiteren werden wir eine adiabatische Näherung durchführen und  $C_0, C_1, C_2$  und  $M_0$  in Termen von  $M_1$  und  $M_2$  ausdrücken, indem wir die deterministischen Gleichungen (88)-(91) im stationären Zustand nutzen. Schlussendlich erhalten wir

$$\partial_t P = -\partial_k u_k P + \frac{1}{2\Omega L'} \partial_k \partial_l D_{kl} P \quad , \quad (56)$$

wobei die Wahrscheinlichkeitsverteilung  $P \equiv P(M_1, M_2; t)$  nur noch von  $M_1$  and  $M_2$  mit  $\partial_k \equiv \partial/\partial M_k$  für  $k = 1, 2$  abhängig ist. Des Weiteren ist  $L' = L\sqrt{D_c/\omega_c}$ . Die Ausdrücke für die Driftgeschwindigkeit  $u_k = \dot{M}_k$  sind diejenigen, welche im deterministischen Limes den Gleichungen (92) und (93) entsprechen. Die Elemente der Diffusionsmatrix  $D$  sind im Anhang A.4 angegeben.

Im nächsten Abschnitt werden wir die soeben hergeleitete Fokker-Planck Gleichung verwenden, um die mittlere Schaltzeiten der Proteincluster zu bestimmen.

### 11.3 BESTIMMUNG DER SCHALTZEIT IM GRENZFALL VON SCHWACHEM RAUSCHEN

Die Residenzzeit der Moleküle in einer Zellhälfte kann als die mittlere First-Passage Zeit (MFPT) eines multidimensionalen Fluchtproblems interpretiert werden. Aufgrund der Struktur der deterministischen Gleichungen (43)-(44) lässt sich auf klassische Weise kein Potential finden, welches die Dynamik des Systems bestimmt, womit die Rantentheorie von Kramers (Eyring) nicht verwendet werden kann. Stattdessen bestimmen wir mit Hilfe der Wentzell-Freidlin Theorie [98, 15] ein effektives Potential und mit dessen Hilfe die Schaltzeiten. Am Ende dieses Abschnitts vergleichen wir die theoretisch ermittelten Residenzzeiten mit den Residenzzeiten, die wir mit den Simulationen bestimmt haben.

#### 11.3.1 Wahrscheinlichkeitsstrom durch die Separatrix

Wie wir gesehen haben, existiert im deterministischen Fall ein Bereich im Parameterraum, in dem zwei stabile spiegelsymmetrische Verteilungen koexistieren. Die zwei Einzugsgebiete der Attraktoren sind durch eine Separatrix entlang der Achse  $M_1 = 0$  getrennt. Die Achse enthält einen weiteren Fixpunkt bei  $M_1 = M_2 = 0$ , welcher den homogenen Zustand des Systems beschreibt. Dies ist ein hyperbolischer Fixpunkt dessen stabile Mannigfaltigkeit mit der Separatrix übereinstimmt. Das Ziel ist nun die MFPT  $\tau$  im Grenzfall von schwachem Rauschen zu berechnen. Darum verwenden wir die Fokker-Planck Gleichung (56) mit absorbierenden Randbedingungen entlang der Separatrix. Wir werden den Gesamtwahrscheinlichkeitsstrom durch die Separatrix berechnen, welcher an die am schnellsten abnehmende Eigenfunktion  $P_1$  des Fokker-Planck Operators gebunden ist. Die Normalisierung des Stromes mit der Gesamtwahrscheinlichkeit ein Teilchen auf einer Seite der Separatrix zu finden ergibt

$$\tau = \frac{-\int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{2\Omega L} \partial_k D_{1k} P(0, M_2) dM_2}{\int_0^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} P(M_1, M_2) dM_2 dM_1} \quad , \quad (57)$$

wobei die Summation über den Index  $k$  läuft. Anzumerken ist hier, dass  $\tau$  gerade die charakteristische Zeit darstellt, in welcher die Eigenfunktion  $P_1$  relaxiert. Diese entspricht gerade dem Inversen des entsprechenden Eigenwerts des Fokker-Planck Operators. In der kleinsten Ordnung in  $1/\Omega$  kann die Eigenfunktion  $P_1$  durch die Lösung  $P_S$  der stationären Fokker-Planck Gleichung ersetzt werden. Der stationäre Zustand von Gleichung (56) kann nicht exakt berechnet werden.

Stattdessen werden wir einen Wentzel-Kramers-Brillouin Ansatz machen und die stationäre Wahrscheinlichkeitsverteilung als

$$P_1(M_1, M_2) = K(M_1, M_2) \exp\{-\Omega L' S(M_1, M_2)\} \quad (58)$$

mit der klassischen Wirkung  $S$  beschreiben. Die Gleichung der Wirkung wird bestimmt, indem wir den WKB-Ansatz in Gleichung (56) einsetzen und ausschließlich die Terme erster Ordnung in  $1/\Omega$  berücksichtigen. Damit erhalten wir eine Gleichung, welche der Form einer Hamilton-Jacobi Gleichung  $H(M_1, M_2, \partial_1 S, \partial_2 S) = 0$  mit dem Hamiltonian

$$H = u_k p_k + \frac{1}{2} D_{kl} p_k p_l, \quad (59)$$

entspricht. Hier entspricht  $p_k = \partial_k S$  dem Moment, welches  $M_k$  mit  $k = 1, 2$  zugeordnet ist. Die Wirkung  $S$  bestimmen wir, indem wir als erstes die kanonischen dynamischen Gleichungen

$$\dot{M}_k = u_k + D_{kl} p_l \quad (60)$$

$$\dot{p}_k = -(\partial_k u_l) p_l - \frac{1}{2} (\partial_k D_{lm}) p_l p_m, \quad (61)$$

und anschließend die dynamische Gleichung

$$\dot{S} = D_{kl} p_k p_l + u_k p_k \quad (62)$$

lösen. Nun benötigen wir nur noch den Vorfaktor  $K$  in Gleichung (58), den wir aus den Termen nullter Ordnung in  $1/\Omega$  aus Gleichung (56) erhalten können. Dies führt zu

$$\dot{K} = - \left[ \partial_k (D_{kl} p_l + u_k) + \frac{1}{2} W_{kl} D_{kl} \right] K \quad (63)$$

In diesem Ausdruck bezeichnet  $W$  die Hesse-Matrix der Wirkung  $S$ , die sich aus  $W_{kl} = \partial_k \partial_l S$  bestimmen lässt. Sie kann jedoch auch ohne Kenntnis der Wirkung  $S$  bestimmt werden, indem man die dynamische Gleichung der Hesse-Matrix löst, welcher der verallgemeinerten Riccati-Gleichung

$$\begin{aligned} \dot{W}_{kl} = & -W_{km} D_{mn} W_{nl} - (\partial_k (D_{mn} p_m + u_n)) W_{nl} \\ & - (\partial_l (D_{mn} p_m + u_n)) W_{nk} - \partial_k \partial_l (D_{mn} p_m p_n + u_m p_m) \end{aligned} \quad (64)$$

entspricht.

In Abbildung 58 zeigen wir die stationäre Wahrscheinlichkeitsverteilung für unterschiedliche Systemlängen  $L$ . Die Wahrscheinlichkeit

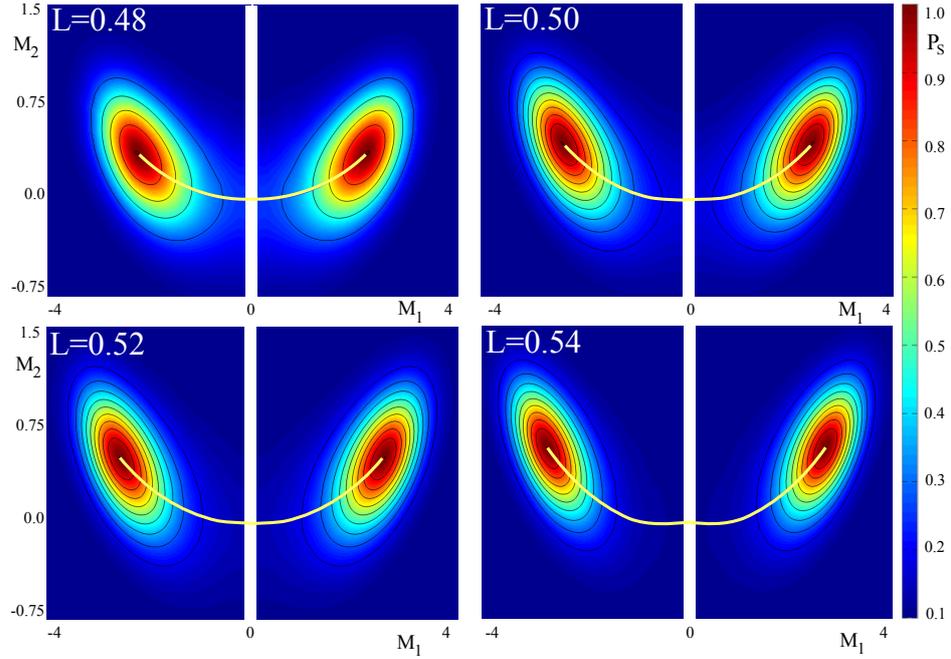


Abbildung 58: **Stationäre Wahrscheinlichkeitsverteilung für unterschiedliche Systemlängen  $L$  in der WKB-Näherung.** Die beiden lokalen Maxima der Wahrscheinlichkeit  $P_S$ , kennzeichnen die Zustände des Systems, in denen die Proteine in einer der beiden Zellhälfte lokalisiert sind. Sie liegen unmittelbar auf den stabilen Fixpunkten des deterministischen Systems. Mit zunehmender Systemlänge  $L$  nimmt der Abstand zwischen den beiden Maxima zu und die Wahrscheinlichkeit zwischen ihnen, ab. Die gelben Kurven stellen die heteroklinen Orbits zwischen den stabilen Fixpunkten dar. Sie durchqueren die hyperbolischen Fixpunkte bei  $M_1 = M_2 = p_1 = p_2 = 0$ . Die verwendeten Parameter sind  $D = 0.01$ ,  $k = 1$  und  $\Omega = 150$  für  $L=0.5$ .

in der Umgebung der stabilen Fixpunkte ist maximal. Im hyperbolischen Fixpunkt  $(0,0,0,0)$  hat die Wahrscheinlichkeitsverteilung einen Sattelpunkt und der heterokline Orbit, hier als gelbe Linie dargestellt, liegt auf dem Höhenrücken der Wahrscheinlichkeitsverteilung.

Wir können nun die Form der Wahrscheinlichkeitsverteilung ausnutzen um Gleichung (57) weiter zu vereinfachen. Der Integrand im Nenner von Gleichung (57) wird offensichtlich durch das Gebiet um den stabilen Fixpunkt bestimmt, während der Intergrand im Zähler durch das Gebiet um den hyperbolischen Fixpunkt  $M_1 = M_2 = p_1 = p_2 = 0$  bestimmt wird. In diesen Gebieten lässt sich eine Gaußsche Näherung der Wahrscheinlichkeitsdichte durchführen. Äquivalent dazu ist eine quadratische Näherung des Hamiltonians (59), gemäß

$$H = \lambda_{kl} M_k p_l + \frac{1}{2} D_{kl} p_k p_l, \quad (65)$$

mit  $\lambda_{kl} \equiv \partial_k u_l$ . Die Koeffizienten des Hamiltonian werden im hy-

perbolischen oder stabilen Fixpunkt von Gleichung (92) bzw. Gleichung (93) ausgewertet. Mit diesen Näherungen lässt sich die Schaltzeit bestimmen zu

$$\tau = \frac{\pi}{\lambda_{11}^{\text{hyp}} K^{\text{hyp}}} \sqrt{\frac{|\det W^{\text{hyp}}|}{\det W^{\text{st}}}} \exp\{\Omega L' S^{\text{hyp}}\} . \quad (66)$$

In der Gleichung für  $\tau$  symbolisiert ein hochgestelltes 'hyp' die Auswertung der Größe im hyperbolischen Fixpunkt, während ein tiefgestelltes 'st' die Auswertung der Größe im stabilen Fixpunkt symbolisiert. Es ist anzumerken, dass durch die Skalierung von  $\omega_c$  mit  $L^2$ , der Vorfaktor von  $S_{\text{hyp}}$  im Exponenten der e-Funktion, unabhängig von  $L$  wird. Schließlich werden die Ausdrücke für  $\det W^{\text{st}}$  und  $\det W^{\text{hyp}}$  durch die Gleichung (64) gegeben, indem man die Zeitableitung sowie die beiden Impulse  $p_1$  und  $p_2$  zu Null setzt. Dies führt zu der Gleichung

$$W_{km} D_{mn} W_{nl} + (\partial_l u_n) W_{nk} + (\partial_k u_n) W_{nl} = 0. \quad (67)$$

Die Elemente  $D_{mn}$  und die partiellen Ableitungen  $\partial_m u_n$  müssen in den entsprechenden Fixpunkten ausgewertet werden. Damit sind uns alle Größen bekannt, die notwendig sind, um die Schaltzeit  $\tau$  zu bestimmen.

### 11.3.2 Vergleich der abgeschätzten Schaltzeiten mit den Schaltzeiten der stochastischen Simulationen

Gemäß Gleichung (57) benötigen wir zur Bestimmung der Schaltzeiten, einige Größen in den Fixpunkten der Gleichung (92) und (93). Im hyperbolischen Fixpunkt lässt sich der angenäherte Hamiltonian (65) analytisch bestimmen. Die Matrizen  $\lambda$  und  $D$  besitzen Diagonalgestalt mit den nichtverschwindenden Elementen

$$\lambda_{11}^{\text{hyp}} = \frac{\pi^2}{L^2} \left( \frac{2C_0 M_0 - k}{1 + M_0^2 + \frac{\pi^2}{L^2}} - D \right) \quad (68)$$

$$\lambda_{22}^{\text{hyp}} = \frac{4\pi^2}{L^2} \left( \frac{2C_0 M_0 - k}{1 + M_0^2 + \frac{4\pi^2}{L^2}} - D \right) \quad (69)$$

$$D_{11}^{\text{hyp}} = D_{22}^{\text{hyp}} = 4kM_0. \quad (70)$$

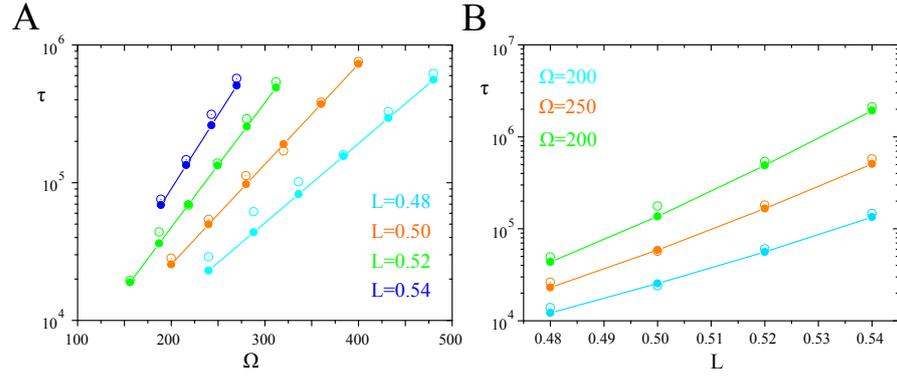


Abbildung 59: **Vergleich der Schaltzeiten aus der Theorie und den Simulationen.** Vergleich der theoretisch bestimmten Schaltzeit (ausgefüllter Kreis) mit der Schaltzeit der stochastischen Simulationen (offener Kreis mit Punkt) als Funktion der Molekuelzahl  $\Omega$  (A) und der dimensionslosen Systemlänge  $L$  (B). Die Ablöserate  $k=1$  und die übrigen Parameter wurden wie in Abbildung 56 gewählt.

Damit erhalten wir für die Determinante der Hesse-Matrix im hyperbolischen Fixpunkt

$$\det W^{\text{hyp}} = \frac{\lambda_{11}^{\text{hyp}} \lambda_{22}^{\text{hyp}}}{4k^2 M_0^2} \quad (71)$$

Die entsprechenden Ausdrücke für den stabilen Fixpunkt, müssen numerisch berechnet werden. Die Werte von  $K^{\text{hyp}}$  und  $S^{\text{hyp}}$  in Gleichung (66) müssen durch Integration der dynamischen Gleichungen entlang des heteroklinen Orbits berechnet werden, welcher die stabilen und die hyperbolischen Fixpunkte miteinander verbindet. Zur Bestimmung des heteroklinen Orbits wählen wir die Anfangsbedingungen so, dass  $M_1$  und  $M_2$  im stabilen Fixpunkt von Gleichung (92) und Gleichung (93) liegen. Die Energie des Systems wird auf Null gesetzt. Diese Bedingungen führen dazu, dass einer der beiden Impulse  $p_1$  oder  $p_2$  unbestimmt sind. Sein Wert wird durch die Minimierung des Abstandes der entsprechende Trajektorie zum hyperbolischen Fixpunkt im Ursprung ermittelt.

In Abbildung 59 stellen wir die Ergebnisse unserer Rechnungen für unterschiedliche Zelllängen dar. Die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Simulation und der Näherung der Schaltzeit (57) ist bemerkenswert gut, wenn man die hohe Anzahl an Näherung berücksichtigt, die wir verwendet haben. Die Schaltzeit  $\tau$  nimmt mit zunehmender Molekuelzahl  $\Omega$  exponentiell zu. Die Abhängigkeit der Schaltzeit von der Zelllänge ist im wesentlichen auch exponentiell. Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, dass intrazelluläre Fluktuationen mit wachsender Zelllänge abnehmen [23].

### 11.3.3 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel haben wir den Einfluss von molekularem Rauschen auf die Selbstorganisation polar lokalisierter Proteine in stäbchenförmigen Bakterien untersucht. Wir fanden heraus, dass das kooperative Binden von Proteinen an die Zellmembran eine wesentliche Voraussetzung für die Bildung von asymmetrischen Proteinverteilungen entlang der Längsachse des Bakteriums ist. Unter Verwendung von stochastischen Simulationen und der Untersuchung des Systems im Grenzfall von schwachem Rauschen fanden wir heraus, dass Fluktuationen in der Proteinverteilung zum Schalten zwischen zwei spiegelsymmetrischen Lösungen führen kann. Die Schaltfrequenz nimmt exponentiell mit der Zelllänge ab. Dieses Erkenntnis stimmt mit den experimentellen Beobachtungen überein, die man bei Untersuchungen des Min-Systems im Bakterium *E. coli* macht [23]. Daraus lässt sich schließen, dass die Stabilität der räumlichen Muster stärker von der Anzahl der Proteine im Bakterium als von der Proteindichte abhängig ist.

In unserer Untersuchung haben wir die Aufmerksamkeit auf den Grenzfall von schwachem Rauschen gelenkt, was der Verwendung einer Fokker-Planck Gleichung innewohnt. In zukünftigen Untersuchungen könnte es interessant sein zu sehen, ob unser Ansatz erweiterbar für die Untersuchung von stärkerem Rauschen ist. Zum Beispiel könnte man den Ansatz von Wu & Wang [99] verwenden, um die Stabilität der heterogenen Zustände als Funktion der Gesamtanzahl an Proteinen zu untersuchen um damit die Minimalzahl an Proteinen zu bestimmen, die gebraucht wird um eine polare Lokalisation zu erzielen.

Der Mechanismus der Selbstorganisation den wir untersucht haben, basiert auf dem kooperativem Binden der Moleküle an eine Membran und dem spontanen Ablösen dieser Moleküle. Dieses sehr einfache Modell könnte durch andere molekulare Mechanismen erweitert werden. Zum Beispiel könnten membrangebundene Moleküle in zwei Zuständen existieren. Die Proteine würden so kooperativ im ersten Zustand an die Membran binden und sich auf der Membran in den zweiten Zustand umwandeln. In diesem Zustand würden sie sich dann von der Membran ablösen. Unter zellulären Gesichtspunkten könnte die Umwandlung in den zweiten Zustand an die Hydrolyse von ATP gebunden sein. Wenn nun die Umwandlung in den zweiten Zustand spontan abläuft, ändert sich das Verhalten des Systems im Gegensatz zu dem in diesem Kapitel diskutierten Modell nur geringfügig. Wenn hingegen die Moleküle im zweiten Zustand das Ablösen der Proteine im ersten Zustand induzieren, nimmt die

Schaltzeit mit zunehmender Proteinzahl bzw. zunehmender Systemlänge ab. Dieses Verhalten ähnelt dem Verhalten des Min-Systems, siehe Abbildung 11 [23, 10]. Falls die Proteine im zweiten Zustand die Umwandlung der Proteine vom ersten in den zweiten Zustand katalysieren, kann das System spontan oszillieren.

Eine mögliche biologische Bedeutung unserer Erkenntnisse könnte sein, dass Proteinmuster weniger sensitiv gegenüber molekularem Rauschen sind, wenn die Zelle mit zunehmendem Alter mehr Teilchen beinhaltet. Wenn die Zelle wächst nimmt sowohl die Anzahl an Molekülen wie auch die Stabilität der Cluster zu. Ähnlich werden auch die Min-Oszillationen weniger verrauscht, wenn die Zelllänge zunimmt [23, 10].

Teil I

ANHANG



## ANHANG

---

A.1 EINDIMENSIONALE VERSION DER DYNAMISCHEN GLEICHUNGEN UND MUSTERBILDUNG DER MIN-PROTEINE IN WACHSENDEN ZELLEN

Die wichtigsten Merkmale der Musterbildung der Min-Proteine in zellulären Geometrien, können durch das Studium einer eindimensionalen Version der dynamischen Gleichungen erhalten werden. Wie sich mathematisch exakt die eindimensionale Version aus der dreidimensionalen Version ableiten lässt, ist bis dato nicht ersichtlich. Eine eindimensionale Version der Gleichungen, die alle Prozesse der vollen Gleichungen berücksichtigt, kann jedoch intuitiv geschrieben werden als

$$\begin{aligned} \partial_t c_D &= D_D \partial_x^2 c_D - c_D (\omega_D + \omega_{dD} c_d) (c_{\max} - c_d - c_{de}) / c_{\max} \\ &\quad + (\omega_{de,m} + \omega_{de,c}) c_{de} \end{aligned} \quad (72)$$

$$\partial_t c_E = D_E \partial_x^2 c_E - \omega_E c_E c_d + \omega_e c_e + \omega_{de,c} c_{de} \quad (73)$$

$$\begin{aligned} \partial_t c_d &= D_d \partial_x^2 c_d + c_D (\omega_D + \omega_{dD} c_d) (c_{\max} - c_d - c_{de}) / c_{\max} \\ &\quad - \omega_E c_E c_d - \omega_{ed} c_e c_d \end{aligned} \quad (74)$$

$$\begin{aligned} \partial_t c_{de} &= D_{de} \partial_x^2 c_{de} + \omega_E c_E c_d + \omega_{ed} c_e c_d \\ &\quad - (\omega_{de,m} + \omega_{de,c}) c_{de} \end{aligned} \quad (75)$$

$$\partial_t c_e = D_e \partial_x^2 c_e + \omega_{de,m} c_{de} - \omega_{ed} c_e c_d - \omega_e c_e \quad (76)$$

Die Liniendichten  $c_D$  and  $c_E$  beschreiben die zytosolische Verteilung der Proteine MinD und MinE, entlang der Längsachse des Bakteriums. Die Liniendichten  $c_d$ ,  $c_{de}$  und  $c_e$  entsprechen den Dichten von membrangebundenem MinD, der MinDE-Komplexe bzw. von MinE.

Zum Lösen der Gleichungen (72)-(76) in wachsenden Zellen, verwenden wir an den Rändern der eindimensionalen Geometrie No-Flux Randbedingungen. Die Länge der Zelle bzw. des Intervalls wird durch das Einfügen diskrete Elemente an zufällig ausgewählten Orten vergrößert, wodurch das Wachstum der Zelle simuliert wird. Die Wachstumsrate wurde in Abbildung 8 auf  $2 \cdot 10^{-3} \frac{\mu m}{s}$  gesetzt. In den eingefügten Elementen werden die zytosolischen Dichten von MinD und MinE mit den Werten  $C_D=8.4 \cdot 10^2 \mu m^{-1}$  und  $C_E=5.8 \cdot 10^2 \mu m^{-1}$  initialisiert, wobei die Dichten der membrangebundenen Proteine auf Null gesetzt werden.

A.2 BESTIMMUNG DER MITTLEREN LEBENSZEIT VON MEMBRAN-  
GEBUNDENEM MIND UND MINE

Der Ablöseprozess eines membrangebundenen MinD-Moleküls beginnt mit der Bildung eines MinDE-Komplexes. Da MinE sowohl im zytosolischen als auch im membrangebundenen Zustand an freies MinD binden kann, erfolgt das Binden von MinE an membrangebundenes MinD mit der Gesamtrate  $\omega_E c_E + \omega_{ed} c_e$ . Danach erfolgt die Hydrolyse von MinD mit der Gesamtrate  $\omega_{de,c} + \omega_{de,m}$ . Die mittlere Lebenszeit eines membrangebundenen MinD Moleküls ergibt sich somit zu

$$\langle \tau_D \rangle = (\omega_E c_E + \omega_{ed} c_e)^{-1} + (\omega_{de,c} + \omega_{de,m})^{-1} \quad . \quad (77)$$

Zur Bestimmung der Lebenszeit von MinE auf der Membran, betrachten wir MinE im MinDE-Komplex. Von dort verlässt MinE mit der Wahrscheinlichkeit  $f_1 = \omega_{de,c} / (\omega_{de,c} + \omega_{de,m})$  die Membran oder bleibt mit der Wahrscheinlichkeit  $1 - f_1$  als freies Molekül im membrangebundenen Zustand zurück, nachdem sich MinD gelöst hat. Das Ablösen von MinE ins Zytoplasma erfolgt mit der Rate  $\omega_{de,c}$ , während das Ablösen mit anschließendem Binden an die Membran mit der Rate  $\omega_{de,m}$  erfolgt. Die mittlere Lebenszeit lässt sich somit schreiben als

$$\langle \tau_E \rangle = f_1 \omega_{de,c}^{-1} + (1 - f_1) (\omega_{de,m}^{-1} + \langle \tau_{E,M} \rangle), \quad (78)$$

wobei  $\langle \tau_{E,M} \rangle$  die mittlere Lebenszeit eines freien MinE-Moleküls auf der Membran ist. Als freies Molekül verlässt MinE mit der Wahrscheinlichkeit  $f_2 = \omega_e / (\omega_e + \omega_{ed} c_d)$  die Membran oder bindet mit der Wahrscheinlichkeit  $1 - f_2$  an ein neues membrangebundenes MinD-Molekül. Die Rate mit der ein freies MinE-Molekül die Membran verlässt, beträgt  $\omega_e$ , während sich das Binden von MinE an ein neues MinD-Molekül mit der Rate  $\omega_{ed} c_d$  ereignet. Für  $\langle \tau_{E,M} \rangle$  gilt somit

$$\langle \tau_{E,M} \rangle = f_2 \omega_e^{-1} + (1 - f_2) ((\omega_{ed} c_d)^{-1} + \langle \tau_E \rangle) \quad (79)$$

Durch das Einsetzen der Gleichung (79) in Gleichung (78) und dem anschließenden Auflösen nach  $\langle \tau_E \rangle$ , erhalten wir für die mittlere Lebenszeit von MinE auf der Membran

$$\langle \tau_E \rangle = \frac{2(\omega_{de,m} + \omega_{ed} c_d + \omega_e)}{\omega_{de,c} \omega_{ed} c_d + (\omega_{de,c} + \omega_{de,m}) \omega_e} \quad . \quad (80)$$

## A.3 EFFEKTIVE ZWEIDIMENSIONALE BESCHREIBUNG DES INVITRO-SYSTEMS

Entsprechend der eindimensionalen Beschreibung in Abschnitt A.1, lässt sich auch eine effektive zweidimensionale Beschreibung der vollen dynamischen Gleichungen ableiten, mit deren Hilfe die Musterbildung des *in vitro* Systems reproduziert werden kann. Entsprechend der vollen Gleichungen, bezeichnen  $c_D$  und  $c_E$  die Dichten von zytosolischem MinD und MinE, sowie  $c_d$ ,  $c_{de}$  und  $c_e$  die Dichte von membrangebundenem MinD, des MinDE-Komplexes bzw. von MinE. In der effektiven zweidimensionalen Beschreibung sind alle Dichten, Oberflächendichten. Die Dichten  $c_d$ ,  $c_{de}$  und  $c_e$  sind in den Simulationen auf die Regionen der Membran beschränkt. Die Regionen der inerten Goldschicht sind ausschließlich für zytosolisches MinD und MinE zugänglich. Die Gleichungen lauten

$$\begin{aligned} \partial_t c_D = & D_D \Delta c_D - c_D (\omega_D + \omega_{dD} c_d) (c_{\max} - c_d - c_{de}) / c_{\max} \\ & + (\omega_{de,m} + \omega_{de,c}) c_{de} \end{aligned} \quad (81)$$

$$\partial_t c_E = D_E \Delta c_E - \omega_{EC} c_d + \omega_{de,c} c_{de} + \omega_e c_e \quad (82)$$

$$\begin{aligned} \partial_t c_d = & D_d \Delta c_d + c_D (\omega_D + \omega_{dD} c_d) (c_{\max} - c_d - c_{de}) / c_{\max} \\ & - \omega_{EC} c_d - \omega_{ed} c_e c_d \end{aligned} \quad (83)$$

$$\partial_t c_{de} = D_{de} \Delta c_{de} + \omega_{EC} c_d + \omega_{ed} c_e c_d - (\omega_{de,m} + \omega_{de,c}) c_{de} \quad (84)$$

$$\partial_t c_e = D_e \Delta c_e + \omega_{de,m} c_{de} - \omega_{ed} c_e c_d - \omega_e c_e \quad (85)$$

Für die Diffusionsströme von zytosolischem MinD und MinE, verwenden wir periodische Randbedingungen an den Außenrändern des Systems. Zusätzlich verwenden wir No-Flux Randbedingungen für die Ströme der membrangebundenen Proteine an den Grenzen zwischen der inerten Goldschicht und der Membran. Die Bezeichnungen der Konstanten entspricht den Bezeichnungen der Konstanten des vollen Systems. Ihre Werte sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

|  |  |  |                                       |                                       |
|--|--|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
| $D_D$  | $D_E$  | $D_d$  | $D_e$                                 | $D_{de}$                              |
| $50 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$              | $50 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$              | $0.24 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$              | $0.48 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ | $0.24 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ |
| $c_{\max}$                                       | $\omega_D$                                       | $\omega_e$   | $C_{D0}$                              | $C_{E0}$                              |
| $2.0 \cdot 10^4 \frac{1}{\mu\text{m}^2}$         | $0.045 \frac{1}{\text{s}}$                       | $0.08 \frac{1}{\text{s}}$                          | $2900 \frac{1}{\mu\text{m}^2}$        | $1300 \frac{1}{\mu\text{m}^2}$        |
| $\omega_{dD}$                                    | $\omega_E$                                       | $\omega_{ed}$                                      | $\omega_{de,c}$                       | $\omega_{de,m}$                       |
| $9 \cdot 10^{-4} \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ | $5 \cdot 10^{-4} \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ | $2.5 \cdot 10^{-3} \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ | $0.08 \frac{1}{\text{s}}$             | $0.8 \frac{1}{\text{s}}$              |

Tabelle 3: Parameterwerte, welche in Abbildung 20 verwendet wurden.

#### A.4 DETERMINISTISCHE GLEICHUNGEN IN DER GALERKIN NÄHERUNG

Wie wir im Haupttext gesehen haben, können wir in der Galerkin-Näherung die Entwicklungen (46) und (47) für  $n=2$  abbrechen

$$c(x, t) = C_0(t) + C_1(t) \cos(\pi x/L) + C_2(t) \cos(2\pi x/L) \quad (86)$$

$$m(x, t) = M_0(t) + M_1(t) \cos(\pi x/L) + M_2(t) \cos(2\pi x/L), \quad (87)$$

womit wir eine Beschreibung erhalten, die die wesentlichen Eigenschaften unser Systems bewahrt. Setzt man die Entwicklungen nun in die Gleichungen (43)- (44) ein und integriert über  $x$ , so erhält man

$$\begin{aligned} \dot{C}_0 = & - \left( 1 + M_0^2 + \frac{1}{2}M_1^2 + \frac{1}{2}M_2^2 \right) C_0 - \left( M_0M_1 + \frac{1}{2}M_1M_2 \right) C_1 \\ & - \left( M_0M_2 + \frac{1}{4}M_1^2 \right) C_2 + kM_0 \end{aligned} \quad (88)$$

$$\begin{aligned} \dot{C}_1 = & - \left( \frac{\pi}{L} \right)^2 C_1 - (2M_0M_1 + M_1M_2) C_0 \\ & - \left( 1 + M_0^2 + M_0M_2 + \frac{3}{4}M_1^2 + \frac{1}{2}M_2^2 \right) C_1 \\ & - (M_0M_1 + M_1M_2) C_2 + kM_1 \end{aligned} \quad (89)$$

$$\begin{aligned} \dot{C}_2 = & - \left( \frac{2\pi}{L} \right)^2 C_2 - \left( 2M_0M_2 + \frac{1}{2}M_1^2 \right) C_0 \\ & - (M_0M_1 + M_1M_2) C_1 \\ & - \left( 1 + M_0^2 + \frac{1}{2}M_1^2 + \frac{3}{4}M_2^2 \right) C_2 + kM_2 \end{aligned} \quad (90)$$

$$\begin{aligned} \dot{M}_0 = & \left( 1 + M_0^2 + \frac{1}{2}M_1^2 + \frac{1}{2}M_2^2 \right) C_0 + \left( M_0M_1 + \frac{1}{2}M_1M_2 \right) C_1 \\ & + \left( M_0M_2 + \frac{1}{4}M_1^2 \right) C_2 - kM_0 \end{aligned} \quad (91)$$

$$\begin{aligned} \dot{M}_1 = & -D \left( \frac{\pi}{L} \right)^2 M_1 + (2M_0M_1 + M_1M_2) C_0 \\ & + \left( 1 + M_0^2 + M_0M_2 + \frac{3}{4}M_1^2 + \frac{1}{2}M_2^2 \right) C_1 \\ & + (M_0M_1 + M_1M_2) C_2 - kM_1 \end{aligned} \quad (92)$$

$$\begin{aligned}
\dot{M}_2 = & -D \left( \frac{2\pi}{L} \right)^2 M_2 + \left( 2M_0M_2 + \frac{1}{2}M_1^2 \right) C_0 \\
& + (M_0M_1 + M_1M_2) C_1 + \left( 1 + M_0^2 + \frac{1}{2}M_1^2 + \frac{3}{4}M_2^2 \right) C_2 - kM_2.
\end{aligned} \tag{93}$$

Die Koeffizienten der Diffusionsmatrix D in Gl. (56) lauten in der Galerkin-Näherung

$$\begin{aligned}
D_{11} = & \left( 2 + 2M_0^2 + \frac{3}{2}M_1^2 + M_2^2 + 2M_0M_2 \right) C_0 \\
& + (3M_0M_1 + 2M_1M_2) C_1 \\
& + \left( 1 + M_0^2 + M_1^2 + \frac{3}{4}M_2^2 + 2M_0M_2 \right) C_2 \\
& + 2kM_0 + \left( k - 4\frac{\pi^2}{L^2}D \right) M_2
\end{aligned} \tag{94}$$

$$\begin{aligned}
D_{12} = D_{21} = & (2M_0M_1 + 2M_1M_2) C_0 \\
& + \left( 1 + M_0^2 + M_1^2 + \frac{3}{4}M_2^2 + 2M_0M_2 \right) C_1 \\
& + \left( 2M_0M_1 + \frac{3}{2}M_1M_2 \right) C_2 + \left( k - 4\frac{\pi^2}{L^2}D \right) M_1
\end{aligned} \tag{95}$$

$$\begin{aligned}
D_{22} = & \left( 2 + 2M_0^2 + M_1^2 + \frac{3}{2}M_2^2 \right) C_0 \\
& + \left( 2M_0M_1 + \frac{3}{2}M_1M_2 \right) C_1 \\
& + \left( \frac{3}{4}M_1^2 + 3M_0M_2 \right) C_2 + 2kM_0.
\end{aligned} \tag{96}$$



## LITERATUR

---

- [1] ALBERTS, B. ; BRAY, D. ; LEWIS, J. ; RAFF, M. ; ROBERTS, K. ; WATSON, J.D.: *Molecular Biology of the Cell*. 4th. Garland, 2002
- [2] HOWARD, Martin ; KRUSE, Karsten: Cellular organization by self-organization mechanisms and models for Min protein dynamics. In: *The Journal of cell biology* 168 (2005) Nr. 4, S. 533–536
- [3] LOOSE, Martin ; FISCHER-FRIEDRICH, Elisabeth ; RIES, Jonas ; KRUSE, Karsten ; SCHWILLE, Petra: Spatial regulators for bacterial cell division self-organize into surface waves in vitro. In: *Science* 320 (2008) Nr. 5877, S. 789–792
- [4] GREENFIELD, Derek ; McEVOY, Ann L ; SHROFF, Hari ; CROOKS, Gavin E ; WINGREEN, Ned S ; BETZIG, Eric ; LIPHARDT, Jan: Self-organization of the Escherichia coli chemotaxis network imaged with super-resolution light microscopy. In: *PLoS biology* 7 (2009) Nr. 6, e1000137
- [5] DUKE, T A ; BRAY, D: Heightened sensitivity of a lattice of membrane receptors. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (Aug. 1999) Nr. 18, S. 10104–10108
- [6] McMAHON, Harvey T ; BOUCROT, Emmanuel: Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. In: *Nature reviews Molecular cell biology* 12 (2011) Nr. 8, S. 517–533
- [7] REITHER, Gregor ; SCHAEFER, Michael ; LIPP, Peter: PKC $\alpha$ : a versatile key for decoding the cellular calcium toolkit. In: *The Journal of Cell Biology* 174 (2006) Nr. 4, S. 521–533
- [8] FISCHER-FRIEDRICH, Elisabeth ; MEACCI, Giovanni ; LUTKENHAUS, Joe ; CHATÉ, Hugues ; KRUSE, Karsten: Intra- and intercellular fluctuations in Min-protein dynamics decrease with cell length. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (Apr. 2010) Nr. 14, S. 6134–9
- [9] SLIUSARENKO, Oleksii ; HEINRITZ, Jennifer ; EMONET, Thierry ; JACOBS-WAGNER, Christine: High-throughput, subpixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics. In: *Mol Microbiol* 80 (2011) Nr. 3, S. 612–627

- [10] BONNY, M. ; FISCHER-FRIEDRICH, E. ; LOOSE, M. ; SCHWILLE, P. ; KRUSE, K.: Membrane Binding of MinE Allows for a Comprehensive Description of Min-Protein Pattern Formation. In: *PLoS Comput Biol* 9 (2013) Nr. 12, e1003347
- [11] QUISEL, J D ; LIN, D C ; GROSSMAN, A D: Control of development by altered localization of a transcription factor in *B. subtilis*. In: *Mol Cell* 4 (Nov. 1999) Nr. 5, S. 665–672
- [12] MARSTON, A L ; ERRINGTON, J: Dynamic movement of the ParA-like Soj protein of *B. subtilis* and its dual role in nucleoid organization and developmental regulation. In: *Mol Cell* 4 (Nov. 1999) Nr. 5, S. 673–682
- [13] HILDEBRAND, M ; MIKHAILOV, A S: Mesoscopic Modeling in the Kinetic Theory of Adsorbates. In: *J. Phys. Chem.* 100 (1996) Nr. 49, S. 19089–19101
- [14] MAIER, Robert S ; STEIN, Daniel L: Escape problem for irreversible systems. In: *Phys Rev E* 48 (1993) Nr. 2, S. 931
- [15] FREIDLIN, Mark I ; SZÜCS, Joseph ; WENTZELL, Alexander D: *Random perturbations of dynamical systems*. Bd. 260. Springer, 2012
- [16] YU, X C ; MARGOLIN, W: FtsZ ring clusters in min and partition mutants: role of both the Min system and the nucleoid in regulating FtsZ ring localization. In: *Molecular microbiology* 32 (Apr. 1999) Nr. 2, S. 315–26
- [17] BERNHARDT, Thomas G ; BOER, Piet a J de: SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. In: *Molecular cell* 18 (Mai 2005) Nr. 5, S. 555–64
- [18] LOOSE, Martin ; KRUSE, Karsten ; SCHWILLE, Petra: Protein self-organization: lessons from the min system. In: *Annu Rev Biophys* 40 (2011), S. 315–336
- [19] RASKIN, D M ; BOER, Piet A J de: Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (Apr. 1999) Nr. 9, S. 4971–4976
- [20] HU, Z L ; LUTKENHAUS, Joe: Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE. In: *Mol Microbiol* 34 (1999) Nr. 1, S. 82–90

- [21] DREW, Donald A ; OSBORN, Mary J ; ROTHFIELD, Lawrence I: A polymerization-depolymerization model that accurately generates the self-sustained oscillatory system involved in bacterial division site placement. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (Apr. 2005) Nr. 17, S. 6114–6118
- [22] VARMA, Archana ; HUANG, Kerwyn Casey ; YOUNG, Kevin D: The Min system as a general cell geometry detection mechanism: branch lengths in Y-shaped Escherichia coli cells affect Min oscillation patterns and division dynamics. In: *J Bacteriol* 190 (2008) Nr. 6, S. 2106–2117
- [23] FISCHER-FRIEDRICH, Elisabeth ; MEACCI, Giovanni ; LUTKENHAUS, Joe ; CHATÉ, Hugues ; KRUSE, Karsten: Intra- and intercellular fluctuations in Min-protein dynamics decrease with cell length. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 107 (Apr. 2010) Nr. 14, S. 6134–6139
- [24] LUTKENHAUS, Joe: Assembly Dynamics of the Bacterial MinC-DE System and Spatial Regulation of the Z Ring. In: *Annu Rev Biochem* 76 (2007) Nr. 1, S. 539–562
- [25] HOWARD, Martin ; KRUSE, Karsten: Cellular organization by self-organization: mechanisms and models for Min protein dynamics. In: *J Cell Biol* 168 (2005) Nr. 4, S. 533–536
- [26] MEINHARDT, H ; BOER, Piet A J de: Pattern formation in Escherichia coli: A model for the pole-to-pole oscillations of Min proteins and the localization of the division site. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001) Nr. 25, S. 14202–14207
- [27] HOWARD, M ; RUTENBERG, Andrew D ; VET, S de: Dynamic compartmentalization of bacteria: accurate division in E. coli. In: *Physical Review Letters* 87 (2001) Nr. 27 Pt 1, S. 278102
- [28] HUANG, K C ; MEIR, Y ; WINGREEN, Ned S: Dynamic structures in Escherichia coli: Spontaneous formation of MinE rings and MinD polar zones. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003) Nr. 22, S. 12724–12728
- [29] PAVIN, Nenad ; PALJETAK, Hana Cipčić ; KRSTIĆ, Vladimir: Min-protein oscillations in Escherichia coli with spontaneous formation of two-stranded filaments in a three-dimensional stochastic reaction-diffusion model. In: *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 73 (2006) Nr. 2 Pt 1, S. 21904
- [30] KRUSE, Karsten: A dynamic model for determining the middle of Escherichia coli. In: *Biophys J* 82 (2002) Nr. 2, S. 618–627
- [31] MEACCI, Giovanni ; KRUSE, Karsten: Min-oscillations in Escherichia coli induced by interactions of membrane-bound proteins. In: *Physical Biology* 2 (2005) Nr. 2, S. 89–97

- [32] LOOSE, Martin ; FISCHER-FRIEDRICH, Elisabeth ; HEROLD, Christoph ; KRUSE, Karsten ; SCHWILLE, Petra: Min protein patterns emerge from rapid rebinding and membrane interaction of MinE. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 (2011) Nr. 5, S. 577–583
- [33] PARK, Kyung-Tae ; WU, Wei ; BATTLE, Kevin P ; LOVELL, Scott ; HOLYOAK, Todd ; LUTKENHAUS, Joe: The Min oscillator uses MinD-dependent conformational changes in MinE to spatially regulate cytokinesis. In: *Cell* 146 (Aug. 2011) Nr. 3, S. 396–407
- [34] SCHWEIZER, Jakob ; LOOSE, Martin ; BONNY, Mike ; KRUSE, Karsten ; MÖNCH, Ingolf ; SCHWILLE, Petra: Geometry sensing by self-organized protein patterns. In: *PNAS* 109 (Sep. 2012) Nr. 38, S. 15283–15288
- [35] SZETO, Tim H ; ROWLAND, Susan L ; ROTHFIELD, Lawrence I ; KING, Glenn F: Membrane localization of MinD is mediated by a C-terminal motif that is conserved across eubacteria, archaea, and chloroplasts. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (Nov. 2002) Nr. 24, S. 15693–15698
- [36] HU, Zonglin ; LUTKENHAUS, Joe: A conserved sequence at the C-terminus of MinD is required for binding to the membrane and targeting MinC to the septum. In: *Mol Microbiol* 47 (2003) Nr. 2, S. 345–355
- [37] LACKNER, Laura L ; RASKIN, David M ; BOER, Piet A J de: ATP-dependent interactions between *Escherichia coli* Min proteins and the phospholipid membrane in vitro. In: *J Bacteriol* 185 (2003) Nr. 3, S. 735–749
- [38] SZETO, Tim H ; ROWLAND, Susan L ; HABRUKOWICH, Cheryl L ; KING, Glenn F: The MinD membrane targeting sequence is a transplantable lipid-binding helix. In: *J Biol Chem* 278 (2003) Nr. 41, S. 40050–40056
- [39] WU, Wei ; PARK, Kyung-Tae ; HOLYOAK, Todd ; LUTKENHAUS, Joe: Determination of the structure of the MinD-ATP complex reveals the orientation of MinD on the membrane and the relative location of the binding sites for MinE and MinC. In: *Mol Microbiol* 79 (2011) Nr. 6, S. 1515–1528
- [40] MILEYKOVSKAYA, Eugenia ; FISHOV, Itzhak ; FU, Xueyao ; CORBIN, Brian D ; MARGOLIN, William ; DOWHAN, William: Effects of phospholipid composition on MinD-membrane interactions in vitro and in vivo. In: *J Biol Chem* 278 (2003) Nr. 25, S. 22193–22198

- [41] RENNER, L D ; WEIBEL, D B: MinD and MinE Interact with Anionic Phospholipids and Regulate Division Plane Formation in Escherichia coli. In: *Journal of Biological Chemistry* 287 (Nov. 2012) Nr. 46, S. 38835–38844
- [42] ROWLAND, S L ; FU, X ; SAYED, M A ; ZHANG, Y ; COOK, W R ; ROTHFIELD, L I: Membrane Redistribution of the Escherichia coli MinD Protein Induced by MinE. In: *Journal of Bacteriology* 182 (2000) Nr. 3, S. 613–619
- [43] HU, Zonglin ; GOGOL, Edward P ; LUTKENHAUS, Joe: Dynamic assembly of MinD on phospholipid vesicles regulated by ATP and MinE. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002) Nr. 10, S. 6761–6766
- [44] SHIH, Yu-Ling ; LE, Trung ; ROTHFIELD, Lawrence I: Division site selection in Escherichia coli involves dynamic redistribution of Min proteins within coiled structures that extend between the two cell poles. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003) Nr. 13, S. 7865–7870
- [45] SWULIUS, Matthew T ; JENSEN, Grant J: The helical MreB cytoskeleton in Escherichia coli MC1000/pLE7 is an artifact of the N-Terminal yellow fluorescent protein tag. In: *J Bacteriol* 194 (2012) Nr. 23, S. 6382–6386
- [46] LANDGRAF, Dirk ; OKUMUS, Burak ; CHIEN, Peter ; BAKER, Tania A ; PAULSSON, Johan: Segregation of molecules at cell division reveals native protein localization. In: *Nat. Methods* 9 (2012) Nr. 5, S. 480–482
- [47] MA, Lu-Yan ; KING, Glenn ; ROTHFIELD, Lawrence I: Mapping the MinE site involved in interaction with the MinD division site selection protein of Escherichia coli. In: *J Bacteriol* 185 (Aug. 2003) Nr. 16, S. 4948–4955
- [48] MA, Luyan ; KING, Glenn F ; ROTHFIELD, Lawrence I: Positioning of the MinE binding site on the MinD surface suggests a plausible mechanism for activation of the Escherichia coli MinD ATPase during division site selection. In: *Mol Microbiol* 54 (2004) Nr. 1, S. 99–108
- [49] BREYER, W A ; MATTHEWS, B W: A structural basis for processivity. In: *Protein Sci.* 10 (Sep. 2001) Nr. 9, S. 1699–1711
- [50] PARK, Kyung-Tae ; WU, Wei ; LOVELL, Scott ; LUTKENHAUS, Joe: Mechanism of the asymmetric activation of the MinD ATPase by MinE. In: *Mol Microbiol* 85 (2012) Nr. 2, S. 271–281

- [51] MEACCI, G ; RIES, J ; FISCHER-FRIEDRICH, E ; KAHYA, N ; SCHWILLE, Petra ; KRUSE, Karsten: Mobility of Min-proteins in Escherichia coli measured by fluorescence correlation spectroscopy. In: *Physical Biology* 3 (Nov. 2006) Nr. 4, S. 255–263
- [52] LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J ; SNAPP, E ; KENWORTHY, A: Studying protein dynamics in living cells. In: *Nat Rev Mol Cell Bio* 2 (2001) Nr. 6, S. 444–456
- [53] KERR, Rex A ; LEVINE, Herbert ; SEJNOWSKI, Terrence J ; RAPPEL, Wouter-Jan: Division accuracy in a stochastic model of Min oscillations in Escherichia coli. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006) Nr. 2, S. 347–352
- [54] FANGE, David ; ELF, Johan: Noise-induced Min phenotypes in E. coli. In: *PLoS Comput Biol* 2 (2006) Nr. 6, e80
- [55] SHIH, Y L ; FU, X L ; KING, G F ; LE, T ; ROTHFIELD, Lawrence I: Division site placement in E.coli: mutations that prevent formation of the MinE ring lead to loss of the normal midcell arrest of growth of polar MinD membrane domains. In: *Embo J* 21 (2002) Nr. 13, S. 3347–3357
- [56] ARJUNAN, Satya Nanda Vel ; TOMITA, Masaru: A new multicompartmental reaction-diffusion modeling method links transient membrane attachment of E. coli MinE to E-ring formation. In: *Syst Synth Biol* 4 (2010) Nr. 1, S. 35–53
- [57] GITAI, Zemer ; DYE, Natalie Anne ; REISENAUER, Ann ; WACHI, Masaaki ; SHAPIRO, Lucy: MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. In: *Cell* 120 (2005) Nr. 3, S. 329–341
- [58] CORBIN, Brian D ; YU, X C ; MARGOLIN, William: Exploring intracellular space: function of the Min system in round-shaped Escherichia coli. In: *Embo J* 21 (2002), S. 1998–2008
- [59] SHIH, Yu-Ling ; KAWAGISHI, Ikuro ; ROTHFIELD, Lawrence I: The MreB and Min cytoskeletal-like systems play independent roles in prokaryotic polar differentiation. In: *Mol Microbiol* 58 (2005) Nr. 4, S. 917–928
- [60] FISCHER-FRIEDRICH, Elisabeth ; VAN YEN, Romain Nguyen ; KRUSE, Karsten: Surface waves of Min-proteins. In: *Physical Biology* 4 (2007) Nr. 1, S. 38–47
- [61] GRAHAM, MD ; KEVREKIDIS, Ioannis G ; ASAKURA, K ; LAUTERBACH, J ; KRISCHER, K ; ROTERMUND, H-H ; ERTL, G: Effects of boundaries on pattern formation: Catalytic oxidation of CO on platinum. In: *Science* 264 (1994) Nr. 5155, S. 80–82

- [62] STEINBOCK, Oliver ; TÓTH, Ágota ; SHOWALTER, Kenneth: Navigating complex labyrinths: optimal paths from chemical waves. In: *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-* (1995), S. 868–868
- [63] SCHWEIZER, J. ; LOOSE, M. ; BONNY, M. ; KRUSE, K. ; MONCH, I. ; SCHWILLE, P.: Geometry sensing by self-organized protein patterns. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Sep. 2012)
- [64] GROVES, Jay T ; ULMAN, Nick ; BOXER, Steven G: Micropatterning fluid lipid bilayers on solid supports. In: *Science* 275 (1997) Nr. 5300, S. 651–653
- [65] ANTONNY, Bruno: Mechanisms of membrane curvature sensing. In: *Annual review of biochemistry* 80 (2011), S. 101–123
- [66] RAMACHANDRAN, Rajesh ; SCHMID, Sandra L: Real-time detection reveals that effectors couple dynamin's GTP-dependent conformational changes to the membrane. In: *The EMBO journal* 27 (Jan. 2008) Nr. 1, S. 27–37
- [67] ROUX, Aurélien ; KOSTER, Gerbrand ; LENZ, Martin ; SORRE, Benoît ; MANNEVILLE, Jean-Baptiste ; NASSOY, Pierre ; BASSEREAU, Patricia: Membrane curvature controls dynamin polymerization. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (2010) Nr. 9, S. 4141–4146
- [68] ZIESKE, Katja ; SCHWEIZER, Jakob ; SCHWILLE, Petra: Surface topology assisted alignment of Min protein waves. In: *FEBS letters* 588 (2014) Nr. 15, S. 2545–2549
- [69] KARP, Gerald ; BEGINNEN, Kurt ; VOGEL, Sebastian ; KUHLMANN-KRIEG, Susanne: *Molekulare Zellbiologie*. Springer, 2005
- [70] PÁLSSON, Eiríkur ; LEE, Kyoung J ; GOLDSTEIN, Raymond E ; FRANKE, Jakob ; KESSIN, Richard H ; COX, Edward C: Selection for spiral waves in the social amoebae *Dictyostelium*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (1997) Nr. 25, S. 13719–13723
- [71] BERRIDGE, Michael J ; LIPP, Peter ; BOOTMAN, Martin D: The versatility and universality of calcium signalling. In: *Nature reviews Molecular cell biology* 1 (2000) Nr. 1, S. 11–21
- [72] BOOTMAN, Martin D ; BERRIDGE, Michael J ; LIPP, Peter: Cooking with Calcium: The Recipes for Composing Global Signals from Elementary Events. In: *Cell* 91 (1997) Nr. 3, S. 367–373
- [73] NISHIZUKA, Yasutomi: Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. In: *Science* 258 (1992) Nr. 5082, S. 607–614

- [74] NISHIZUKA, Yasutomi: Studies and perspectives of protein kinase C. In: *Science* 233 (1986) Nr. 4761, S. 305–312
- [75] DEKKER, Lodewijk V ; PARKER, Peter J: Protein kinase C—a question of specificity. In: *Trends in biochemical sciences* 19 (1994) Nr. 2, S. 73–77
- [76] SCHMITZ-PEIFFER, Carsten ; BIDEN, Trevor J: Protein kinase C function in muscle, liver, and  $\beta$ -cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes. In: *Diabetes* 57 (2008) Nr. 7, S. 1774–1783
- [77] NAKASHIMA, Shigeru: Protein kinase C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ): regulation and biological function. In: *Journal of biochemistry* 132 (2002) Nr. 5, S. 669–675
- [78] COUSSENS, Lisa ; PARKER, Peter J ; RHEE, Lucy ; YANG-FENG, Teresa L ; CHEN, Ellson ; WATERFIELD, Michael D ; FRANCKE, Uta ; ULLRICH, Axel: Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. In: *Science* 233 (1986) Nr. 4766, S. 859–866
- [79] NEWTON, Alexandra C: Protein kinase C: structure, function, and regulation. In: *Journal of Biological Chemistry* 270 (1995) Nr. 48, S. 28495–28498
- [80] BELL, RM ; BURNS, DJ: Lipid activation of protein kinase C. In: *J Biol Chem* 266 (1991) Nr. 8, S. 4661–4664
- [81] HOUSE, Colin ; KEMP, Bruce E: Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. In: *Science* 238 (1987) Nr. 4834, S. 1726–1728
- [82] NEWTON, Alexandra C: Regulation of protein kinase C. In: *Current opinion in cell biology* 9 (1997) Nr. 2, S. 161–167
- [83] TAYLOR, Susan Serota ; RADZIO-ANDZELM, Elzbieta: Three protein kinase structures define a common motif. In: *Structure* 2 (1994) Nr. 5, S. 345–355
- [84] NALEFSKI, E a ; NEWTON, a C: Membrane binding kinetics of protein kinase C betaII mediated by the C2 domain. In: *Biochemistry* 40 (Nov. 2001) Nr. 44, S. 13216–29
- [85] KOHOUT, Susy C ; CORBALÁN-GARCÍA, Senena ; TORRECILLAS, Alejandro ; GOMÉZ-FERNANDÉZ, Juan C ; FALKE, Joseph J: C2 domains of protein kinase C isoforms  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ : Activation parameters and calcium stoichiometries of the membrane-bound state. In: *Biochemistry* 41 (2002) Nr. 38, S. 11411–11424

- [86] SANDO, Julianne J ; CHERTIHIN, Olga I ; OWENS, Jonathan M ; KRETSINGER, Robert H: Contributions to maxima in protein kinase C activation. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998) Nr. 51, S. 34022–34027
- [87] YEH, Ren-Hwa ; YAN, Xiongwei ; CAMMER, Michael ; BRESNICK, Anne R ; LAWRENCE, David S: Real time visualization of protein kinase activity in living cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002) Nr. 13, S. 11527–11532
- [88] BERRIDGE, Michael ; LIPP, Peter ; BOOTMAN, Martin: Calcium signalling. In: *Current biology* 9 (1999) Nr. 5, R157–R159
- [89] DEKKER, Lodewijk V: *Protein Kinase C*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. ISBN: 0306478633
- [90] ELДАР, Avigdor ; ELOWITZ, Michael B: Functional roles for noise in genetic circuits. In: *Nature* 467 (Sep. 2010) Nr. 7312, S. 167–173
- [91] BALÁZSI, Gábor ; OUDENAARDEN, Alexander van ; COLLINS, James J: Cellular Decision Making and Biological Noise: From Microbes to Mammals. In: *Cell* 144 (2011) Nr. 6, S. 910–925
- [92] DOUBROVINSKI, Konstantin ; HOWARD, Martin: Stochastic model for Soj relocation dynamics in *Bacillus subtilis*. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (2005) Nr. 28, S. 9808–9813
- [93] ROMA, D M ; O’FLANAGAN, R A ; RUCKENSTEIN, A E ; SENGUPTA, A M ; MUKHOPADHYAY, R: Optimal path to epigenetic switching. In: *Physical review. E, Statistical physics, plasmas, fluids, and related interdisciplinary topics* 71 (2005) Nr. 1
- [94] ASSAF, Michael ; ROBERTS, Elijah ; LUTHEY-SCHULTEN, Zaida: Determining the Stability of Genetic Switches: Explicitly Accounting for mRNA Noise. In: *Phys. Rev. Lett.* 106 (2011) Nr. 24
- [95] GUÉRIN, T ; PROST, Jacques ; JOANNY, J F: Motion Reversal of Molecular Motor Assemblies due to Weak Noise. In: *Physical Review Letters* 106 (2011) Nr. 6, S. 68101
- [96] GUÉRIN, T ; PROST, Jacques ; JOANNY, J F: Bidirectional motion of motor assemblies and the weak-noise escape problem. In: *Phys Rev E* 84 (2011) Nr. 4, S. 41901
- [97] ELF, J ; EHRENBERG, M: Spontaneous separation of bi-stable biochemical systems into spatial domains of opposite phases. In: *Syst. Biol.* 1 (2004) Nr. 2, S. 230–236
- [98] MAIER, Robert S ; STEIN, Daniel L: Escape problem for irreversible systems. In: *Physical Review E* 48 (1993) Nr. 2, S. 931

- [99] WU, Wei ; WANG, Jin: Potential and flux field landscape theory. I. Global stability and dynamics of spatially dependent non-equilibrium systems. In: *The Journal of chemical physics* 139 (2013) Nr. 12, S. 121920

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

---

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

*Saarbrücken, November 2014*

---

Mike Bonny