

**Mathematische Modellierung und Simulation
von in-silico Protozellen nach dem
Modularisierungs- und Baukastenprinzip**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieurin

(Dr.-Ing.)

von Dipl.-Ing. Eugenia Schneider

geboren am 30.06.1985 in Linjowo

genehmigt durch die Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Achim Kienle

Prof. Dr.-Ing. Martin Mönnigmann

Prof. Dr.-Ing. habil. Michael Mangold

Promotionskolloquium am 21.06.2019

Ehrenerklärung

„Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters habe ich nicht in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Verwendete fremde und eigene Quellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich habe insbesondere nicht wissentlich:

- Ergebnisse erfunden oder widersprüchliche Ergebnisse verschwiegen,
- Statistische Verfahren absichtlich missbraucht, um Daten in ungerechtfertigter Weise zu interpretieren,
- fremde Ergebnisse oder Veröffentlichungen plagiiert,
- fremde Forschungsergebnisse verzerrt wiedergegeben.

Mir ist bekannt, dass Verstöße gegen das Urheberrecht Unterlassungs- und Schadensersatzansprüche des Urhebers sowie eine strafrechtliche Ahndung durch die Strafverfolgungsbehörden begründen kann.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Dissertation ggf. mit Mitteln der elektronischen Datenverarbeitung auf Plagiate überprüft werden kann.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.“

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

Eugenia Schneider and Michael Mangold. Discussion of synchronization problems during cell cycle in artificial cell modeling. *ALIFE 2014: The Fourteenth International Conference on the Synthesis and Simulation of Living Systems*, (26):691-692, July 2014.

Eugenia Schneider and Michael Mangold. Development and analysis of a mathematical model for a synthetic biological cell. *IFAC-PapersOnLine*, 48(1):447-452, January 2015.

Eugenia Schneider, Jakob Schweizer, and Michael Mangold. Bringing the parts together: Steps towards an in-silico protocell. *IFAC-PapersOnLine*, 49(26):20-25, January 2016.

Eugenia Schneider and Michael Mangold. Modular assembling process of an in-silico protocell. *Biosystems*, 165:8-21, March 2018.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vii
Nomenklatur	ix
1 Kurzfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Synthetische Biologie als neuer Wissenschaftszweig	3
2.1.1 Begriffsklärung	4
2.1.2 Biologische Sicherheit in der Synthetischen Biologie	5
2.1.3 Forschungsschwerpunkte in der Synthetischen Biologie	6
2.1.4 Mathematische Modellierung in der Synthetischen Biologie	9
2.2 Zielstellung der Dissertation	9
2.3 Modellierungskonzept einer synthetischen Protozelle	11
2.4 Gliederung der Dissertation	13
3 Funktionale Module einer Protozelle	15
3.1 Funktionale Module innerhalb des MaxSynBio-Konsortiums	15
3.2 Bestehende Protozell-Ansätze in der Literatur	17
3.3 Auswahl der funktionalen Module für die Protozellmodellierung	19
4 Modularisierungsansatz	21
4.1 Modell einer selbst-reproduzierenden in-silico Protozelle	24
4.2 Simulationsergebnisse	29
4.2.1 Selbst-Reproduzierbarkeit	32

4.2.2	Volumenänderung	36
4.3	Zusammenfassung	42
5	Baukastenansatz	47
5.1	Container	48
5.2	Divisom	51
5.2.1	Makroskopisch betrachteter Positionierer	52
5.2.2	Min-Protein-Positionierer	53
5.2.3	Makroskopische kontraktile Einheit mit einem makroskopi- schen Positionierer	56
5.2.4	Makroskopische kontraktile Einheit mit dem Min-Protein-Po- sitionierer	59
5.2.5	FtsZ-basierte kontraktile Einheit mit dem Min-Protein-Po- sitionierer	62
5.3	Konstruktion der modularen in-silico Protozelle und Simulationser- gebnisse	68
5.3.1	Modell A: Örtlich verteilt parametrisiert positionierte, makro- kopische kontraktile Einheit	70
5.3.2	Modell B: Min-Protein positionierte, makroskopische kontrak- tile Einheit	74
5.3.3	Modell C: FtsZ-Ring basierte, kontraktile Einheit positioniert durch Min-Proteine	84
5.4	Zusammenfassung	89
6	Resümee	95
	Literaturverzeichnis	103

Abbildungsverzeichnis

2.1	Bottom-up- und top-down-Ansatz in der Synthetischen Biologie. . . .	5
2.2	Unterschiedliche Herangehensweisen in der theoretischen Synthetischen Biologie.	13
4.1	Vorbildmodelle des in-silico Protozellmodells nach dem Modularisierungsansatz.	23
4.2	Schematische Darstellung des Modells einer in-silico Protozelle basierend auf der Minimalkaskade von Goldbeter und bestehend aus den <i>funktionalen Modulen</i> des Chemoton-Modells von Gánti.	25
4.3	Darstellung der drei verschiedenen Operationsmodi des in-silico Protozellmodells als Petrinetz.	27
4.4	Simulationsergebnisse des in-silico Protozellmodells nach dem Modularisierungsansatz im <i>Normalmodus</i>	31
4.5	Simulationsergebnisse des in-silico Protozellmodells nach dem Modularisierungsansatz im <i>Normalmodus</i> bezüglich Metabolismus- und Polymerisationskomponenten während eines Protozellzyklus.	33
4.6	Simulationsergebnisse des in-silico Protozellmodells nach dem Modularisierungsansatz im <i>Normalmodus</i> bezüglich der Membrankomponenten während eines Protozellzyklus.	34
4.7	Globale Modellrobustheit bezüglich Parameterunsicherheiten.	35
4.8	Simulationsergebnisse der Tochterzelle des in-silico Protozellmodells nach der ersten Protozellteilung im <i>Defizit</i> -Modus.	36
4.9	Simulationsergebnisse des in-silico Protozellmodells nach dem Modularisierungsansatz mit Volumenänderung.	40

Abbildungsverzeichnis

4.10	Simulationsergebnisse der Abhängigkeit des Volumens V des in-silico Protozellmodells nach dem Modularisierungsansatz mit Volumenänderung vom Proportionalitätsfaktor σ	41
4.11	Simulationsergebnisse der zeitlichen Änderung des Metabolismus im in-silico Protozellmodell nach dem Modularisierungsansatz mit Volumenänderung.	42
4.12	Simulationsergebnisse der Änderung der korrespondierenden Modulkomponenten im Polymerisations- und Membranmodul des in-silico Protozellmodells nach dem Modularisierungsansatz mit Volumenänderung.	43
4.13	Simulationsergebnisse der Konzentrationsänderungen von Modulkomponenten des in-silico Protozellmodells nach dem Modularisierungsansatz mit Volumenänderung für $\sigma = 0$	44
5.1	Membran-Modul nach dem Prinzip von Mavelli et al. [43]	50
5.2	Min-Protein-System nach Huang et al. [27]	54
5.3	Makroskopische kontraktile Einheit mit einem makroskopischen Positionierer	57
5.4	Makroskopische kontraktile Einheit mit dem Min-Positionierer	60
5.5	Kontraktile Einheit basierend auf dem FtsZ-Ring nach Surovtsev et al. [83]	63
5.6	Schematische Struktur des Modells A.	72
5.7	Simulationsergebnisse des Precursors P und des Membranlipids L in der Modellvariante A.	73
5.8	Örtliche Verteilung der Anbindungskonstanten $k_{att,d}$ in der Modellvariante A.	74
5.9	Simulationsergebnisse des membrangebundenen kontraktilen Proteins Z_m und des Radius R in der Modellvariante A.	75
5.10	Schematische Struktur der Modellvariante B1 und B2.	77
5.11	Simulationsergebnisse der membrangebundenen Min-Proteine Min_m im Modell B1 des in-silico-Modells nach dem Baukastenprinzip.	79

5.12	Simulationsergebnisse des membrangebundenen kontraktilen Proteins Z_m und des Radius R im Modell B1 des in-silico-Modells nach dem Baukastenprinzip.	80
5.13	Simulationsergebnisse der membrangebundenen Min-Proteine Min_m im Modell B2 des in-silico-Modells nach dem Baukastenprinzip.	81
5.14	Örtliche Verteilung der Nukleoid-Destabilisierungskonstanten $k_{destab_{2,d}}$ in der Modellvariante B2.	82
5.15	Simulationsergebnisse des membrangebundenen kontraktilen Proteins Z_m und des Radius R im Modell B2 des in-silico-Modells nach dem Baukastenprinzip.	83
5.16	Schematische Struktur der Modellvariante C der in-silico Protozelle nach dem Bukastenprinzip.	85
5.17	Simulationsergebnisse der membrangebundenen Min-Proteine Min_m und des membrangebundenen kontraktilen Proteins Z_m in der Modellvariante C des in-silico Protozellmodells nach dem Baukastenprinzip.	88
5.18	Simulationsergebnisse des Radius R in der Modellvariante C des in-silico Protozellmodells nach dem Baukastenprinzip.	89
5.19	Simulationsergebnisse einer Parameterstudie bezüglich der Elongationskonstanten k_{el1} und k_{el2} im Modell C.	90

Tabellenverzeichnis

4.1	Bei der numerischen Berechnung verwendete Anfangsbedingungen und Parametersatz des in-silico Protozell-Modells nach dem Modularisierungsansatz bei konstantem Volumen.	30
4.2	Bei der numerischen Berechnung verwendete Anfangsbedingungen und Parametersatz des in-silico Protozell-Modells nach dem Modularisierungsansatz bei Betrachtung der Volumenänderung.	39
5.1	Definierte <i>funktionale Module</i> einer in-silico Protozelle. Symbolische Darstellung und Nomenklatur.	69
5.2	Anfangsbedingungen und Parametersatz der Modellvariante A des in-silico Protozellmodells nach dem Baukastenprinzip.	71
5.3	Anfangsbedingungen und Parametersatz für die numerische Berechnung des in-silico Protozell-Modells B nach dem Baukastenprinzip. . .	78
5.4	Anfangsbedingungen und Parametersatz für die Modellvariante C des Protozellmodells nach dem Baukastenprinzip.	86
5.5	Vergleich der Rechenzeiten der Modellvarianten der in-silico Protozelle nach dem Baukastenprinzip.	92

Nomenklatur

Einleitung

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction)
ATP	Adenosintriphosphat

Funktionale Module einer Protozelle

DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: deoxyribonucleic acid)
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: ribonucleic acid)
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
ADP	Adenosindiphosphat
GV	großes Vesikel (engl.: giant vesicle)
GUV	großes unilamellares Vesikel (engl.: giant unilamellar vesicle)

Modularisierungsansatz

S_1	Mutterzelle
S_2	Tochterzelle
A	Metabolismus

Nomenklatur

P_t	Polymertemplate
P	wachsender Polymerstrang
M^*	katalytisch inaktive Membranbausteine
M	katalytisch aktive Membranbausteine
A_d	Metabolismuskomponente der Tochterzelle
$P_{t,d}$	Polymertemplate der Tochterzelle
M_d^*	Tochterzellmembran bestehend aus katalytisch inaktiven Membranbausteinen
v_A	Aktivierungsrate des Metabolismus
P_{tot}	Gesamtmenge aller Polymere
M_{tot}	Gesamtmenge aller Membranbausteine
k_P	Polymersynthesekonstante
k_{Pt}	Polymerspaltungskonstante
k_M	Aktivierungskonstante des Membranbausteins
k_{M^*}	Deaktivierungskonstante des Membranbausteins
v_{dA}	Degradationskonstante des Metabolismus
v_{dP}	Degradationskonstante des Polymers
v_{dM}	Degradationskonstante der Membranbausteine
t	Zeit
K_{mdA}	Gleichgewichtskonstante der Metabolismusdegradation
K_{mP}	Gleichgewichtskonstante der Polymersynthese
K_{mPt}	Gleichgewichtskonstante der Polymerspaltung
K_{mM}	Gleichgewichtskonstante der Membranbausteinaktivierung
K_{mM^*}	Gleichgewichtskonstante der Membranbausteindeaktivierung
t_{div}	Teilungszeitpunkt
ZE	Zeiteinheit
V	Volumen
σ	Proportionalitätsparameter
r_M	Gesamtheit der kinetischen Terme der katalytisch aktiven Membranbausteine

Baukastenansatz

nx	Anzahl der Stützstellen
j_η	Massenstrom der Spezies η
η	Spezies
x	Ortskoordinate
R	Radius
P_{ext}	externe Precursorkonzentration
k_{perm}	Permeabilitätskonstante
P	intrazellulärer Precursor
E	Enzym
k_{lip}	Lipidbildungskonstante
L	Lipid
W	Nebenprodukt
k_{in}	Lipideinbaukonstante
L_m	in die Membran eingebautes Lipid
r_{perm}	Permeabilitätsrate
r_{lip}	Lipidbildungsrate
r_{in}	Lipideinbaurrate
L_{eq}	Gleichgewichtskonstante des Lipideinbaus
\dot{x}	Änderung der Zylinderlänge
D_{mem}	Diffusionskoeffizient
j_P	Precursormassenstrom
j_L	Lipidmassenstrom
j_E	Enzymmassenstrom
α_L	spezifische Lipidoberfläche
$k_{att,d}$	örtlich verteilte Anbindungskonstante
Z	kontraktiler Protein
k_{att}	Anbindungskonstante
x_{opt}	erwarteter Anbindungsbereich der Z-Proteine auf der Membran
σ	Standardabweichung der Normalverteilung

Nomenklatur

$MinD_{ADP}$	cytosolisches ADP-bindendes <i>MinD</i> -Protein
k_1	Nukleotidaustauschkonstante
$MinD_{ATP,c}$	cytosolisches ATP-bindendes <i>MinD</i> -Protein
k_2	$MinD_{ATP,c}$ -Bindungskonstante
$MinD_{ATP,m}$	membrangebundenes ATP-bindendes <i>MinD</i> -Protein
k_3	$MinD_{ATP,c}$ -Bereitstellungskonstante
$MinDE_m$	membrangebundener <i>MinD</i> - <i>MinE</i> -Proteinkomplex
$MinE$	cytosolisches <i>MinE</i> -Protein
k_4	<i>MinE</i> -Bindungskonstanten
k_5	Dephosphorylierungskonstante
r_1	Nukleotidaustauschrate
r_2	$MinD_{ATP,c}$ -Bindungsrate
r_{31}	$MinD_{ATP,c}$ -Bereitstellungsrate durch $MinD_{ATP,m}$
r_{32}	$MinD_{ATP,c}$ -Bereitstellungsrate durch $MinDE_m$
r_4	<i>MinE</i> -Bindungsrate
r_5	Dephosphorylierungsrate
$MinC$	Min-Protein
$j_{D_{ADP}}$	$MinD_{ADP}$ -Massenstrom
$j_{D_{ATP,c}}$	$MinD_{ATP,c}$ -Massenstrom
j_E	$MinD_{ATP,m}$ -Massenstrom
D_{Min}	Diffusionskoeffizient
Z_c	cytosolisches kontraktiles Protein
Z_m	membrangebundenes kontraktiles Protein
k_{wz}	<i>Z</i> -Bildungskonstante
GTP	Guanosintriphosphat
k_{hyd}	Hydrolysekontante
r_{wz}	<i>Z</i> -Bildungsrate
$r_{att,d}$	Anbindungsrate
r_{hyd}	Hydrolyserate
k_{prop}	Proportionalitätskoeffizient
M_{max}	maximalen Anzahl der Membranbindungsstellen
Min_m	membrangebundene Min-Proteine

k_{displ}	Verdrängungskonstante
k_{destab_1}	Destabilisierungskonstanten (Destabilisierung durch Min_m)
$k_{destab_{2,d}}$	örtlich verteilte Destabilisierungskonstante (Destabilisierung durch Nukleoid-Okklusion)
r_{displ}	Verdrängungsrate
r_{destab_1}	Destabilisierungsrate (Destabilisierung durch Min_m)
$r_{destab_{2,d}}$	Destabilisierungsrate (Destabilisierung durch Nukleoid-Okklusion)
x_{opt}	erwarteter Aktivitätsbereich der Z-Proteine
σ	Standardabweichung der Normalverteilung
GDP	Guanosindiphosphat
Z_{GDP}	GDP-gebundenes Z-Protein
k_{ex1}	Nukleotidaustauschkonstante
Z_{GTP}	GTP-gebundenes Z-Protein
k_{ex2}	Rückwärts-Nukleotidaustauschkonstante
Z_2	Z-Dimer
k_{nuc1}	Nukleationskonstanten
k_{nuc2}	Rückwärts-Nukleationskonstante
k_{el1}	Elongationskonstante
$Z_{3,c}$	cytosolisches Z-Polymer
k_{el2}	Rückwärts-Elongationskonstante
$Z_{3,m}$	membrangebundenes Z-Polymer
k_{ex1}	Nukleotidaustauschkonstante
k_{ex2}	Rückwärts-Nukleotidaustauschkonstante
i	Polymerlänge
j	Polymerlänge
i_{max}	maximale Polymerlänge
Z_i	Z-Polymer der Länge i
r_{ex1}	Nukleotidaustauschrate
r_{ex2}	Rückwärts-Nukleotidaustauschrate
r_{nuc1}	Nukleationsrate

Nomenklatur

r_{nuc2}	Rückwärts-Nukleationsrate
r_{el1_2}	Elongationsrate des Dimers
r_{el2_2}	Rückwärts-Elongationsrate des Dimers
r_{att}	Anbindungsrate
r_{el1_i}	Elongationsrate der Polymere
r_{el2_i}	Rückwärts-Elongationsrate der Polymere
r_{hyd_2}	Hydrolyserate des Dimers
$r_{hyd_{3,c}}$	Hydrolyserate des cytosolischen Polymers
r_{hyd_i}	Hydrolyserate der membrangebundenen Polymere
i_{max}	maximale Polymerlänge
Φ	Anfangsschwingung der Min-Protein-Welle
$MinD_{tot0}$	Gesamtmenge von <i>MinD</i> -Proteinen
$MinE_{tot0}$	Gesamtmenge von <i>MinE</i> -Proteinen
LE	Längeneinheit

1 Kurzfassung

Eine an die Synthetische Biologie gestellte Aufgabe ist die Entwicklung von Protozellen, die die Grundfunktionalitäten von lebenden Zellen nachahmen aber synthetisch hergestellt werden sollen. Der Kern dieser Arbeit ist die Entwicklung von mathematischen Modellen, die solch eine Produktion von synthetischen Protozellen begleiten. Diese Arbeit liefert grundlegende Erkenntnisse für die Synthetische Biologie bezüglich der notwendigen Bestandteile einer Protozelle und deren Verknüpfung zu einem in-silico Protozellmodell. Bei der Erarbeitung sinnvoller Modularisierungskonzepte werden zwei unterschiedliche Herangehensweisen definiert, anhand derer zwei unterschiedlich konzipierte in-silico Protozellmodelle entwickelt und in verschiedenen Modellvarianten untersucht werden:

Der Modularisierungsansatz bringt ein in-silico Protozellmodell hervor, das die Kernpunkte aus hypothetischen, bereits vorhandenen Modellen vereint und diese an die Eigenschaften einer Protozelle annähert. Vor allem die Eigenschaft der Selbstreproduzierbarkeit eines synthetischen Systems wird anhand dieses Modells näher beleuchtet, da es bestehend aus den funktionalen Modulen Metabolismus, Polymerisationssystem und Membran in der Lage ist Tochterzellkomponenten abzuspalten, die wiederum einen neuen Protozellzyklus starten. Wegen seiner geringen Komplexität und einer gering gehaltenen Anzahl von Bausteinen eignet sich dieses Modell vor allem zur Untersuchung von Interaktionen zwischen den einzelnen zu einem Gesamtsystem verknüpften funktionalen Modulen. Das Protozellmodell nach dem Modularisierungsansatz definiert notwendige Eigenschaften einer Protozelle, wie die Versorgung der Membran mit Membranbausteinen, das Protozellwachstum infolge des Membranwachstums und der daraus resultierenden Volumenzunahme sowie die

1 Kurzfassung

Protozellteilung. Damit bildet es eine Grundlage für ein weiteres Modell, das nach dem Baukastenansatz entwickelt wird und realen Prozessen angenähert ist.

Der Baukastenansatz sieht vor, aus realen und optimalerweise bereits experimentell validierten Subsystemen, die als funktionale Module definiert werden, eine in-silico Protozelle aufzubauen. Das Modell nach dem Baukastenansatz verknüpft die funktionalen Module Container und Divisom. Dabei besteht das Divisom aus einem Positionierer und einer kontraktilen Einheit. Besonders die Interaktionseigenschaften dieser zwei funktionalen Module des Divisoms werden in unterschiedlichen Modellvarianten untersucht und optimiert. Das Protozellmodell nach dem Baukastenansatz eignet sich als Grundlage für weitere in-silico Protozellstudien, da es aufgrund seiner modularen Struktur durch weitere funktionale Module ergänzt werden kann. Aus diesem Grund dient das Protozellmodell nach dem Baukastenansatz auch für Experimentatoren als Grundlage zur Protozellkonstruktion, sei es als Grundsatzüberprüfung oder zur Prozessoptimierung.

2 Einleitung

2.1 Synthetische Biologie als neuer Wissenschaftszweig

In der Grundlagenforschung entwickelt sich seit einigen Jahrzehnten ein junger wissenschaftlicher Zweig der Synthetischen Biologie. Synthetische Biologie vereint unterschiedliche naturwissenschaftliche Disziplinen, wie molekulare Biologie, Genetik, Systembiologie, Biotechnologie und Chemie, mit ingenieurwissenschaftlichen Methoden [14]. Wird die Entwicklung molekularbiologischer Gentechniken, wie die Polymerasekettenreaktion (PCR), die von Kary B. Mullis Ende der 1970er Jahre entwickelt wurde [48], oder die Sequenzierung Mitte der 1970er Jahre [66], als Anfänge der Synthetischen Biologie betrachtet, so kann behauptet werden, dass am Anfang der Synthetischen Biologie die Beeinflussung der existierenden, lebenden Systemen im Fokus stand. Dieses Ziel war stets getrieben durch den immerwährenden Wunsch nach dem vollkommenen Verständnis der biologischen Welt.

Die Weiterentwicklung der Techniken in der System- und Molekularbiologie weiteten die anfänglichen Zielsetzungen der Grundlagenforschung in Richtung anwendungsorientierter Synthetischer Biologie aus. Das Design von veränderten oder neuen biologischen Einheiten für Prozesse mit einem gewünschten Eingangs-Ausgangs-Verhalten steht immer mehr im Mittelpunkt der Forschung in der Synthetischen Biologie [1, 58]. An dem Punkt, wo die klassische Biotechnologie an ihre Grenzen stößt, soll die Synthetische Biologie Abhilfe schaffen. In der konventionellen Biotechnologie sind reale, biologische Systeme, die als Produzenten verwendet werden, sehr komplex. Daher lassen sich diese Systeme durch mathematische Modelle, die zur System- und somit Produktionsoptimierung verwendet werden, kaum beschreiben.

2 Einleitung

Dies macht eine gezielte Manipulation oder eine gezielte Optimierung der Systeme schwierig oder gar unmöglich, was sich auf die Produktivität dieser biotechnologischer Prozesse auswirkt. Genau an diesem Punkt soll die Synthetische Biologie ansetzen und durch Entwicklung von Minimalzellen oder durch die Synthese von Protozellen zu neuen Möglichkeiten in der Biotechnologie verhelfen.

2.1.1 Begriffsklärung

Der Begriff Minimalzelle bezeichnet eine synthetische Zelle mit einem minimalen Genom, das entweder synthetisch konstruiert oder aus dem Genom eines realen biologischen Systems verkleinert wurde. Eine Protozelle hingegen bezeichnet die Herstellung synthetischer Zellen mit Eigenschaften realer, biologischer Systeme, ohne dass die Anforderung eines minimalen Genoms besteht [14]. Beide Formen synthetischer Zellen sollen dennoch unter Laborbedingungen lebensfähig beziehungsweise produktionsfähig über einen gewissen Zeitraum sein und dabei aufgrund ihrer geringen Komplexität manipulierbar bleiben.

In der Synthetischen Biologie wird zwischen dem *top-down* Ansatz und dem *bottom-up* Ansatz unterschieden [39, 64, 79, 60]. Wobei es oft nicht klar ist, wo die Grenze zwischen diesen zwei Ansätzen verläuft und diese sich oft überschneiden. Während der *top-down* Ansatz darauf abzielt, einen existierenden Organismus zu verändern um eine andere Funktionalität oder ein besseres Verständnis durch ein minimales Genom zu erlangen, versucht die Strategie des *bottom-up* Ansatzes eine zellähnliche Einheit - die Protozelle - aus einzelnen *biologischen Bausteinen* aufzubauen (Abb. 2.1).

Der Begriff *biologischer Baustein* beschreibt hierbei die molekularen Bausteine des Lebens, nämlich Kohlenhydrate, Proteine und Fette sowie deren Verbindungen zu *funktionalen Teilen* [19]. Als *funktionales Modul* wird eine Einheit aus unterschiedlichen *funktionalen Teilen* definiert [1, 37]. Ein Zusammenschluss mehrerer *funktionaler Module* zu einer selbst-erhaltenden Einheit wird als *System* bezeichnet [37]. Ein *funktionales Modul* beschreibt eine selbst-erhaltende Einheit, die ein Eingangs- und

2.1 Synthetische Biologie als neuer Wissenschaftszweig

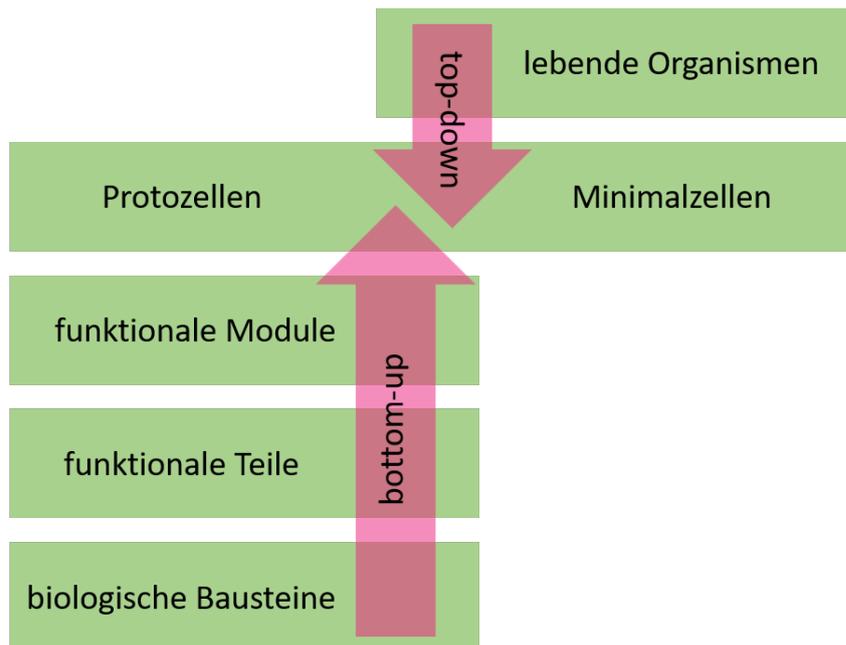


Abbildung 2.1: Bottom-up- und top-down-Ansatz in der Synthetischen Biologie. Bei der bottom-up-Strategie werden biologische Bausteine zu funktionalen Teilen und diese zu funktionalen Modulen verknüpft, aus denen anschließend Protozellen aufgebaut werden. Die entgegengesetzte Richtung, bei der aus realen Systemen Minimalzellen mit ausschließlich lebensnotwendigen Bestandteilen erzeugt werden, wird als top-down-Ansatz bezeichnet.

Ausgangssignal sowie eigene Randbedingungen aufweist und kann somit als ein eigenständiges Subsystem funktionieren. Werden mehrere *funktionale Module* zu einer zellähnlichen Einheit verknüpft, besitzt diese zum einen die Eigenschaften, die durch die einzelnen *funktionalen Module* definiert werden und zum anderen die durch ihre Interaktionen entstehen [19].

2.1.2 Biologische Sicherheit in der Synthetischen Biologie

Die große Vision der Synthetischen Biologie ist es synthetische Zellen nach dem Baukastenprinzip schnell und entsprechend der an diese gestellten Anforderungen herzustellen und zur Produktion gewünschter Substanzen zu verwenden [76]. In diesem

2 Einleitung

Zusammenhang kommt es oft zur Frage der biologischen Sicherheit [77]. Auch wenn die große Vision des schnell aus einem Baukasten herstellbaren Bio-Produzenten aus der heutigen Sicht und nach aktuellem Forschungsstand noch weit entfernt ist, muss die Problematik der biologischen Sicherheit bereits in diesem frühen Stadium der Synthetischen Biologie stets mitbedacht werden und zukunftsorientierte Sicherheitsmaßnahmen entwickelt, etabliert und eingehalten werden [14, 60, 67].

Die Synthetische Biologie nimmt Einfluss auf die Gesellschaft, die Ethik und die Regierung und stellt diese vor Herausforderungen [80]. Wie in der konventionellen Biotechnologie müssen die Befürchtungen der Öffentlichkeit ernst genommen und stets für Aufklärung und Dialog zwischen der Öffentlichkeit und Wissenschaft gesorgt werden [80, 6]. Sowohl genetisch veränderte Organismen als auch neu entwickelte biologische Systeme dürfen keine Gefahr für Mensch und Natur darstellen. Auch mit Fragen, ob die Wissenschaft mit Hilfe der Synthetischen Biologie „Gott spielen“ will, muss sich auseinandergesetzt werden [12]. Die Gewährleistung und Überwachung der biologischen Sicherheit beinhaltet den Umgang mit Gefahren, wie „do-it-yourself“-Biologie oder Biohacker-Angriffe und dem daraus resultierenden potentiellen Missbrauch der Errungenschaften der Synthetischen Biologie. Die Basis der biologischen Sicherheit müssen somit durch die Regierung geschaffene rechtliche Grundlagen darstellen [80].

2.1.3 Forschungsschwerpunkte in der Synthetischen Biologie

Das Feld der Synthetischen Biologie findet ein weltweites Interesse. Viele internationale Gruppen und Forschungsnetzwerke beschäftigen sich zunehmend intensiver mit der Synthetischen Biologie, wobei die Anwendungsbereiche sehr vielfältig sind. So werden Techniken der Synthetischen Biologie erfolgreich in der Biotechnologie zur Reorganisation von Mikroorganismen eingesetzt, wie es beispielsweise die Arbeitsgruppe um Craig Venter erfolgreich gezeigt hat [21]. Dabei wurde ein synthetisch hergestelltes Genom in *Mycoplasma capricolum* eingesetzt, welches ausschließlich die synthetisch hergestellte DNA beinhaltet und dabei die erwarteten phenotypischen

2.1 Synthetische Biologie als neuer Wissenschaftszweig

Eigenschaften sowie die Fähigkeit der Selbstreplikation besitzt.

Durch die Entwicklung eines synthetisch hergestellten Genoms von *Saccharomyces cerevisiae* konnte beispielsweise in der Biotechnologie eine Erhöhung der Produktivität erreicht werden [61, 98], da genetisch modifizierte Hefestämme bereits in hohem Umfang zur Produktion von Schmerzmitteln [20], rekombinanten Proteinen, wie Insulin [29], oder zur Herstellung von Biokraftstoffen [36] eingesetzt werden. Das künstlich hergestellte Genom erlaubt es die Produktionskosten zu reduzieren, da es im Gegensatz zu natürlichen Stämmen eine hohe Wachstumsrate hat. Ebenso ermöglicht es eine gezielte Auswahl des effizientesten Stammes hinsichtlich der Produktivität und Produktionskosten zu treffen, wie im Fall des synthetisch hergestellten Wirkstoffs gegen Malaria *Artemisinin* [63].

Die zunehmende Anwendung der Synthetische Biologie in der Pharmaindustrie und der Medizin wird auch bei der Entwicklung neuer Therapiemethoden gegen chronische Schmerzen deutlich. Dabei werden mikroverkapselte, menschliche Zellen, die transgen für Pfefferminz-Stimulus-Produktion und Absonderung von therapeutisch transgenen Stoffen sind, als eine Möglichkeit getestet bei chronischen Schmerzen den Wirkstoff nur bei Bedarf freizusetzen. Dies wirkt Effekten, wie dosislimitierender Toxizität, Wirkstoffunverträglichkeit oder Entwicklung einer Medikamentenabhängigkeit entgegen [94].

Weiterhin spielt die Synthetische Biologie bei der Entwicklung von neuen Krebstherapien eine große Rolle, wobei auch hier beispielsweise menschliche Zellen als lebende Therapeutika dienen. Hierbei werden Immunzellen reprogrammiert, sodass sie spezifische Merkmale auf Krebszelloberflächen erkennen und diese abtöten, jedoch das gesunde Gewebe verschonen [16].

Wie bereits erwähnt, stellt die schnelle Herstellung des Bio-Produzenten aus einem Baukasten und die damit verbundene anwendungsorientierte Richtung nur einen Fokus der Synthetischen Biologie dar. Ein weiterer Schwerpunkt liegt im Bereich der Grundlagenforschung: Hier erhoffen sich viele Forschungsgruppen Antworten auf einige der fundamentalsten Fragen des Lebens im Universum zu finden, die unter anderem von dem berühmten Physiker Erwin Schrödinger [72] oder dem Biochemiker Alexander Oparin [51] bereits vor mehreren Jahrzehnten formuliert wurden: *Was ist Leben* und *Wie entsteht Leben?* [40, 38, 73, 78, 85]

2 Einleitung

Die vorliegende Arbeit und die ihr zugrunde liegenden Forschungsanregungen entstanden im Rahmen des interdisziplinären Forschungskonsortiums MaxSynBio. Dieses beleuchtet das Feld der Synthetischen Biologie ebenfalls aus der Sicht der Grundlagenforschung, mit dem Ziel biologische Systeme zu verstehen und schließlich darauf basierende künstliche Minimalsysteme nach dem *bottom-up* Ansatz aufzubauen [46, 77]. Dabei werden sowohl die Funktionseinheiten, aus denen die essentiellen Lebensprozesse in Minimalzellen nachgebaut werden sollen, wie *biologische Bausteine* (zum Beispiel Gewinnung von Adenosintriphosphat (ATP) [52]) und *funktionale Module* (zum Beispiel Energieversorgungseinheit [52] oder Actomyosin-Cortex [93]) experimentell synthetisiert, als auch neuartige Techniken entwickelt und angewandt, wie beispielsweise die Mikrofluidik [54] oder Vesikeladhäsion durch ein elektrisches Feld [81].

An der Universität von Süddänemark gibt es unter der Leitung des Professors Steen Rasmussen das Forschungsprojekt FLinT (Center for fundamental Living Technology), das ähnlich wie das MaxSynBio-Projekt den *bottom-up* Ansatz verfolgt [10, 30]. Sein hauptsächliches Ziel ist es minimale lebende Systeme zu entwickeln, wobei selbstorganisierende Prozesse untersucht werden, um die wirkenden Kräfte in natürlichen und künstlich hergestellten Systemen zu verstehen. Auch hier steht die Grundlagenforschung im Mittelpunkt.

Es gibt aber auch Forschungsgruppen, die die Entwicklung von biologischen Systemen sowohl mit dem *bottom-up*- als auch mit dem *top-down*-Ansatz verfolgen, jedoch mit dem deutlichen Ziel die gewonnenen Erkenntnisse ihrer Forschung anwendungsorientiert in der Gesundheitsindustrie einzusetzen. Beispielsweise verfahren das Forschungszentrum Synberc (The Synthetic Biology Engineering Research Center) unter Leitung der UC Berkley [84] oder BrisSynBio an der Universität von Bristol [8] nach diesem Prinzip.

2.1.4 Mathematische Modellierung in der Synthetischen Biologie

Ganz gleich, welche Intention hinter den jeweiligen Forschungsnetzwerken stehen, eins haben sie gemeinsam: Die mathematische Modellierung der synthetischen Systeme ist dabei unumgänglich und sehr hilfreich [11, 18, 58]. Dabei sind die schnellen Ergebnisse oder Schätzungen, die mit Hilfe der mathematischen Modellierung erzielt werden, sehr nützlich, um beispielsweise in der anwendungsorientierten Richtung eine Kosten-Nutzen-Analyse eines biotechnologischen Prozesses zu erstellen oder im Fall der Grundlagenforschung zur Grundsatzüberprüfung. Optimierungsverfahren finden ebenfalls zunächst theoretisch statt, was nicht nur Zeit, sondern auch Ressourcen einspart. Der *bottom-up* Ansatz der Synthetischen Biologie ist zwar noch weit entfernt von Anwendungen im großen Maßstab, dennoch ist es sinnvoll die Funktionsweise, die Randbedingungen und mögliche Faktoren, die einen angestrebten Prozess beeinflussen, zunächst theoretisch zu untersuchen.

2.2 Zielstellung der Dissertation

Das Ziel dieser Arbeit ist die Definition und Beschreibung der notwendigen *funktionalen Module* sowie die Entwicklung eines mathematischen, synthetischen Protocellmodells. Für den Zweck der Modellentwicklung stellt der *bottom-up* Ansatz die vorteilhaftere Herangehensweise dar, im Vergleich zum *top-down* Ansatz. Durch die Bildung einer synthetischen Protozelle beginnend mit den *biologischen Bausteinen*, wird aufgrund der geringeren Komplexität im Vergleich zu realen Systemen ein besseres Verständnis des Gesamtsystems erwartet. Dies ermöglicht einen besseren Überblick vom Verhalten der einzelnen *biologischen Bausteine* innerhalb eines *funktionalen Moduls* sowie von den Wechselwirkungen zwischen einzelnen *funktionalen Modulen* [19, 1].

Es gibt eine Reihe von qualitativen Gesamtzellmodellen in der Literatur, die eine künstliche Zelle mit Hilfe der *top-down* Strategie beschreiben [63, 21, 53, 4] oder

2 Einleitung

mit Hilfe der *bottom-up* beziehungsweise einer kombinierten Strategie. Die wegweisenden, theoretischen Arbeiten im Bereich des *bottom-up* Ansatzes in der Synthetischen Biologie erfolgten durch die Chemoton-Theorie von Gánti vor mehr als dreißig Jahren: Das Chemoton wird als ein *fluid automaton* beschrieben, das aus drei sich selbst-produzierenden, stöchiometrisch verknüpften Subsystemen besteht [22, 24, 23]. Die drei verknüpften Subsysteme sind das Membran-Subsystem, der selbst-reproduzierbare chemische Zyklus und das Template-Subsystem [23]. Später mit der *bottom-up* Strategie entwickelte Theorien - basierend ebenfalls auf diesen drei Subsystemen - verwenden die Begriffe Container, Metabolismus und Informationsträger oder Programm [60, 79, 5]. Ein anderer wichtiger Aspekt im Bereich der Eigenschaften von Protozellen ist das Konzept der Autopoiesis. Dieser Begriff wurde von Varela et al. [91] geprägt. Autopoiesis ist eine der zentralen Eigenschaften, die von der Luisi-Gruppe bereits seit Jahrzehnten untersucht wird [2, 50, 44, 43]. Die durch diese Gruppe entwickelten Protozellmodelle haben alle die Eigenschaft der Selbsterhaltung gemeinsam, die den zentralen Punkt der Autopoiesis-Theorie darstellt. Die Luisi-Gruppe untersucht außerdem Lipidvesikel als ein mögliches Container-Modul einer Protozelle. Eine andere wichtige Eigenschaft einer Protozelle ist die Energieversorgung, die in den Untersuchungen von Morowitz et al. [47] sowie Pohorille und Deamer [57] beschrieben werden. Manche dieser *bottom-up* Modelle beschreiben vage eine Gesamtzelle aus der theoretischen Sicht, andere beschreiben nur einzelne *funktionale Module* ohne Interaktionen mit anderen funktionalen Einheiten.

Die Aufgabe dieser Arbeit ist es, eine künstliche, zellähnliche Einheit - die **in-silico Protozelle** - mit Hilfe des *bottom-up*-Ansatzes zu entwickeln. Die in-silico Protozelle soll unterschiedliche, miteinander verknüpfte und einander regulierbare *funktionale Module* enthalten. Dies setzt die Definition eines sinnvollen Modularisierungskonzeptes voraus, das geeignete, interagierende *funktionale Module* verwendet, die auf realen Reaktionsnetzwerken basieren, um eine spätere Protozellentwicklung im Labor zu ermöglichen.

2.3 Modellierungskonzept einer synthetischen Protozelle

In der Verfahrenstechnik wurden für das Design von komplexen Produktionsanlagen mit Hilfe des Zerlegungskonzeptes sehr wirksame Werkzeuge entwickelt. Dabei sind anspruchsvolle Vorgänge in Subprozesse unterteilt, was die Beschreibung der einzelnen Subprozesse vereinfacht. Dies erfordert zunächst eine Definition der einzelnen Prozesseinheiten und ihrer Funktionalitäten. Bei der Konzeption einer chemischen Anlage wird der Gesamtprozess zunächst in Elementarschritte, zum Beispiel Wärmetauscher, Separation und Substrataufschluss, aufgeteilt. Erst in einem späteren Stadium erfolgt die Spezifizierung dieser verfahrenstechnischen Grundoperationen. So kann für den Substrataufschluss unter anderem ein mechanischer Zerkleinerer oder Ultraschall gewählt werden. Im Anschluss erfolgt die endgültige Konstruktion der Anlage.

Dieses Zerlegungskonzept wird in der vorliegenden Arbeit auf die Synthetische Biologie übertragen, um ein modulares Protozellmodell zu entwickeln [64]. Das heißt, man legt zunächst fest, welche *funktionalen Module* benötigt werden, um eine Protozelle zu beschreiben, und welche Eigenschaften diese *funktionalen Module* besitzen müssen. Im nächsten Schritt wird nach molekularen Systemen gesucht, die die benötigten Eigenschaften erfüllen. Durch die Verwendung experimenteller Beobachtungen werden mathematische Modelle für jedes einzelne *funktionale Modul* entwickelt, die die erforderlichen Eigenschaften erfüllen. Erst dann erfolgt der Zusammenbau zum Gesamtsystem - der in-silico Protozelle. Die Lücken, die dabei entstehen, werden gefüllt durch weitere Annahmen, welche abstrahiert die im Experiment beobachteten Vorgänge darstellen. Als solch ein Lückenfüller könnte beispielsweise die Annahme dienen, dass ein Nebenprodukt eines *funktionalen Moduls* zu einem *biologischen Baustein* eines anderen *funktionalen Moduls* in einer Zwischenreaktion konvertiert werden kann. Alternativ kann die Interaktion der *funktionalen Module* mit Hilfe eines Signals realisiert werden, das von einem *funktionalen Modul* ausgehend einen Mechanismus in einem anderen *funktionalen Modul* anregt. So könnte beispielsweise die Verdoppelung eines Informationsträgers als Signal für die Membraneinschnürung bei der Protozellteilung dienen.

Großer Wert wird dabei auf die Komplexität des Gesamtsystems gelegt. Hier wird

2 Einleitung

angestrebt die Komplexität der einzelnen Module und deren Verknüpfung so gering wie möglich zu halten, um ein besseres und grundlegendes Verständnis der Interaktionen zwischen den *funktionalen Modulen* zu erlangen, aber dennoch die volle Funktionalität der verwendeten *funktionalen Module* zu erhalten.

Wie in der Abb. 2.2 dargestellt, finden in dieser Arbeit zwei Herangehensweisen der Modellierung einer synthetischen, zellähnlichen Einheit ihre Anwendung: Der erste Weg ist es unstrukturierte oder nur wenig strukturierte, theoretische Gesamtzellmodelle, die in der Literatur bereits beschrieben sind, zu betrachten. Dies geschieht im Hinblick auf die *funktionalen Module*, aus denen diese theoretischen Modelle aufgebaut sind. Hierbei ist es wichtig zu klären, welche *funktionalen Module* notwendig sind und welche Eigenschaften diese *funktionalen Module* haben müssen. Dieser Ansatz wird hier als **Modularisierungsprinzip** bezeichnet. Nach der Bestimmung der Protozell-Module aus existierenden Modellen, kann ein hypothetisches Modell bestehend aus definierten *funktionalen Modulen* entwickelt werden. Im nächsten Schritt ist es durchaus sinnvoll nach realen, experimentell validierten, biochemischen Systemen zu suchen, die den Eigenschaften der verwendeten Module entsprechen.

Die zweite Möglichkeit ist es mit Subsystemen zu beginnen, die bereits im Experiment untersucht wurden und für die Zwecke einer künstlichen Protozelle für geeignet erklärt wurden. Solche Studien von isolierten Subsystemen erlauben es die Funktionalitäten der einzelnen Submodule entkoppelt von den anderen Zellbestandteilen zu untersuchen. Durch die Definition von Schnittstellen und Interaktionseigenschaften zwischen den *funktionalen Modulen* zum Material- und Informationsaustausch können die einzelnen Module anschließend zu einer möglichen künstlichen, zellähnlichen Einheit zusammengebaut werden, was sehr stark an einen Baukasten erinnert. Aus diesem Grund trägt dieses Modellierungskonzept die Bezeichnung **Baukastenprinzip**. Diese zwei unterschiedlichen Ansätze, die in dieser Arbeit verwendet werden, sind stark miteinander verknüpft. Bei einer genaueren Betrachtung stellt man fest, dass der Pfad der Modularisierung (Abb. 2.2) das Baukastenprinzip innehat, welches ebenso im letzten Schritt vor dem Fertigstellen des Gesamtsystems beim Modularisierungsansatz zum Einsatz kommen kann.

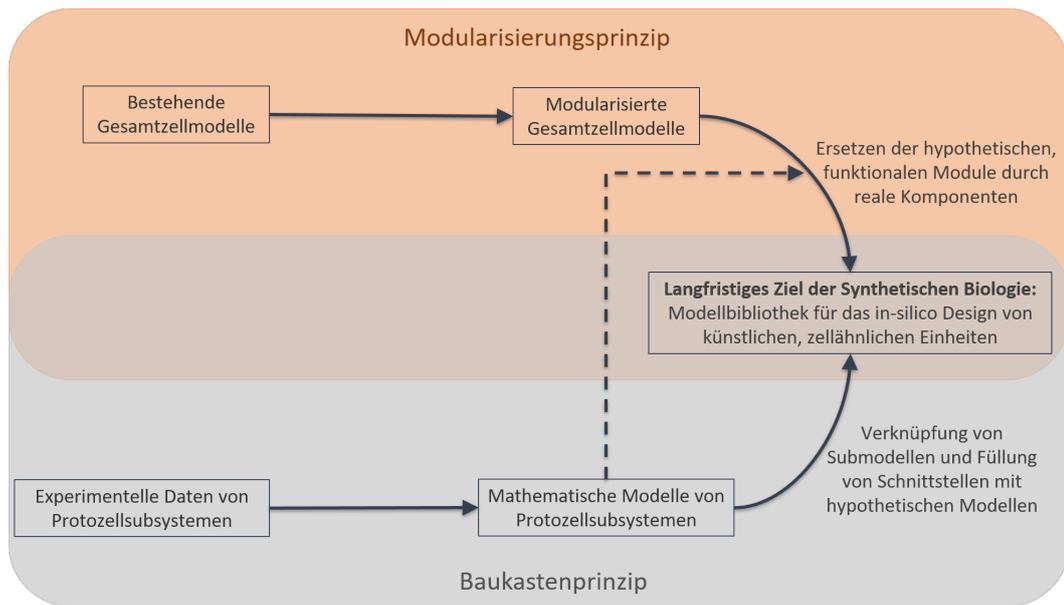


Abbildung 2.2: Unterschiedliche Herangehensweisen in der theoretischen Synthetischen Biologie.

Der oben dargestellte Ansatz wird als Modularisierungsprinzip bezeichnet und basiert auf der Verwendung von Informationen aus bereits bestehenden Modellen. Der untere Weg stellt das Baukastenprinzip dar, das unterschiedliche, experimentell validierte Module, die bereits jedes für sich eine funktionale Einheit bildet, zu einem Gesamtsystem verknüpft.

2.4 Gliederung der Dissertation

Basierend auf den unterschiedlichen Herangehensweisen zur Entwicklung einer in-silico Protozelle, Modularisierungs- und Baukastenprinzip, ist die vorliegende Dissertationsschrift wie folgt aufgebaut:

Im Kapitel 3 werden ausgewählte Ideen aus bestehenden Protozellmodellen sowie dem MaxSynBio-Konsortium im Hinblick auf betrachtete *funktionale Module* vorgestellt. Anschließend erfolgt eine Festlegung von *funktionalen Modulen*, die notwendig und geeignet für den Aufbau einer Protozelle sind.

Das Kapitel 4 behandelt die Protozellmodellierung nach dem Modularisierungsansatz und wurde zum Teil als Konferenzbeiträge veröffentlicht [68, 69]. Dabei werden die zuvor im Kapitel 3 festgelegten *funktionalen Module* verwendet und angelehnt an die Strukturen des Chemoton-Modells und der Goldbeter-Minimalkaskade ei-

2 Einleitung

ne in-silico Protozelle entwickelt. Aufgrund der makroskopischen Betrachtungsweise ermöglicht dieses Modell vor allem die Untersuchung der Selbstreproduzierbarkeit einer Protozelle, muss jedoch aufgrund der sehr einfach gehaltenen Struktur auf den Einsatz real existierender *funktionaler Module* verzichten.

Um der experimentellen Realität näher zu kommen, wird im Kapitel 5 die Entwicklung eines in-silico Protozellmodells nach dem Baukastenprinzip beschrieben. Dabei finden die grundlegenden Eigenschaften des makroskopischen in-silico Protozellmodells aus Kapitel 4 ihre Anwendung. Es werden unterschiedliche Modellvarianten erläutert, die sich Schritt für Schritt an die Strukturen der real existierenden *funktionalen Module* annähern. Die im Kapitel 5 behandelten Inhalte wurden teilweise in einem Konferenzbeitrag [71] und einem Zeitschriftenartikel [70] veröffentlicht.

Das Kapitel 6 fasst die Ergebnisse dieser Arbeit im Hinblick auf die Erfüllung der Zielstellung zusammen und diskutiert Möglichkeiten der Verwendung und Erweiterungen der hier entwickelten in-silico Protozellmodelle.

3 Funktionale Module einer Protozelle

Das Ziel des *bottom-up* Ansatzes der Synthetischen Biologie ist es Schritt für Schritt eine künstliche, zellähnliche Einheit zu entwickeln. Den Anfang stellt dabei die Bildung von *biologischen Bausteinen* dar, gefolgt von deren Verknüpfung zu *funktionalen Teilen*, die wiederum zu *funktionalen Modulen* zusammengeschlossen werden. Anschließend erfolgt die Verknüpfung *funktionaler Module* zu einem *System*.

Eine ähnliche Vorgehensweise findet sich im Chemieingenieurwesen wieder, wobei die Grundoperationen, wie beispielsweise Mischen, Trennen, Stoffwandlung etc., aus denen chemische Anlagen aufgebaut werden, seit Jahrzehnten bekannt und adaptiv umgesetzt sind. Die Synthetische Biologie hingegen steht noch vor der Herausforderung die notwendigen Grundoperationen einer Protozelle festzulegen und die Realisierbarkeit dieser Grundoperationen zu etablieren.

3.1 Funktionale Module innerhalb des MaxSynBio-Konsortiums

Beim Aufbau und der Beschreibung einer synthetischen Protozelle, wird sich zunächst an den Merkmalen und Prozessen von lebenden *Systemen* orientiert. So können zur Definition von *funktionalen Modulen* einer synthetischen Protozelle die Hauptfunktionalitäten der lebenden Organismen, wie Kompartimentierung, Proteinsynthese, Energieversorgung, Metabolismus, Zellpolarität, Morphogenese, Signal-

3 Funktionale Module einer Protozelle

übertragung und Motilität, Zellwachstum und Zellteilung, herangezogen werden [77]. All diese Prozesse tragen unter anderem dazu bei, dass die realen Systeme eine lebende Einheit definieren. In der Synthetischen Biologie ist die Lebensfähigkeit der synthetischen Protozelle nicht zwingend erforderlich, sodass auch wenige ausgewählte Lebensprozesse betrachtet werden können, um die Komplexität der synthetischen Protozelle zu beschränken.

Innerhalb des MaxSynBio-Konsortiums, in dessen Rahmen diese Arbeit entstand, werden folgende Eigenschaften lebender Systeme untersucht, die als mögliche *funktionale Module* einer synthetischen Protozelle fungieren können [77]:

Kompartimentierung

Biomimetische Micro-Kompartimente werden in der Synthetischen Biologie als Systemgrenzen genutzt, um die synthetische Protozelle von der Umgebung räumlich abzugrenzen. Dabei können Wasser-in-Öl-Tröpfchen als einfache Strukturen eingesetzt werden. Die im MaxSynBio-Konsortium bereits sehr gut etablierte Mikrofluidik-Technologie erlaubt eine Herstellung von Wasser-in-Öl-Tröpfchen einer einheitlicher Größe in hoher Menge und Präzision [54]. Komplexere, membranbasierte Strukturen, wie Lipidvesikel [34] und Polymerosome [55, 62], bieten den Vorteil der Betrachtung von Stoffaustausch zwischen dem extra- und intrazellulären Raum.

Metabolismus

Wird der biotechnologische Nutzen eines synthetischen Systems betrachtet, so steht der Metabolismus eindeutig im Vordergrund. Durch Manipulation und Optimierung der metabolischen Netzwerke wird im industriellen Maßstab das Ziel der besseren Ausbeute eines bestimmten Produktes verfolgt. Durch die synthetischen Systeme wird die Reduktion solcher metabolischer Netzwerke angestrebt, um dessen Steuerbarkeit und Optimierung zu erleichtern [74].

Energie

Im Zusammenhang mit dem Metabolismus kann auch die Energieversorgung eine große Rolle spielen. Der metabolische Prozess verbraucht nicht nur Ener-

3.2 Bestehende Protozell-Ansätze in der Literatur

gie, dieser könnte im synthetischen System auch dafür genutzt werden, um die benötigte Energie bereitzustellen und zu speichern.

Wachstum, Replikation und Teilung

Werden das Wachstum und somit die Volumen- und Oberflächenzunahme des synthetischen Systems betrachtet, was wiederum eng mit der Versorgung aus dem metabolischen System verknüpft werden kann, so erscheint die Teilung der synthetischen Protozelle als ein logischer, nächster Schritt. Der Teilungsprozess umfasst mehrere Stufen. Wird eine lebende Zelle und deren Cytokinese betrachtet, so erfolgt die Zellteilung in vier zeitlich aufeinanderfolgenden Schritten [90], die allesamt dem Zweck dienen, die gespeicherte genetische Information zu verdoppeln und diese auf zwei Tochterzellen gleichermaßen aufzuteilen.

Signalübertragung und Motilität

Der Teilungsprozess einer Protozelle bringt Formänderungen mit sich, die beispielsweise durch bestimmte Signale ausgelöst werden können. Dabei ist das Zellform-bestimmende Cytoskelett einer Protozelle, das auf einen Stimulus ebenso mit Oberflächen-Adhäsion oder gerichteter Bewegung reagieren kann [97], stark von der Energieversorgung abhängig [95].

3.2 Bestehende Protozell-Ansätze in der Literatur

Werden bereits bestehende Theorien oder mathematische Modelle einer synthetischen Protozelle oder einer Minimalzelle betrachtet, ist das große Interesse der Synthetischen Biologie an den *funktionalen Modulen* - Container, Metabolismus, Replikation und Energieversorgung - offensichtlich [17, 79, 60].

Es gibt eine Reihe von theoretischen Studien und verschiedenen Protozell-Ansätzen, die aus unterschiedlichen, *funktionalen Modulen* aufgebaut sind. Den Anfang bilden

3 Funktionale Module einer Protozelle

theoretische Studien zur biologischen Selbstregulation und Zellpolarität in Abhängigkeit von Diffusion, die von Rashevsky bereits in den 1940er Jahren angestellt wurden [59].

Ein ebenfalls hypothetisches Modell einer Ribozelle, die zwei Ribozyme einschließt, wurde von Bartel und Unrau [3] entwickelt. Dabei repliziert ein Ribozym sich selbst und ein zweites, wobei das zweite Ribozym die Membranbausteine synthetisiert.

In einem Protozellmodell von Pohorille und Deamer [57] werden die Transkriptions- und Translationssysteme in Kombination mit einem Energie-Transduktionssystem betrachtet. Die DNA wird in die RNA transkribiert und diese anschließend in ein Protein translatiert. Die Aminosäuren, die dafür notwendig sind, gelangen durch eine Pore ins Innere der Zelle und werden durch Adenosintriphosphat (ATP) aktiviert. Das ATP wird mit Hilfe des lichtgetriebenen Bacteriorhodopsin und der ATPase aus Adenosindiphosphat (ADP) und einem Phosphat gebildet und zur Aktivierung der Aminosäuren benötigt.

Die *funktionalen Module* Container und Metabolismus werden beispielsweise im Protozellmodell von Mavelli verknüpft [43, 45]. Dabei wird ein Precursor durch die Membran der Protozelle aufgenommen und durch eine enzymatische Reaktion - den Metabolismus - in einen Membranbaustein umgewandelt. Durch den Einbau des Membranbausteins kommt es zum Wachstum der Membran.

Bis zur tatsächlichen Zellteilung gehen die Betrachtungen im Chemoton-Modell von Gánti [22], welches unter anderem einen programmierenden Teil enthält zur Speicherung von Information und Regulation von Prozessen innerhalb der Zelle. Das Chemoton besteht aus drei sich selbst-reproduzierbaren Systemen: dem autokatalytischen, chemischen Zyklus, dem Templatesubsystem und dem Membransubsystem. Die Membran ist nur für den Nährstoff und das Abfallprodukt durchlässig. Der Nährstoff wird im autokatalytischen Zyklus verbraucht, bei der Bildung von Monomeren für die Polymerisation und bei der Bildung eines Precursors des Membranbausteins. Die Monomermoleküle bilden einen Polymerstrang durch Polykondensation, wobei vom Monomer ein Molekül abgespalten wird, das mit dem Membranprecursor zum Membranbaustein reagiert. Dieser wird anschließend in die Membran eingebaut, was zur Volumenzunahme bis hin zur Volumenverdoppelung führt und das Chemoton sich spontan in zwei identische Einheiten teilt.

3.3 Auswahl der funktionalen Module für die Protozellmodellierung

Ein sehr interessantes experimentell realisiertes Protozellmodell eines wachsenden und sich selbst-reproduzierenden großen Vesikels (engl.: giant vesicle, GV) [87, 89, 86] untersucht den Einfluss der Selbstreplikation eines Informationsträgers auf die Selbstreproduktion des Containers. Durch die Zugabe eines Membran-Precursors zum System bestehend aus einem GV, das ein DNA-Fragment einschließt, kann ein Wachstum des GVs und seine spontane Teilung beobachtet werden. Außerdem wird gezeigt, dass die DNA-Amplifikation durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) innerhalb des GVs das Wachstum und die Teilung des GVs beschleunigt [35].

Große unilamellare Vesikel (engl.: giant unilamellar vesicle, GUV) können als zell-ähnliche Bioreaktoren fungieren, wie experimentell von Noireaux und Libchaber [49] gezeigt wird. Die GUVs werden genutzt zur Transkription und Translation von Plasmidgenen. Ein in das GUV eingebautes Porenprotein ermöglicht selektive Permeabilität von Substraten, womit Energie- und Materiallimitierung ausgeschlossen werden und das GUV seine Produktionsfähigkeit über einen längeren Zeitraum behält.

3.3 Auswahl der funktionalen Module für die Protozellmodellierung

Die synthetische Protozelle muss keineswegs alle Merkmale einer realen, lebenden Zelle besitzen. Im Gegenteil ist es vom späteren Zielprozess der synthetischen Protozelle abhängig, welche Merkmale im Vordergrund stehen sollen. Dies wird am Beispiel der Zellteilung deutlich: Ginge es um die Ausbeute eines bestimmten Produktes in hohen Mengen, so wäre es denkbar, dass die Konstruktion der synthetischen Protozelle so schnell und mit wenig Ressourcen möglich ist, dass sie sich nicht zwangsweise vermehren muss. Das Produkt wird geerntet und die hergestellten, synthetischen Protozellen verworfen. Wird jedoch eine kontinuierliche Ausbeute des Produktes in großem Maßstab angestrebt, könnte die synthetische Protozelle so konstruiert werden, dass sie sich ohne Alterungsprozesse unendlich oft teilen kann. So könnten hohe Wachstumsraten und damit hohe Ausbeuteraten in einem kon-

3 Funktionale Module einer Protozelle

tinuierlichen, automatisierbaren Prozess erreicht werden. Die Baukastenvorstellung einer solchen synthetischen Protozelle ist in der Synthetischen Biologie deshalb so reizvoll, weil diese komplett an die jeweiligen Bedürfnisse angepasst werden kann. Dabei muss eine Beschränkung auf einen geringen Teil dieser Prozesse erfolgen, um die Überschaubarkeit beziehungsweise system-theoretische Nachvollziehbarkeit und Steuerbarkeit der synthetischen Protozelle garantieren zu können.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich bei der Entwicklung einer in-silico Protozelle auf die Verwendung der folgenden, *funktionalen Module*: Dem wissenschaftlichen Konsens folgend, wird auch hier der **Container** als eines der *funktionalen Module* betrachtet. Dieser grenzt den intrazellulären und extrazellulären Raum ab und erlaubt einen Stoff- und Energieaustausch zwischen beiden. Weiterhin ist der **Metabolismus** als *funktionales Modul* notwendig, das es der synthetische Protozelle ermöglicht eigene Komponenten sowie potentielle Produkte auf Basis eines oder mehrerer Substrate herzustellen. Ebenso erscheint das **Programm** als eine wichtige Protozell-Komponente, die beispielsweise als Informationsträger und wichtige, regulatorische Schnittstelle zwischen mehreren *funktionalen Modulen* dienen kann. Nimmt man an, dass die synthetische Protozelle sich tatsächlich teilt, so muss das *funktionale Modul* - **Divisom** - ebenfalls betrachtet werden. Das Divisom kann - inspiriert durch den realen Prozess der Cytokinese - aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sein, um die unterschiedlichen Phasen der Protozellteilung in getrennten *funktionalen Modulen* betrachten zu können.

Die Herausforderung bei der Modellierung einer synthetischen in-silico Protozelle ist es eine Modellstruktur zu definieren, die die Synchronisation der unterschiedlichen, verknüpften *funktionalen Module* sicherstellt. Dies beinhaltet unter anderem die Anforderung einer robusten funktionalen Abhängigkeit der Module, die gegeben ist, wenn in jedem Modul das Material innerhalb eines Zellzyklus mindestens verdoppelt wird. In diesem Fall kann angenommen werden, dass die künstliche Gesamtzelle ein selbst-reproduzierendes Verhalten aufweist. Anderenfalls, wenn die Zelle sich teilt, bevor das Material sich mindestens verdoppelt hat, muss damit gerechnet werden, dass nach mehreren Generationen beispielsweise zu kleine Zellen entstehen mit unvollständiger genetischen Information und einem nicht mehr funktionsfähigen Metabolismus.

4 Modularisierungsansatz

- Protozellmodell basierend auf dem Chemoton und der Goldbeter-Minimalkaskade

Wie im Kapitel 2.3 bereits erläutert, wird in dieser Arbeit zur Modellbildung einer in-silico Protozelle unter anderem der Modularisierungsansatz verwendet. Dabei werden bereits bestehende Protozellmodelle untersucht und die dabei verwendeten *funktionalen Module* definiert. Es werden Eigenschaften festgelegt, die eine in-silico Protozelle aufweisen muss, und mit den gewonnenen Erkenntnissen ein in-silico Protozellmodell entwickelt. Der Vorteil dieser Herangehensweise liegt eindeutig in der Wahl der sehr einfach strukturierten Vorbildmodelle, die eine geringe Komplexität besitzen und somit system-theoretisch leicht nachvollziehbar sind. Das nach diesen Vorbildmodellen neu entwickelte Protozellmodell muss der Forderung nach geringer Komplexität ebenso gerecht werden.

Das hier entwickelte Protozellmodell basiert auf den Vorbildmodellen Chemoton und Goldbeter-Minimalkaskade, die folgende im Kapitel 3.3 festgelegte *funktionale Module* sowie notwendige Eigenschaften einer Protozelle besitzen: Container, Metabolismus, Programm, Division und Selbstreproduzierbarkeit. Nicht nur wegen seiner miteinander verknüpften Subsysteme, sondern auch wegen seines dynamischen Verhaltens rückt das Chemoton-Modell, das von T. Gánti bereits in den siebziger Jahren vorgestellt wurde [22, 24, 23], für den Zweck der Modellentwicklung nach dem Modularisierungsprinzip in den Vordergrund. Wie die Abbildung 4.1 zeigt, umfasst das

4 Modularisierungsansatz

Chemoton-Modell drei *funktionale Module*, die von T. Gánti als Subsysteme bezeichnet werden und einen selbst-erhaltenden Charakter aufweisen: Die treibende Kraft stellt der auto-katalytische, chemische Kreislauf dar. Dieser wandelt das von außen aufgenommene Substrat in die nötigen Bausteine für die anderen zwei *funktionalen Module* um und kann daher als das Metabolismus-Modul betrachtet werden. Dabei fungiert ein Baustein als ein Monomermolekül für den Polymerisationszyklus, welcher die Eigenschaft des Informationsträgers im Gesamtsystem erfüllt. Ein weiterer im Metabolismus-Modul gebildeter Baustein reagiert mit einem Nebenprodukt aus dem Polymerisationszyklus zu einem Membranbaustein. Die Membran, die das dritte *funktionale Modul* - den Container - definiert, wächst somit proportional zur Bereitstellung des Polymerisationszyklus-Nebenproduktes, bis sich das Volumen des Chemotons verdoppelt hat. Sobald die Volumenverdoppelung vorliegt, teilt sich das Chemoton spontan in zwei identische Systeme.

Aufgrund der einfachen und gut nachvollziehbaren Interaktionen der *funktionalen Module* im Chemoton-Modell eignet es sich sehr gut als ein Vorbildmodell für das Design eines Protozellmodells. Die selbst-erhaltenden Oszillationen, die das Chemoton-Modell zeigt, ist eine Eigenschaft, die bei dem Design einer Protozelle anzustreben ist. Nichtsdestotrotz sind die selbst-erhaltenden Oszillationen des Chemotons mit dem Containerwachstum nicht synchronisiert. Dies wird beim Vergleich der Verdoppelungszeit der zellinternen Komponenten mit der Oszillationsperiode deutlich, da diese nicht immer ein ganzzahliges Vielfaches voneinander darstellen. Um dies zu erreichen, müssen die kinetischen Parameter sehr genau aufeinander abgestimmt werden. Im Chemoton-Modell fehlt eine Struktur, die eine eigenständige Synchronisation der *funktionalen Module* - Container, Metabolismus und Polymerisation - sicherstellt und zwar für einen großen Bereich von kinetischen Parametern, um die Robustheit des Systems im Hinblick auf Systemstörungen zu gewährleisten.

Die Minimalkaskade von Goldbeter [25] liefert solch eine Struktur (Abb. 4.1). Das Chemoton-Modell ist zwar sehr stark durch die Funktionalitäten einer lebenden Zelle inspiriert, dennoch repräsentiert es lediglich nur eine Fluid-Organisation als ein Reaktionsnetzwerk [24]. Im Gegensatz dazu beschreibt die Minimalkaskade von Goldbeter einen realen Prozess biologischer Systeme, nämlich den mitotischen Oszillator im Zellteilungsprozess durch eine Phosphorylierungs-Dephosphorylierungs-Kaskade

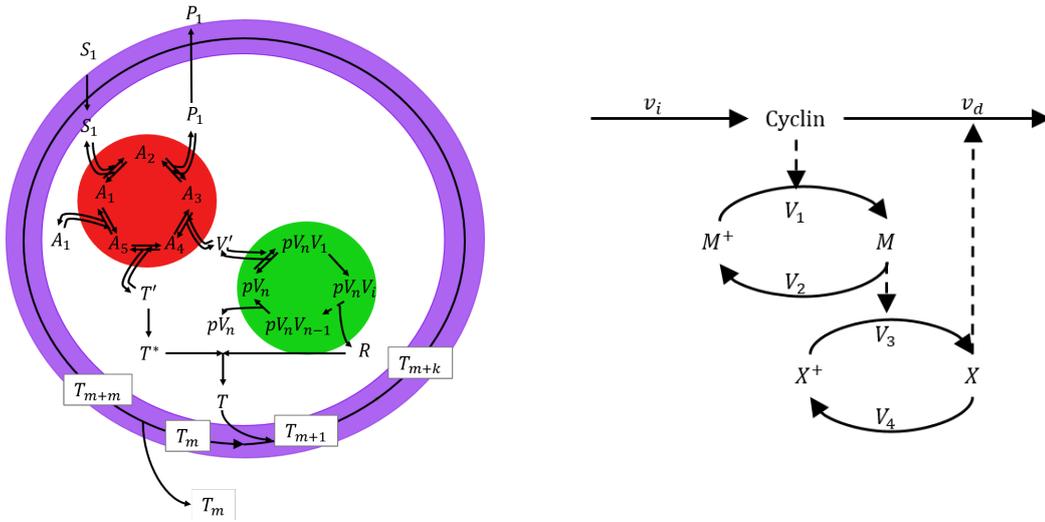


Abbildung 4.1: Vorbildmodelle des in-silico Protozellmodells nach dem Modularisierungsansatz: Chemoton-Modell von T. Gánti [24] mit den *funktionalen Modulen* **auto-katalytischer, chemischer Kreislauf**, **Polymerisationszyklus** sowie **Container** (links) und Goldbeter-Minimalkaskade (rechts), die den mitotischen Oszillator einer lebenden Zelle mit Hilfe von drei Komponenten beschreibt: a) Cyclin, das mit einer konstanten Reaktionsrate v_i gebildet wird, b) cdc2-Kinase, die durch das Cyclin vom inaktiven Zustand M^+ in den aktiven Zustand M mit der Phosphataserate V_1 sowie mit der Kinaserate V_2 zurück in den inaktiven Zustand transformiert wird und c) eine Protease, die vom inaktiven Zustand X^+ durch die aktivierte cdc2-Kinase M mit der Kinaserate V_3 in den aktiven Zustand X umgewandelt wird. Die Umwandlung der aktiven Protease X zurück in den inaktiven Zustand erfolgt mit der Phosphataserate V_4 . Die Aktivierung der Protease X führt zum Abbau des synthetisierten Cyclins mit der Cyclindegradationsrate v_d [25].

von Cyclin, cdc2-Kinase und einer Protease [25]. Aufgrund der geringen Komplexität, der miteinander synchronisierten Reaktionen zwischen den einzelnen Kaskadenstufen sowie der selbst-reproduzierenden Eigenschaft eignet sich die Goldbeter-Minimalkaskade als ein Vorbildmodell für das Design eines Protozellmodells zur Beschreibung der Protozellteilung.

4.1 Modell einer selbst-reproduzierenden in-silico

Protozelle

Die einfache Struktur der Goldbeter-Minimalkaskade [25] (Abb. 4.1) und die *funktionalen Module* des Chemoton-Modells [22, 24, 23] wurden als Gerüst für den Aufbau einer selbst-reproduzierenden in-silico Protozelle verwendet [68, 69]. Das in der Abbildung 4.2 gezeigte System S_1 repräsentiert die Mutterzelle, die im Wachstums- und Reproduzierbarkeitsprozess eine Tochterzelle S_2 abspaltet. Die abgespaltene Tochterzelle geht anschließend ebenfalls in die Wachstumsphase und den Reproduzierbarkeitsmodus über.

Das System S_1 umfasst nach dem Vorbild des Chemotons drei *funktionale Module*: Metabolismus A , Polymerisationssystem, bestehend aus dem Polymertemplate P_t und dem neuen wachsenden Polymer P sowie Membransystem, bestehend aus den katalytisch inaktiven Membranbausteinen M^* und den katalytisch aktiven Membranbausteinen M . Zunächst wird die Aktivität des Metabolismus A durch das Polymertemplate P_t mit der konstanten Aktivierungsrate v_A induziert. Mit der fortschreitenden Polymerreplikation wird diese Aktivierungsrate aufgrund der Abnahme des Polymertemplates P_t immer geringer. Die Polymerreplikation wird durch den Metabolismus A katalysiert, bis das Polymertemplate P_t gänzlich verbraucht ist. Anschließend spaltet sich das replizierte Polymer P in das ursprüngliche Polymertemplate P_t und das neue Polymer $P_{t,d}$, das beim Teilungsprozess an die Tochterzelle weitergereicht wird. Zur gleichen Zeit während der Polymerisation katalysiert das neue wachsende Polymer P die Aktivierung der katalytisch inaktiven Membranbausteine M^* zu den katalytisch aktiven Membranbausteinen M . Im aktiven Zustand katalysieren die Membranbausteine M ihre eigene Verdoppelung und die Abspaltung der Tochterzelle. Dabei wird ein Teil des Metabolismus A_d mit der Degradationsrate v_{dA} , das neu gebildete Polymer $P_{t,d}$ mit der Degradationsrate v_{dP} und ein Teil der neu gebildeten Membran M_d^* mit der Degradationsrate v_{dM} abgespalten.

Die Modellstruktur nach dem Vorbild der Goldbeter-Minimalkaskade ermöglicht eine sehr gute Verknüpfung der einzelnen *funktionalen Module*. So beeinflussen sich der Metabolismus und das Polymerisationssystem gegenseitig. Zusätzlich hängt das

4.1 Modell einer selbst-reproduzierenden in-silico Protozelle

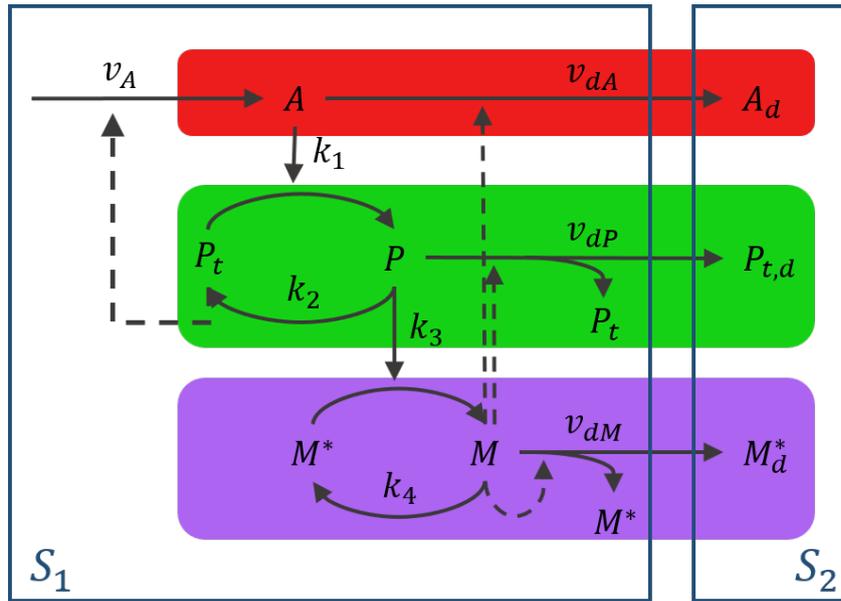


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Modells einer in-silico Protozelle basierend auf der Minimalkaskade von Goldbeter und bestehend aus den *funktionalen Modulen* **Metabolismus**, **Polymerisation** und **Container** angelehnt an das Chemoton-Modell von Gánti. Die Mutterzelle, bestehend aus dem Metabolismus A , dem Polymertemplate P_t , dem neuen wachsenden Polymerstrang P , katalytisch inaktiven Membranbausteinen M^* und katalytisch aktiven Membranbausteinen M , bildet das System S_1 . Durch den Protozellteilungsprozess entsteht aus dem von der Mutterzelle abgestoßenen Material das System S_2 , das als Tochterzelle bezeichnet werden kann. Die Tochterzelle besteht anfangs ausschließlich aus der Metabolismuskomponenten A_d , dem Polymertemplate $P_{t,d}$ und der Membran, die zunächst nur die katalytisch inaktiven Membranbausteine M_d^* enthält. Dabei werden zwei Reaktionsarten unterschieden: Katalyse (\rightarrow) und Induktion (\dashrightarrow). [69]

Membranwachstum von dem neu synthetisierten Polymer ab und beeinflusst alle drei verknüpften *funktionalen Module*. Diese Wechselwirkungen sorgen für die Synchronisation der einzelnen *funktionalen Module*. Somit wird der selbst-reproduzierende Charakter dieses Protozellmodells durch die Funktionalität des Membransystems bestimmt. Nach der Aktivierung eines Membranbausteins durch das Polymer P , bindet dieser an einen zweiten katalytisch aktiven Membranbaustein und induziert seine Verdoppelung. Nach dem Verdoppelungsprozess werden zwei der neu generierten Membranbausteine bei der Abspaltung der Tochterzelle inaktiv und eins verbleibt im aktiven Zustand und kann so den nächsten Verdoppelungszyklus der

4 Modularisierungsansatz

Membranbausteine induzieren. Hierbei sei darauf hingewiesen, dass das Membranwachstum auf zwei unterschiedliche Weisen beschrieben wird. Im ersten Schritt wird angenommen, dass die neu gebildeten Membranbausteine im Inneren der Mutterzelle verbleiben und erst bei der Protozellteilung die Membran der Tochterzelle formen, so dass die Volumenänderung zunächst vernachlässigt werden kann. Später werden auch Volumenänderungen betrachtet, die durch die Annahme zustande kommen, dass die neu gebildeten Membranbausteine in die Membran der Mutterzelle eingebaut werden und somit zur Oberflächen- und Volumenzunahme führen. Bei der Protozellteilung wird anschließend ein Teil der Mutterzellmembran als Tochterzellmembran abgespalten.

Bei der Modellierung des in-silico Protozellmodells nach dem Modularisierungsansatz kommt ein Petrinetz mit drei Knoten zum Einsatz (Abb. 4.3), die drei unterschiedliche Operationsmodi darstellen. Wie in der Abbildung 4.3 zu erkennen ist, befindet sich das System im *Normalmodus*, wenn $P_t + P = P_{tot}$ und $M^* + M = M_{tot}$ gilt. Das heißt, in diesem Modus gleicht die Gesamtmenge aller Polymere P_{tot} genau der Summe aus dem Polymertemplate P_t und dem neu gebildeten Polymer P . Die Gesamtmenge aller Membranbausteine M_{tot} setzt sich dabei zusammen aus der Summe der katalytisch inaktiven M^* und der katalytisch aktiven Membranbausteine M .

Im *Normalmodus* wird die in-silico Protozelle durch folgende Reaktionsgleichungen beschrieben:



4.1 Modell einer selbst-reproduzierenden in-silico Protozelle

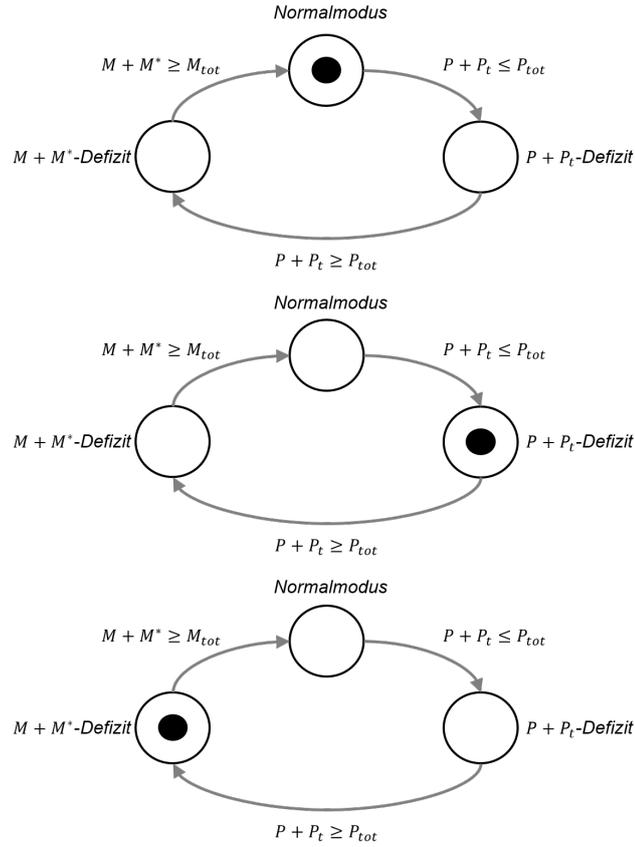


Abbildung 4.3: Darstellung der drei verschiedenen Operationsmodi des in-silico Protozellmodells als Petrinetz. Das System befindet sich im *Normalmodus*, wenn die Gesamtmenge der Polymere P_{tot} gleich der Menge des Polymertemplates P_t und des neu synthetisierten Polymers P ist ($P_t + P = P_{tot}$) und wenn die Gesamtmenge der Membranbausteine M_{tot} sich aus der Menge der katalytisch inaktiven Membranbausteine M^* und der katalytisch aktiven Membranbausteine M zusammensetzt ($M^* + M = M_{tot}$) (oben). Ist die Summe des Polymertemplates P_t und des neu gebildeten Polymers P kleiner als die Polymergesamtmenge P_{tot} ($P_t + P < P_{tot}$), befindet sich das System im Modus des $P + P_t$ -Defizites (Mitte). Im Modus des $M + M^*$ -Defizites befindet sich das System im Fall, dass die Summe der katalytisch inaktiven Membranbausteine M^* und der katalytisch aktiven Membranbausteine M kleiner als die Gesamtmenge aller Membranbausteine M_{tot} ist (unten). [69]



Aus den Reaktionsgleichungen (4.1)-(4.8) für den Fall, dass das System sich im *Normalmodus* befindet, ergeben sich folgende Differentialgleichungen, die für die numerische Berechnung der Systemdynamik verwendet werden:

4 Modularisierungsansatz

$$\frac{dA}{dt} = v_A P_t - \frac{v_{dA} M A}{K_{mdA} + A} \quad (4.9)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_P A P_t}{K_{mP} + P_t} - \frac{k_{Pt} P}{K_{mPt} + P} - v_{dP} M P \quad (4.10)$$

$$\frac{dP_t}{dt} = -\frac{k_P A P_t}{K_{mP} + P_t} + \frac{k_{Pt} P}{K_{mPt} + P} + v_{dP} M P \quad (4.11)$$

$$\frac{dM}{dt} = \frac{k_M P M^*}{K_{mM} + M^*} - \frac{k_{M^*} M}{K_{mM^*} + M} - v_{dM} M^2 \quad (4.12)$$

$$\frac{dM^*}{dt} = -\frac{k_M P M^*}{K_{mM} + M^*} + \frac{k_{M^*} M}{K_{mM^*} + M} + v_{dM} M^2 \quad (4.13)$$

$$\frac{dA_d}{dt} = \frac{v_{dA} M A}{K_{mdA} + A} \quad (4.14)$$

$$\frac{dP_{t,d}}{dt} = v_{dP} M P \quad (4.15)$$

$$\frac{dM_d^*}{dt} = v_{dM} M^2 \quad (4.16)$$

Betrachtet man die Differentialgleichungen des Polymersystems und des Membransystems, kann man leicht erkennen, dass die Polymergesamtmenge $P + P_t$ und die Gesamtmenge der Membranbausteine $M + M^*$ im *Normalmodus* konstant bleiben. Nach der Protozellteilung, wenn die Tochterzelle abgespalten wird, kann es jedoch passieren, dass die Gesamtmenge der an die Tochterzelle abgegebene Polymere nicht ausreichend ist, das heißt die Bedingung einer vordefinierten Gesamtmenge der Polymere nicht erfüllt ist: $P_t + P < P_{tot}$. In diesem Fall befindet sich das System im $P + P_t$ -Defizit-Modus, in dem es zunächst ausschließlich den Bestand an P and P_t der Mutterzelle (2. Generation) auffüllt und erst im Anschluss mit der Synthese des Polymers für die Tochterzelle (2. Generation) $P_{t,d}$ beginnt. Für diesen Fall ändert sich die Abspaltungsgleichung (4.7) folgendermaßen:



Somit müssen die Differentialgleichungen für die Polymertemplates sowohl der Mutterzelle (2. Generation) P_t als auch der Tochterzelle (2. Generation) $P_{t,d}$ an die neuen Anforderungen angepasst werden:

$$\frac{dP_t}{dt} = -\frac{k_P A P_t}{K_{mP} + P_t} + \frac{k_{Pt} P}{K_{mPt} + P} + 2v_{dP} M P \quad (4.18)$$

$$\frac{dP_{t,d}}{dt} = 0 \quad (4.19)$$

Ebenso kann nach der Protozellteilung der Fall eines Membranbaustein-Defizites eintreten. In diesem Fall geht das System in den Modus $M + M^*$ -Defizit (Abb.4.3, S. 27) über und füllt zunächst seinen Membranbausteinbestand auf, bevor Membranbausteine für die nächste Protozellgeneration gebildet werden. Damit verändert sich die selbst-reproduzierende Reaktionsgleichung der Membranbausteine:



Für den $M + M^*$ -Defizit-Modus ergeben sich damit folgende Differentialgleichungen:

$$\frac{dM^*}{dt} = -\frac{k_M P M^*}{K_{mM} + M^*} + \frac{k_{M^*} M}{K_{mM^*} + M} + 2v_{dM} M^2 \quad (4.21)$$

$$\frac{dM_d^*}{dt} = 0 \quad (4.22)$$

Während die Bildung der inaktiven Membranbausteine im Vergleich zum *Normalmodus* verstärkt wird, erfolgt keine Produktion der Tochterzellmembranbausteine.

4.2 Simulationsergebnisse

Die numerische Berechnung und Simulation des in-silico Protozell-Modells nach den Vorbildmodellen Chemoton und Minimalkaskade, die mit den Anfangsbedingungen und dem Parametersatz gelistet in Tab. 4.1 erfolgt, zeigt ein oszillatorisches Verhalten der drei betrachteten *funktionalen Module* der Mutterzelle im *Normalmodus* (Abb. 4.4).

Das oszillatorische Verhalten der Mutterzellzustände zeigt sich in allen drei *funktionalen Modulen*: Wenn die Aktivität des Metabolismus A - induziert durch das freie Polymertemplate P_t - steigt, nimmt die Menge des neu synthetisierten Polymers P aufgrund der katalytischen Einflussnahme des Metabolismus auf die Polymerreplikation zu. Mit der fortschreitenden Polymerreplikation und dem daraus folgenden Anstieg von P nimmt die Menge des freien Polymertemplates P_t ab, was zur Abnahme

4 Modularisierungsansatz

Tabelle 4.1: Bei der numerischen Berechnung verwendete Anfangsbedingungen (AB) und Parametersatz des in-silico Protozell-Modells nach dem Modularisierungsansatz bei konstantem Volumen.

Zelle	AB/ Parameter	Bedeutung	Wert
Mutterzelle	A_0	Metabolismus	0.5
	P_{t_0}	Polymertemplate	2.0
	M_0^*	katalytisch inaktiver Membranbaustein	2.0
	P_0	neu synthetisiertes Polymer	0.0
	M_0	katalytisch aktiver Membranbaustein	0.0
	P_{tot}	Gesamtmenge der Polymere	2.0
	M_{tot}	Gesamtmenge der Membranbausteine	2.0
	v_A	Aktivierungsrate des Metabolismus	0.025
	K_{mdA}	Gleichgewichtskonstante der Metabolismusdegradation	0.002
	K_{mP}	Gleichgewichtskonstante der Polymersynthese	0.001
	K_{mPt}	Gleichgewichtskonstante der Polymerspaltung	0.001
	K_{mM}	Gleichgewichtskonstante der Membranbausteinaktivierung	0.001
	K_{mM^*}	Gleichgewichtskonstante der Membranbausteindeaktivierung	0.001
	k_P	Polymersynthesekonstante	3.0
	k_{Pt}	Polymerspaltungskonstante	1.5
	k_M	Aktivierungskonstante des Membranbausteins	1.0
	k_{M^*}	Deaktivierungskonstante des Membranbausteins	0.5
	v_{dA}	Degradationskonstante des Metabolismus	0.02
v_{dP}	Degradationskonstante des Polymers	0.02	
v_{dM}	Degradationskonstante der Membranbausteine	0.02	
Tochterzelle	A_{d_0}	Metabolismus	0.0
	P_{t,d_0}	Polymertemplate	0.0
	$M_{d_0}^*$	katalytisch inaktive Membranbausteine	0.0
	$A_{d_0}(t = 16.6 ZE)$	Metabolismus nach der Teilung	0.4629
	$P_{d_0}(t = 16.6 ZE)$	neu synthetisiertes Polymer nach der Teilung	0.0
	$P_{t,d_0}(t = 16.6 ZE)$	Polymertemplate nach der Teilung	0.6275
	$M_{d_0}(t = 16.6 ZE)$	katalytisch aktiver Membranbaustein nach der Teilung	0.0
	$M_{d_0}^*(t = 16.6 ZE)$	katalytisch inaktiver Membranbaustein nach der Teilung	0.8671

der Aktivität des Metabolismus A führt. Nimmt die Menge des neu synthetisierten Polymers P zu, nimmt auch die Menge der katalytisch aktiven Membranbausteine M zu, da das wachsende Polymer P die Umwandlung der Membranbausteine vom katalytisch inaktiven Zustand M^* zum katalytisch aktiven Zustand M katalysiert. Bei hohen Konzentrationen des katalytisch aktiven Membranbausteines M nehmen sowohl die Aktivität des Metabolismus A als auch die Menge des neu synthetisierten Polymers P wieder ab aufgrund derer Umwandlung in Tochterzellkomponenten, die durch die katalytisch aktiven Membranbausteine M induziert wird. Die katalytische Aktivität der Membranbausteine M nimmt während der Degradation von den Tochterzellkomponenten A_d , $P_{t,d}$ and M_d^* ab, da zum einen die Membranbausteine

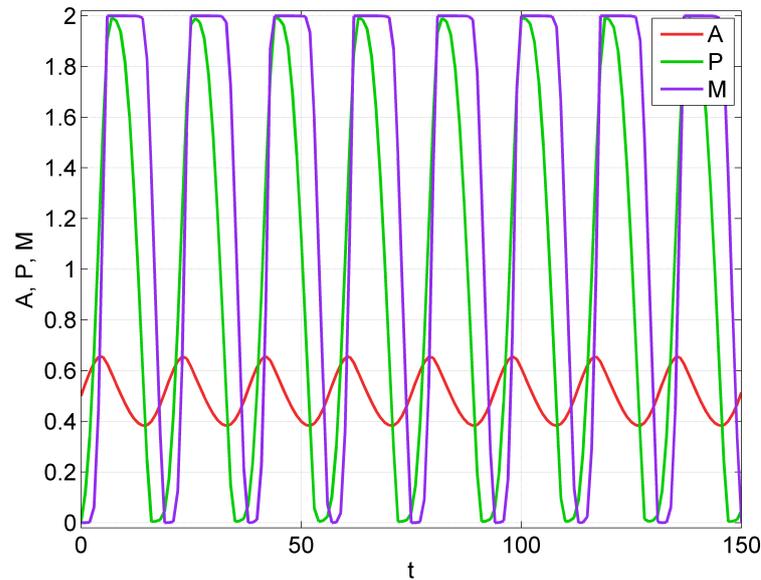


Abbildung 4.4: Simulationsergebnisse des in-silico Protozellmodells nach dem Modularisierungsansatz im *Normalmodus*. Dargestellt ist das dynamische Verhalten *funktionaler Module* der Mutterzelle: Metabolismus A , neu synthetisiertes Polymer P und katalytisch aktive Membranbausteine M .

selbst zu katalytisch inaktiven Membranbausteinen der Tochterzelle umgewandelt werden und zum anderen im selbst-reproduzierenden Prozess des Membransystems die Membranbausteine zwar verdoppelt werden, diese jedoch initial katalytisch inaktiv sind. Sobald der Polymerdoppelstrang in das Polymertemplate P_t und das Polymertemplate der Tochterzelle $P_{t,d}$ aufgespalten wird, katalysiert durch die katalytisch aktiven Membranbausteine M , steigt die Aktivität des Metabolismus A wieder und ein neuer Protozellzyklus sowie eine neue Reaktionskaskade starten.

Bei der Betrachtung der Tochterzellkomponenten muss beachtet werden, dass hier lediglich deren Bildung betrachtet wird und deren Prozess nach der Protozellteilung zunächst außer Acht zu lassen ist. In den Abbildungen 4.5 und 4.6 sind die jeweils korrespondierenden Komponenten der Mutter- und Tochterzelle für ungefähr einen Protozellzyklus dargestellt. So ist beispielsweise deutlich zu erkennen, dass erst wenn das Level des Mutterzell-Metabolismus A abnimmt, der Tochterzell-Metabolismus A_d zunimmt aufgrund der Umwandlung von A zu A_d beim Protozellteilungsprozess (Abb. 4.5). Das gleiche Verhalten ist bezüglich des Polymertemplates der Tochter-

4 Modularisierungsansatz

zelle zu beobachten: Erst wenn das neu synthetisierte Polymer der Mutterzelle P ein höheres Level als das Mutterzell-Polymer-template P_t erreicht, beginnt die Degradation des Polymer-templates der Tochterzelle $P_{t,d}$ aus der Mutterzelle, was am Anstieg von $P_{t,d}$ zu erkennen ist (Abb. 4.5). Auch das Verhältnis der katalytisch inaktiven und katalytisch aktiven Membranbausteine der Mutterzelle, M^* und M , muss sich zunächst umkehren, bevor die Bildung der Tochterzell-Membranbausteine M_d^* einsetzt (Abb. 4.6).

Zur Wahl der in Tabelle 4.1 (S. 30) aufgeführten Parameter sei gesagt, dass im Prozess der Modellentwicklung zunächst Parameterwerte aus den Vorbildmodellen genutzt wurden und diese an die veränderte Modellstruktur angepasst wurden. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass das Modell sehr robust bezüglich Parameterunsicherheiten ist (Abb. 4.7). Werden alle Parameter um +20% ausgelenkt, erkennt man, dass sich der Protozellzyklus lediglich verkürzt und bei einer Auslenkung von -20% verlängert. Das gewünschte oszillatorische Verhalten in allen drei *funktionalen Modulen* bleibt jedoch erhalten.

4.2.1 Selbst-Reproduzierbarkeit

Wie bereits erwähnt, wird bei der Simulation des dynamischen Verhaltens der Mutterzelle nicht spezifiziert, was mit den abgespaltenen Tochterzellkomponenten geschieht. Um die Selbstreproduzierbarkeit des entwickelten Protozellsystems zu testen, muss untersucht werden, ob die degradierten Tochterzellkomponenten A_d , $P_{t,d}$ und M_d^* zum Zeitpunkt der Protozelleilung in einer ausreichenden Menge vorliegen, um einen neuen Protozellzyklus zu starten. Es wird angenommen, dass die Protozelleilung zum Teilungszeitpunkt t_{div} erfolgt, zu welchem die Konzentration von katalytisch aktiven Membranbausteinen der Mutterzelle M unter einen bestimmten Wert fällt aufgrund ihrer Degradation während des Teilungsprozesses. Es werden die Konzentrationen der Tochterzellkomponenten zum Zeitpunkt der ersten Protozelleilung $t_{div} = 16.6 ZE$ (ZE - Zeiteinheit) bestimmt und diese als Anfangsbedingungen für die abgespaltene Tochterzelle definiert (Tab. 4.1, S. 30).

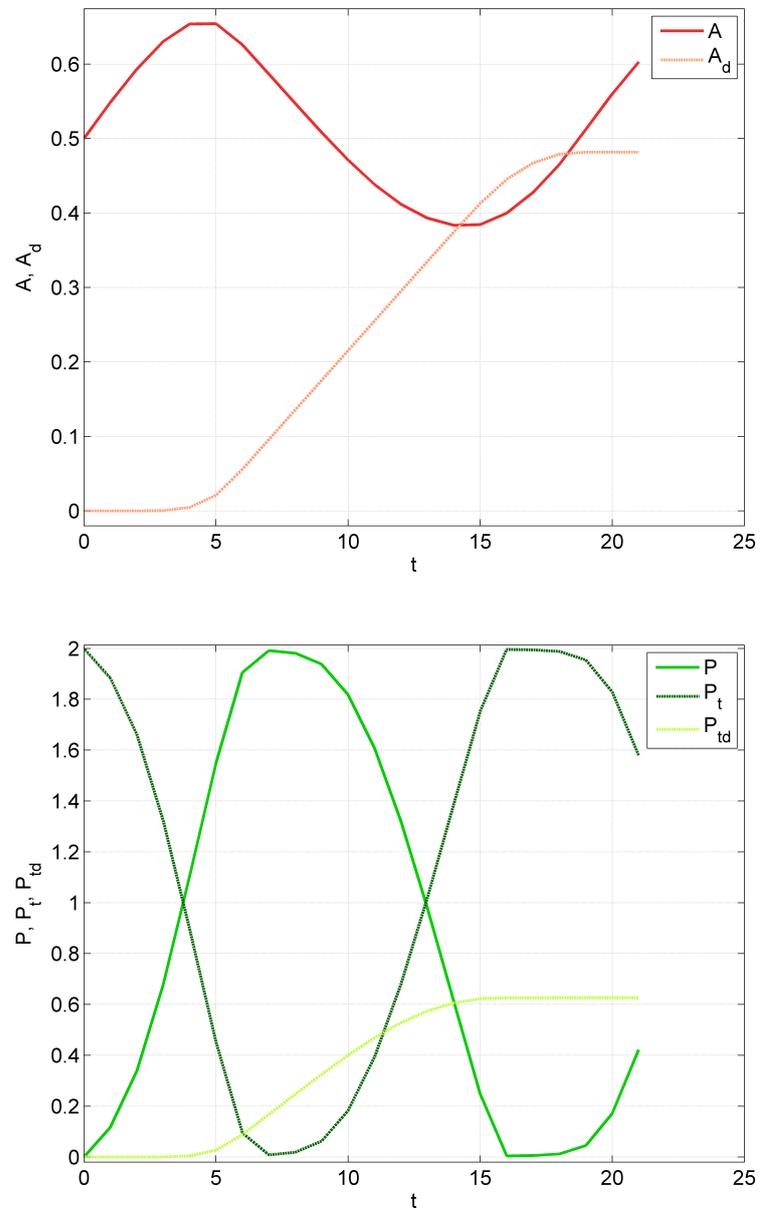


Abbildung 4.5: Simulationsergebnisse des in-silico Protozellmodells nach dem Modularisierungsansatz im *Normalmodus* bezüglich Metabolismus- und Polymerisationskomponenten während eines Protozellzyklus. Vergleich der zeitlichen Änderungen der Komponenten der *funktionalen Module* Metabolismus der Mutterzelle A und Tochterzell-Metabolismus A_d (oben) sowie Polymertemplate der Mutterzelle P_t , neu synthetisiertes Polymer der Mutterzelle P und Polymertemplate der Tochterzelle $P_{t,d}$ (unten).

4 Modularisierungsansatz

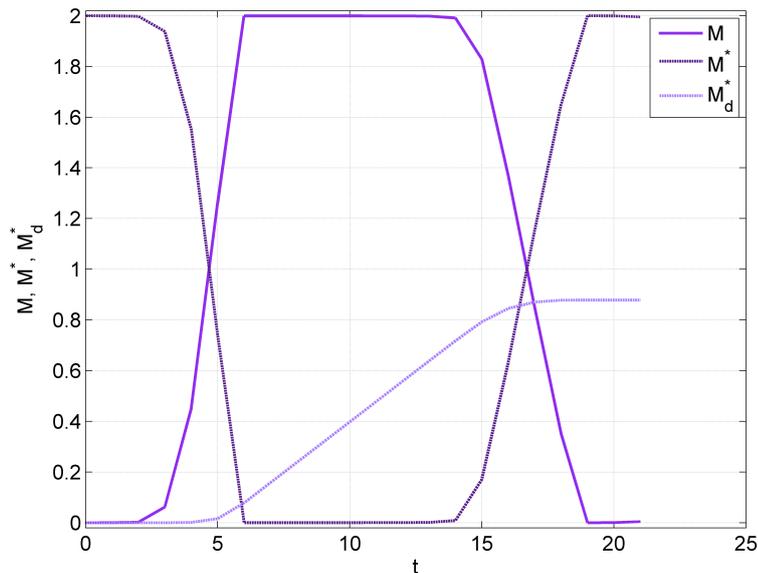


Abbildung 4.6: Simulationsergebnisse des in-silico Protozellmodells nach dem Modularisierungsansatz im *Normalmodus* bezüglich der Membrankomponenten während eines Protozellzyklus. Vergleich der zeitlichen Änderungen der Komponenten des *funktionalen Moduls* Container: katalytisch inaktive Membranbausteine der Mutterzelle M^* , katalytisch aktive Membranbausteine der Mutterzelle M und katalytisch inaktive Membranbausteine der Tochterzelle M_d^* .

Wie in der Abbildung 4.8 zu erkennen ist, zeigt die Tochterzelle nach der ersten Protozellteilung ebenfalls ein periodisches Verhalten. Somit liegen die degradierten Komponenten in ausreichenden Mengen vor, um einen neuen Protozellzyklus zu starten. Dennoch ist es erkennbar, dass die Tochterzelle eine gewisse Adaptierungsphase benötigt, da sie sich zunächst in dem Komponenten-Defizit-Modus befindet. Die bestimmten Anfangsbedingungen nach der ersten Protozellteilung zwingen das System zunächst in den $P_d + P_{t,d}$ -Defizit-Modus überzugehen und den Polymermangel auszugleichen (Abb. 4.3, S. 27). Das Polymerisationssystem wird so lange aufgefüllt, bis die Bedingung $P_d + P_{t,d} = P_{tot}$ erfüllt ist. Erst dann wird auch der Membranbaustein-Defizit im $M_d + M_d^*$ -Defizit-Modus ausgeglichen, bis die Bedingung $M_d + M_d^* = M_{tot}$ erfüllt ist. Sind alle Defizite ausgeglichen, geht die Tochterzelle in den *Normalmodus* über, etwa nach 215 *ZE*. Befindet sie sich erst im *Normalmodus*, dann erkennt man das gleiche dynamische Verhalten wie bei der Betrachtung

4.2 Simulationsergebnisse

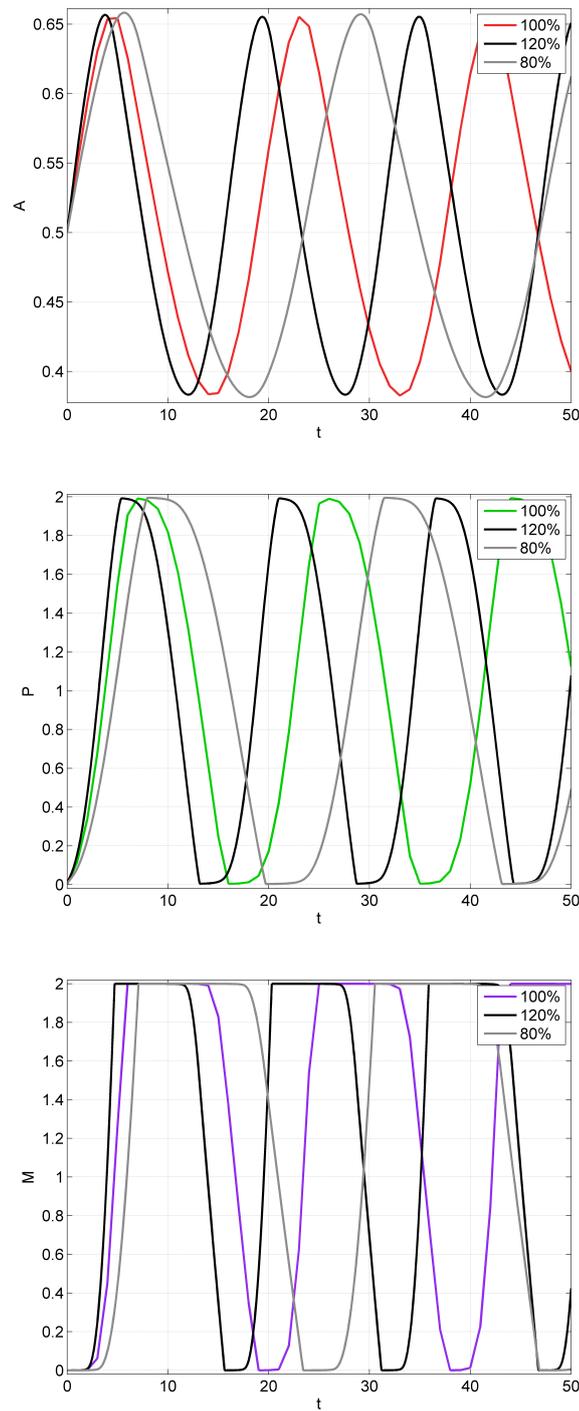


Abbildung 4.7: Globale Modellrobustheit bezüglich Parameterunsicherheiten. Auswirkungen der globalen Auslenkung der Parameter um $\pm 20\%$ auf die *funktionalen Module*: Metabolismussystem (oben), Polymersystem (Mitte) und Membransystem (unten).

4 Modularisierungsansatz

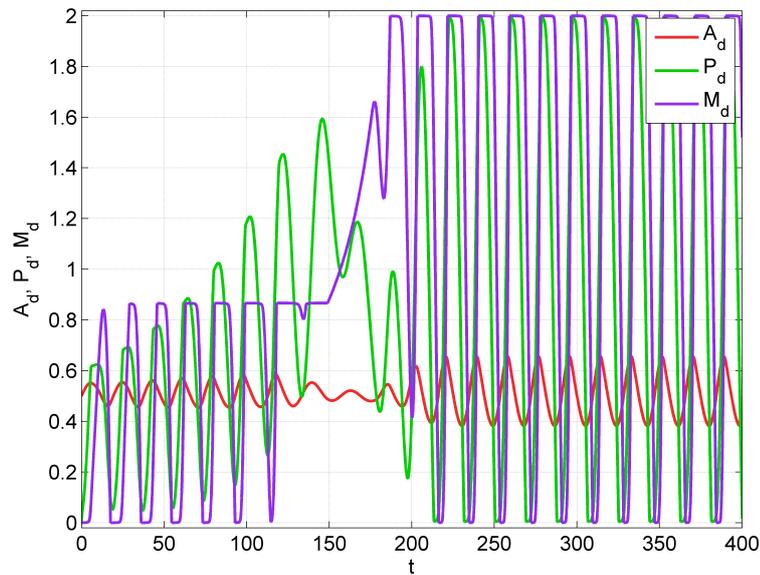


Abbildung 4.8: Simulationsergebnisse der Tochterzelle des in-silico Protozellmodells nach der ersten Protozellteilung im *Defizit*-Modus. Dargestellt ist das dynamische Verhalten des Metabolismus der Tochterzelle A_d , des neu synthetisierten Polymers der Tochterzelle P_d und der katalytisch aktiven Membranbausteine der Tochterzelle M_d .

der Mutterzelle. Durch die verwendete Modellstruktur und die geeignete Wahl der Modi-Bedingungen des verwendeten Petrinetzes besitzt das Protozellmodell einen robusten selbst-reproduzierenden Charakter.

4.2.2 Volumenänderung

Bislang wurde die Protozelle mit einem konstanten Volumen während des gesamten Protozellzyklus betrachtet, indem angenommen wurde, dass die neu gebildeten Membranbausteine sich im Inneren der Mutterzelle befinden und erst im Teilungsprozess das Membransystem der Tochterzelle bilden. Bei der Betrachtung des Falls, dass die neu gebildeten Membranbausteine in die Membran eingebaut werden, inspiriert durch die realen Prozesse einer lebenden Zelle, müssen Volumenänderungen infolge der Oberflächenzunahme der Membran berücksichtigt werden. Für diesen Zweck

müssen die Differentialgleichungen durch einen Verdünnungsterm ergänzt werden. Unter der Annahme einer beliebigen Protozellgeometrie kann für das Protozellvolumen folgende Gleichung angenommen werden:

$$V = V_0 + V_0\sigma M \quad (4.23)$$

Dabei geht man davon aus, dass sich das Volumen V proportional zur Änderung des aktiven Membranbildungsblocks M ändert, der in die Membran eingebaut wird und zur Volumenvergrößerung führt. Der Proportionalitätsparameter σ beschreibt dabei den Anteil der Volumenzunahme, die durch den Einbau eines katalytisch aktiven Membranbausteins M zustande kommt. Durch die Annahme, dass das Volumen V eine Funktion der Zeit t und des katalytisch aktiven Membranbausteins M ist ($V = f(t, M)$), ergibt sich das totale Differential der Volumengleichung (4.23):

$$dV = \frac{\partial f(t, M)}{\partial t} dt + \frac{\partial f(t, M)}{\partial M} dM \quad (4.24)$$

Mittels Anwendung der Kettenregel für multivariate Funktionen ergibt sich die Gleichung für die Volumenänderung:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\partial f(t, M)}{\partial t} + \frac{\partial f(t, M)}{\partial M} \frac{dM}{dt} \quad (4.25)$$

Nach Ableiten der Funktion $f(t, M)$ ist die Gleichung für die Volumenänderung wie folgt definiert:

$$\frac{dV}{dt} = V_0\sigma M \frac{dM}{dt} \quad (4.26)$$

Wird angenommen, dass sich die katalytisch aktiven Membranbausteine M zeitlich durch die kinetischen Reaktionen und durch die Verdünnung ändern:

$$\frac{dM}{dt} = r_M - \frac{M}{V} \frac{dV}{dt}, \quad (4.27)$$

wobei r_M die kinetischen Terme der katalytisch aktiven Membranbausteine definiert:

$$r_M = \frac{k_M P M^*}{K_{mM} + M^*} - \frac{k_{M^*} M}{K_{mM^*} + M} - v_{dM} M^2, \quad (4.28)$$

4 Modularisierungsansatz

so ergibt sich durch das Einsetzen der Gleichung (4.27) in die Volumenänderungsgleichung (4.26) der Verdünnungsterm:

$$\frac{1}{V} \frac{dV}{dt} = \frac{V_0 \sigma r_M}{V + V_0 \sigma M} \quad (4.29)$$

Das in-silico Protozell-Modell für den Fall der Protozell-Volumenänderung kann somit durch das folgende Differentialgleichungssystem unter Berücksichtigung des Verdünnungseffektes beschrieben werden:

$$\frac{dA}{dt} = v_A P_t - \frac{v_{dA} M A}{K_{mdA} + A} - \frac{A}{V} \frac{dV}{dt} \quad (4.30)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_P A P_t}{K_{mP} + P_t} - \frac{k_{Pt} P}{K_{mPt} + P} - v_{dP} M P - \frac{P}{V} \frac{dV}{dt} \quad (4.31)$$

$$\frac{dP_t}{dt} = -\frac{k_P A P_t}{K_{mP} + P_t} + \frac{k_{Pt} P}{K_{mPt} + P} + v_{dP} M P - \frac{P_t}{V} \frac{dV}{dt} \quad (4.32)$$

$$\frac{dM}{dt} = \frac{k_M P M^*}{K_{mM} + M^*} - \frac{k_{M^*} M}{K_{mM^*} + M} - v_{dM} M^2 - \frac{M}{V} \frac{dV}{dt} \quad (4.33)$$

$$\frac{dM^*}{dt} = -\frac{k_M P M^*}{K_{mM} + M^*} + \frac{k_{M^*} M}{K_{mM^*} + M} + v_{dM} M^2 - \frac{M^*}{V} \frac{dV}{dt} \quad (4.34)$$

$$\frac{dA_d}{dt} = \frac{v_{dA} M A}{K_{mdA} + A} - \frac{A_d}{V} \frac{dV}{dt} \quad (4.35)$$

$$\frac{dP_{t,d}}{dt} = v_{dP} M P - \frac{P_{t,d}}{V} \frac{dV}{dt} \quad (4.36)$$

$$\frac{dM_d^*}{dt} = v_{dM} M^2 - \frac{M_d^*}{V} \frac{dV}{dt} \quad (4.37)$$

Durch die Ergänzung der partiellen Differentialgleichungen mit den Verdünnungstermen, ändert sich der Bereich, in dem periodische Lösungen möglich sind. Somit müssen die Anfangsbedingungen und die Parameter angepasst werden. Die Tabelle 4.2 fasst die für die Berechnung verwendeten Anfangsbedingungen und den Parametersatz zusammen.

Das Modell der in-silico Protozelle nach den Vorbildmodellen Chemoton und Minimalzelle zeigt auch für den Fall der Volumenänderung ein stabiles, periodisches Verhalten. In der Abbildung 4.9 ist zu erkennen, dass die Anpassung des Parametersatzes zur Kompensation des Verdünnungseffektes einen längeren Zellzyklus zur Folge hat. Das dynamische Verhalten des Protozellmodells bleibt jedoch erhalten: Auch im Fall der Volumenänderung ist zu beobachten, dass bei steigender Aktivität des Metabolismus A die Konzentration des neu synthetisierten Polymers P ebenfalls

Tabelle 4.2: Bei der numerischen Berechnung verwendete Anfangsbedingungen (AB) und Parametersatz des in-silico Protozell-Modells nach dem Modularisierungsansatz bei Betrachtung der Volumenänderung.

Zelle	AB/ Parameter	Bedeutung	Wert
Mutterzelle	A_0	Metabolismus	0.1
	P_{t_0}	Polymertemplate	2.0
	M_0^*	katalytisch inaktiver Membranbaustein	2.0
	P_0	neu synthetisiertes Polymer	0.0
	M_0	katalytisch aktiver Membranbaustein	0.0
	V_0	Volumen	100.0
	v_A	Aktivierungsrate des Metabolismus	0.01
	K_{mdA}	Gleichgewichtskonstante der Metabolismusdegradation	$1 * 10^{-4}$
	K_{mP}	Gleichgewichtskonstante der Polymersynthese	$1 * 10^{-4}$
	K_{mPt}	Gleichgewichtskonstante der Polymerspaltung	$1 * 10^{-4}$
	K_{mM}	Gleichgewichtskonstante der Membranbausteinaktivierung	$1 * 10^{-4}$
	K_{mM^*}	Gleichgewichtskonstante der Membranbausteindeaktivierung	$1 * 10^{-4}$
	k_P	Polymersynthesekonstante	2.0
	k_{Pt}	Polymerspaltungskonstante	0.1
	k_M	Aktivierungskonstante des Membranbausteins	0.5
	k_{M^*}	Deaktivierungskonstante des Membranbausteins	0.3
	v_{dA}	Degradationskonstante des Metabolismus	0.01
	v_{dP}	Degradationskonstante des Polymers	0.02
	v_{dM}	Degradationskonstante der Membranbausteine	0.01
	σ	Proportionalitätsfaktor	1.0
Tochterzelle	A_{d_0}	Metabolismus	0.0
	P_{t,d_0}	Polymertemplate	0.0
	$M_{d_0}^*$	katalytisch inaktive Membranbausteine	0.0

steigt. Durch die Kaskadenstruktur des Modells kommt der Effekt zustande, dass die Bildung der katalytisch aktiven Membranbausteine M eine gewisse Zeit konstant bleibt und erst wenn eine bestimmte Konzentration von P erreicht wird, steigt auch die Konzentration der katalytisch aktiven Membranbausteine M . Haben die katalytisch aktiven Membranbausteine M ihre maximale Konzentration erreicht, hat sich das Anfangsvolumen der Mutterzelle verdoppelt (Abb. 4.9). Während der Bildung der Tochterzellkomponenten des Metabolismus und des Polymersubsystems, d. h. wenn A und P abnehmen, bleibt M zunächst konstant und fällt dann während der Protozellteilung ziemlich schnell auf den Ausgangswert zurück. Die Protozellteilung ist genauso bei der Volumenänderung der Mutterzelle zu beobachten, wobei sich das Volumen halbiert. Nach der Protozellteilung beginnt der Zyklus erneut.

Durch die vorliegende Modellstruktur und den Zusammenhang zwischen der Volumen- und Membranbausteinänderung wird die Volumenänderung erwartungsgemäß

4 Modularisierungsansatz

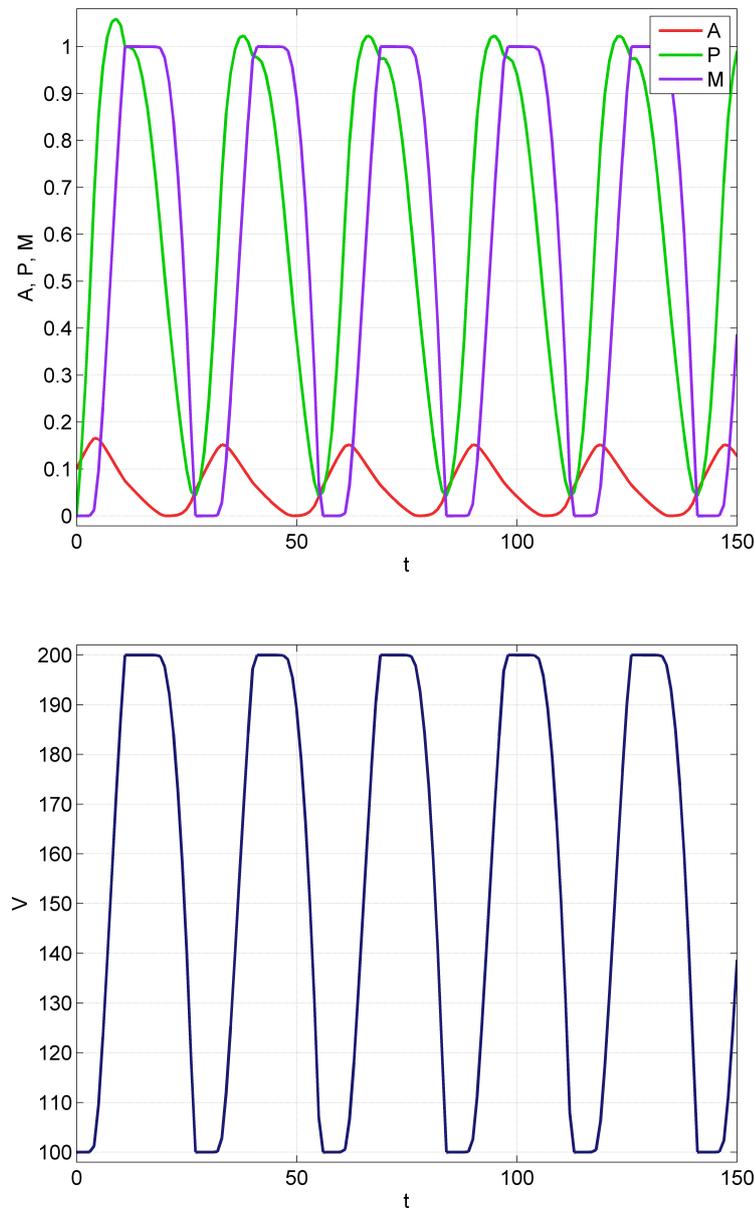


Abbildung 4.9: Simulationsergebnisse des in-silico Protozellmodells nach dem Modularisierungsansatz mit Volumenänderung. Zeitliche Änderungen des Metabolismus der Mutterzelle A , des neu synthetisierten Polymers P und der katalytisch aktiven Membranbausteine M (oben). Volumenänderung der Mutterzelle V (unten).

stark durch die Wahl des Proportionalitätsfaktors σ definiert. Während $\sigma = 0$ bedeutet, dass sich das Volumen nicht ändert und somit auch keine Verdünnungseffekte auftreten, wird für steigende Werte von σ eine Volumenzunahme beobachtet (Abb.

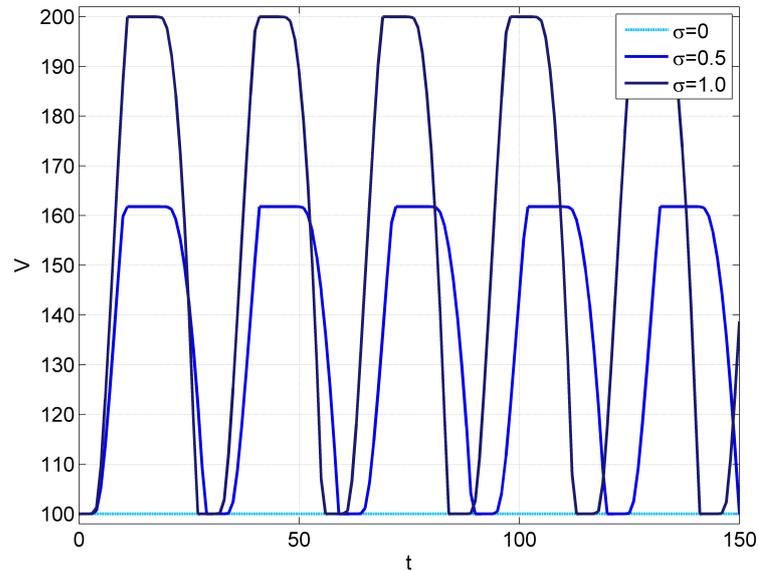


Abbildung 4.10: Simulationsergebnisse der Abhängigkeit des Volumens V des in-silico Protozellmodells nach dem Modularisierungsansatz mit Volumenänderung vom Proportionalitätsfaktor σ .

4.10). Für $\sigma = 1.0$ verdoppelt sich das Volumen in einem Protozellzyklus. Für geringere Werte von σ zeigt sich, dass zum einen die Zyklusdauer zunimmt und zum anderen die bei der Protozellteilung abgespaltene Tochterzelle ein kleineres Volumen hat als ihre Mutterzelle.

Auch im Fall der Volumenänderung der Protozelle ist zu beachten, dass die Darstellung der Tochterzellkomponenten (Abb. 4.11, Abb. 4.12) eine Akkumulation dieser über die Zeit darstellt, d. h. die steigende Konzentration der Tochterzellkomponenten von Zyklus zu Zyklus ist eine Summation über alle vorangegangenen Zyklen, da der Tochterzellzyklus nach deren Abspaltung nicht betrachtet wird.

Vergleicht man die einzelnen Komponenten innerhalb eines Moduls, so stellt man fest, dass die maximalen Konzentrationen der korrespondierenden Modulkomponenten, d. h. des Polymertemplates P_t und des wachsenden Polymers P sowie der katalytisch inaktiven Membranbausteine M^* und der katalytisch aktiven Membranbausteine M zum Ende des Zyklus immer im Verhältnis zwei zu eins stehen (Abb. 4.12). Dieser Effekt der Proportionalitätsänderung kommt durch den Verdünnungseffekt zustande. Wird $\sigma = 0$ angenommen, wodurch das Volumen konstant gehalten wird,

4 Modularisierungsansatz

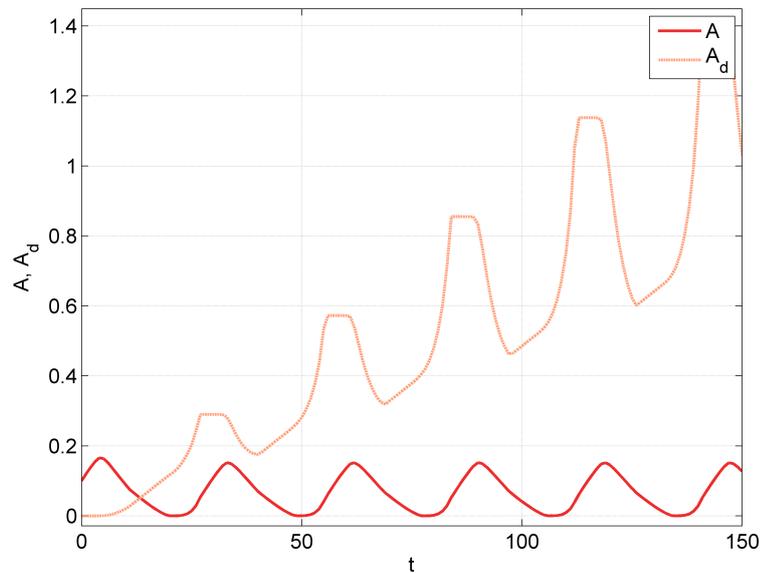


Abbildung 4.11: Simulationsergebnisse der zeitlichen Änderung des Metabolismus der Mutterzelle A und der Tochterzelle A_d im in-silico Protozellmodell nach dem Modularisierungsansatz mit Volumenänderung.

wird deutlich, dass die Umwandlung der korrespondierenden Modulkomponenten wieder im Verhältnis eins zu eins stattfindet (Abb. 4.13), wie im Modell ohne Betrachtung von Volumenänderungen.

4.3 Zusammenfassung

Das nach dem Modularisierungsansatz entwickelte Modell einer in-silico Protozelle basiert auf zwei bestehenden Vorbildmodellen: a) dem Chemoton, welches eine theoretische, synthetische Zelle beschreibt und aus drei verknüpften *funktionalen Modulen* besteht [22] und b) der Goldbeter-Minimalkaskade, die den mitotischen Oszillator lebender Zellen beschreibt und im Vergleich zum Chemoton eine geringere Modellkomplexität sowie einen selbst-reproduzierbaren Charakter von miteinander synchronisierten Modellteilen besitzt [25].

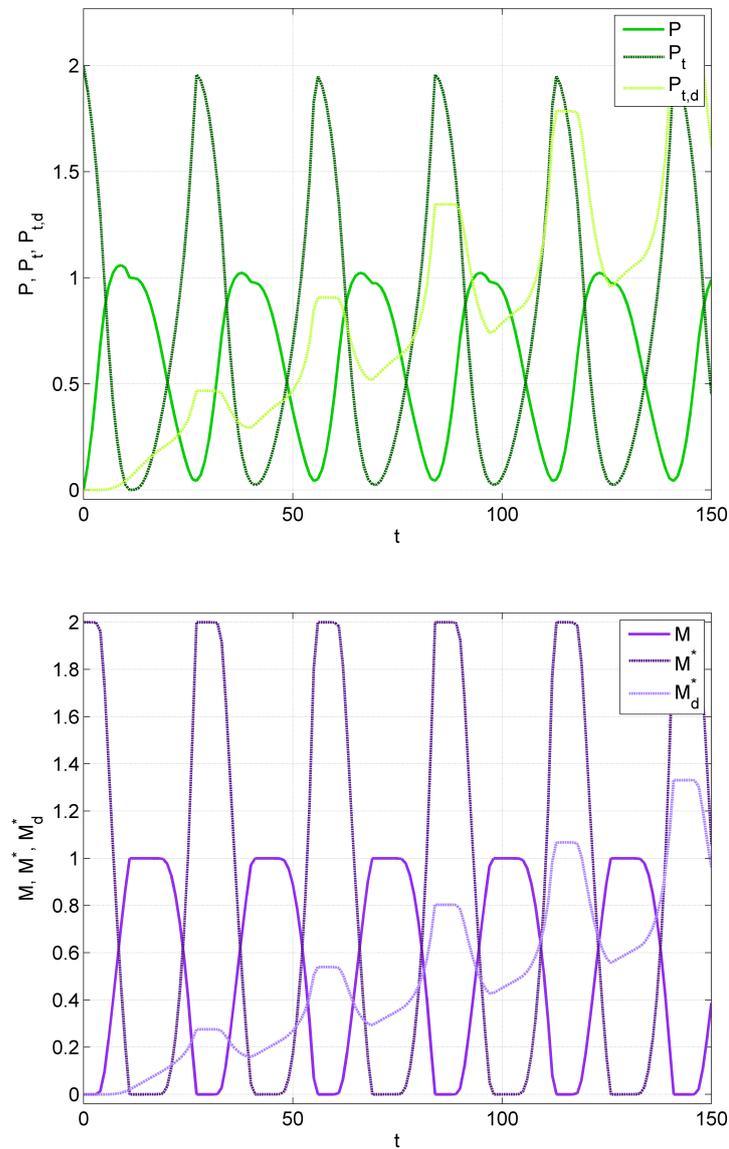


Abbildung 4.12: Simulationsergebnisse der Änderung der korrespondierenden Modulkomponenten im Polymerisations- und Membranmodul des in-silico Protozellmodells nach dem Modularisierungsansatz mit Volumenänderung. Zeitliche Änderung des Polymerisationsmoduls: Polymertemplate der Mutterzelle P_t , neu synthetisiertes Polymer der Mutterzelle P und Polymertemplate der Tochterzelle $P_{t,d}$ (oben). Zeitliche Änderung des Membranmoduls: Katalytisch inaktiven Membranbausteine der Mutterzelle M^* , katalytisch aktiven Membranbausteine der Mutterzelle M und katalytisch inaktiven Membranbausteine der Tochterzelle M_d^* (unten).

4 Modularisierungsansatz

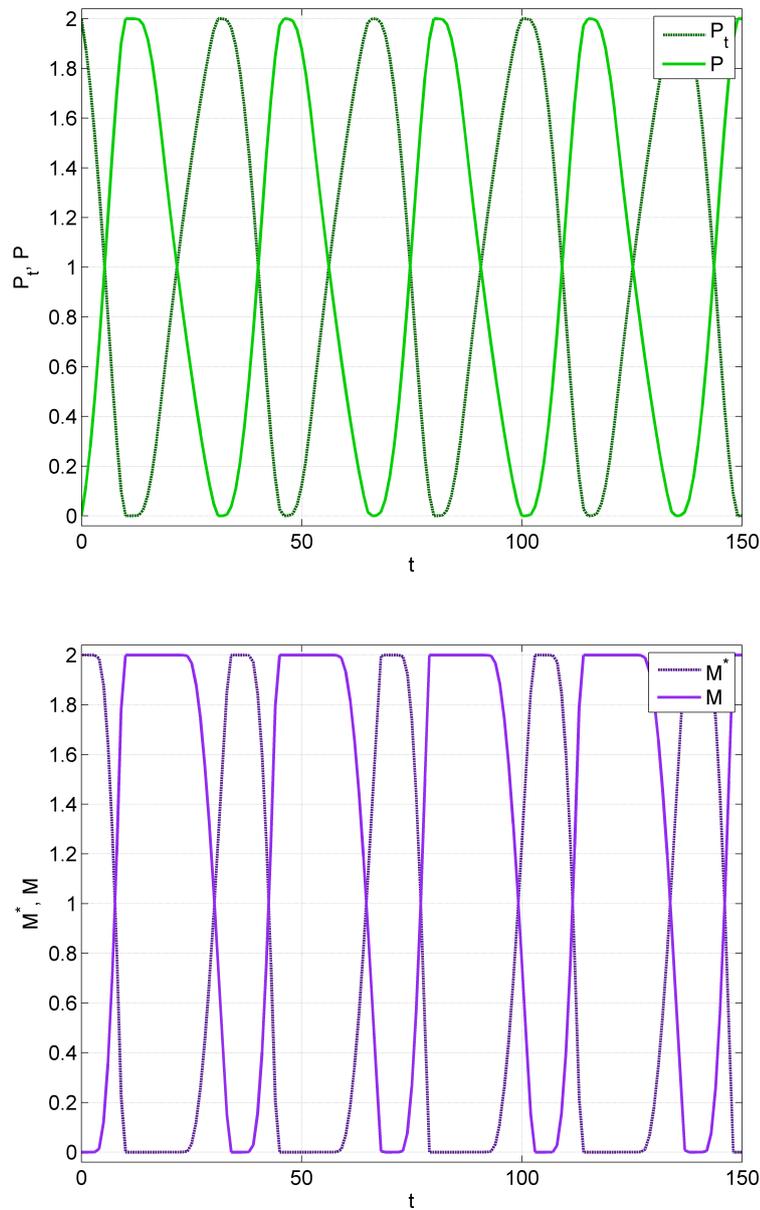


Abbildung 4.13: Simulationsergebnisse der Konzentrationsänderungen von Modulkomponenten des in-silico Protozellmodells nach dem Modularisierungsansatz mit Volumenänderung für $\sigma = 0$. Zeitliche Änderung der korrespondierenden Komponenten der Mutterzelle im Polymerisationsmodul $P_{t,d}$ und P (oben) sowie im Membranmodul M^* und M (unten).

Das aus den Vorbildmodellen entwickelte Modell vereint die Funktionalität des Chemotons mit der Modellstruktur der Minimalkaskade und beschreibt eine robuste,

selbst-reproduzierende in-silico Protozelle. Das bedeutet, dass die nach jedem Protozellzyklus abgespaltenen Komponenten, die sich zu einer Tochterzelle organisieren, in ausreichender Menge vorhanden sind, um einen neuen Protozellzyklus in der Tochterzelle zu starten. Dieses Wachstums-Teilungsverhalten wurde mit Hilfe eines Petri-Netzes modelliert, so dass es der abgespaltenen Tochterzelle ermöglicht wird zunächst ihre eigenen Komponenten aufzustocken, bevor sie in den nächsten Teilungszyklus übergeht.

Auch wenn das Modell zunächst vereinfacht für ein über den gesamten Protozellzyklus konstantes Protozellvolumen entwickelt wurde, wurde ebenfalls gezeigt, dass bei Annahme einer Volumenänderung für eine allgemeine Protozellgeometrie das Modell ebenfalls ein periodisches Verhalten zeigt. Somit beschreibt das entwickelte Modell einen Protozellzyklus auch beim Auftreten von Verdünnungseffekten als Folge der Volumenzunahme während des Protozellzyklus.

Das mit Hilfe des Modularisierungsansatzes entwickelte Protozellmodell identifiziert elementare *funktionale Module* und Eigenschaften für eine selbst-reproduzierende Protozelle: Versorgung der Membran mit Membranbausteinen aus dem Metabolismus, Protozellwachstum infolge des Membranwachstums und der daraus resultierenden Volumenzunahme sowie Protozellteilung. Zum einen eignet sich dieses Modell, um qualitative Eigenschaften von selbst-reproduzierenden *Systemen* zu untersuchen und zum anderen gibt es Hinweise, wie die *funktionalen Module* gestaltet werden müssen, um das gewünschte Verhalten bezüglich der Synchronisation der einzelnen *funktionalen Module* mit der Protozellteilung zu erreichen. Eine quantitative Beschreibung experimenteller Vorgänge ist mit diesem Modell jedoch schwierig. Um der experimentellen Realität näher zu kommen, werden im nächsten Kapitel reale und experimentell validierte *funktionale Module* ausgewählt und nach dem Baukastenansatz in-silico zusammengesaltet.

5 Baukastenansatz

- Modular aufgebaute in-silico Protozelle aus bestehenden funktionalen Modulen

Basierend auf den Erkenntnissen aus dem Modell für eine selbst-reproduzierende Protozelle nach dem Modularisierungsansatz (Kapitel 4) wird ein Protozellmodell nach dem Baukastenansatz entwickelt. Das Protozellwachstum infolge des Membranwachstums und die damit verbundene Volumenzunahme, die Interaktion des Membranmoduls mit dem Metabolismus sowie die Protozellteilung sind Eigenschaften, die ausgehend vom Protozellmodell nach dem Modularisierungsansatz im Baukastenansatz der experimentellen Realität angenähert werden.

Inspiziert durch bestehende und zum Teil experimentell validierte Modelle von *funktionalen Modulen* - **Metabolismus** [43], **Positionierer** [15, 27] und **kontraktile Einheit** [83] - werden diese zu einer in-silico Protozelle verknüpft [71, 70], die folgende Eigenschaften besitzt: Ein wachsender Container bildet die Systemgrenzen und ein Divisom sorgt für die Teilung der Protozelle. Das Divisom besteht in der hier beschriebenen Protozelle aus einem Positionierer, der die richtige Position der Membraneinschnürung definiert und einer kontraktile Einheit, die die Membran schließlich einschnürt. Das Gesamtsystem soll die Eigenschaften einer wachsenden Protozelle erfüllen, die sich teilt, sobald die Länge der Protozelle sich mindestens verdoppelt hat, um den Effekt immer kleiner werdenden Tochterzellen zu vermeiden.

Bei der Modellbildung wird zunächst von sehr einfachen Annahmen ausgegangen, indem ein sehr vereinfachtes, mechanistisches Modell für das Divisom betrachtet wird. Anschließend wird dieses Modell schrittweise erweitert und die Annahmen werden verfeinert. So wird das mechanistische Modell durch experimentell validierte Modelle aus der Literatur ersetzt, die Subsysteme mit der gleichen Funktionalität in realen Systemen beschreiben.

5.1 Container

Das Hauptmerkmal des Container-Moduls besteht darin ein geschlossenes System mit Systemgrenzen zu bilden, um den Innenraum einer Protozelle von ihrer Umgebung zu trennen. Diese Trennung ist auch in lebenden Organismen ein sehr wichtiger Aspekt. Die Kompartimentierung in lebenden Zellen verhindert Diffusion und Verdünnung von Zellkomponenten und erlaubt selektive Reaktionen in einem abgegrenzten Raum. Dies ist für eine lebende Zelle nicht nur energetisch günstiger, sondern liefert auch ein Zeitersparnis, da viele Prozesse parallel ablaufen können. Daher erfolgt die Annahme, dass diese Eigenschaften eines Containers für das Design von synthetischen Systemen ebenso wie in lebenden Organismen eine große Rolle spielen müssen.

Unterschiedliche Varianten des Containermoduls werden bereits für synthetische Systeme experimentell entwickelt und je nach den Anforderungen, die an die Systemgrenzen gestellt werden, verfeinert. Die einfachste Variante sind die Wasser-in-Öl Tröpfchen. Die membranbasierten Mikro-Kompartimente, wie Lipidvesikel und Polymersome, sind Wasser-Kompartimente gelöst in Wasser und haben daher geeignetere Eigenschaften für einen Protozellcontainer als Wasser-in-Öl Tröpfchen [41]. Für die Beschreibung einer Protozelle wurde das Modell eines wachsenden Containers beschrieben durch Mavelli et al. [43] verwendet. Dieses Modell beruht auf der Theorie eines wachsenden Lipidvesikels und liefert eine gute Basis für die Beschreibung der Protozellgrenzen. Die Oberfläche dieses Systems wächst durch den Einbau

von den in der Zelle produzierten Lipid-Membranbausteinen L , welche aus dem von außen aufgenommenen Precursor P in einer enzymatischen Reaktion gebildet werden. Durch den Einbau der gebildeten Lipid-Membranbausteine in die Membran wächst diese. Der wachsende Container wird in dieser Arbeit, inspiriert durch reale biologische Systeme, Membranmodul genannt. Das originale Modell von Mavelli et al. [43] beschreibt ein gut durchmischtes kugelförmiges Vesikel. Dieses wird in dem hier entwickelten Modell der modularen in-silico Protozelle zu einem örtlich verteilten, eindimensionalen System erweitert. Dabei wird ein zylinderförmiger Container angenommen, der sich nur in axialer, jedoch nicht in radialer, Richtung ausbreiten kann. Die zylindrische Geometrie des Containers wird nach dem Vorbild des realen Mikroorganismus *E. coli*, das ein stäbchenförmiges Bakterium ist, gewählt. Die Wahl auf dieses Vorbildbakterium fiel geleitet durch die Tatsache, dass bereits viele Informationen über diesen Modellorganismus bezüglich seiner Zellteilungsmechanismen vorhanden sind.

Das Membran-Modul wird durch folgende Reaktionsgleichungen beschrieben:



Wie in der Abb. 5.1 dargestellt ist, wird der Precursor P aus dem extrazellulären Raum in das Innere der Protozelle mit der Permeabilitätskonstante k_{perm} aufgenommen, was durch die Permeabilitätsrate r_{perm} beschrieben wird [43]:

$$r_{perm} = k_{perm}(P_{\text{ext}} - P) \quad (5.4)$$

Die Lipid-Membranbausteine L werden aus dem Precursor P mit Hilfe des Enzyms E mit der Lipidbildungskonstanten k_{lip} gebildet (Gl. (5.5)) und anschließend mit der Einbaukonstanten k_{in} in die Membran eingebaut (Gl. (5.6)) [43]:

$$r_{lip} = k_{lip}EP \quad (5.5)$$

$$r_{in} = k_{in}(L - L_{eq}) \quad (5.6)$$

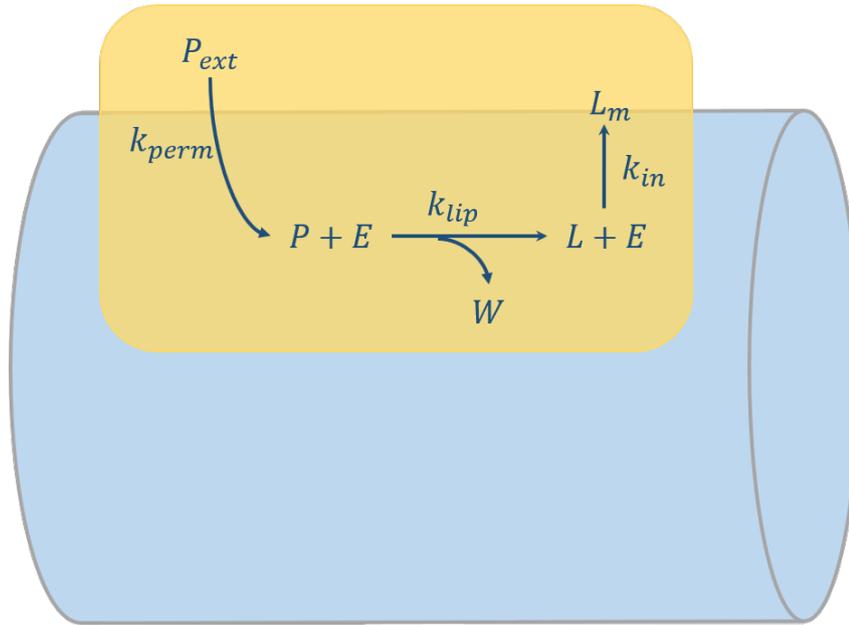


Abbildung 5.1: Membran-Modul nach dem Prinzip von Mavelli et al. [43]: Der Precursor P wird mit einer Permeabilitätskonstanten k_{perm} in die Zelle aufgenommen. Mit Hilfe des Enzyms E wird der Precursor P in einen Lipid-Membranbaustein L mit der Lipidbildungskonstanten k_{lip} unter der Abspaltung eines Nebenproduktes W umgewandelt. Der Einbau des Lipid-Membranbausteins L in die Membran erfolgt mit der Lipideinbaukonstanten k_{in} , was zum Membranwachstum in axialer Richtung führt.

Durch die Annahme eines Gleichgewichtszustandes L_{eq} zwischen dem Ein- und Abbau der Membranbausteine ist der Einbau proportional zur Differenz vom Gleichgewichtszustand.

Das Membranwachstum wird durch folgende Bilanzgleichungen beschrieben, wobei \dot{x} für die Änderung der Zylinderlänge, R für den Radius der zylindrischen Protozelle, j_η für die einzelnen Massenströme abhängig vom jeweiligen Diffusionskoeffizienten D_{mem} stehen:

$$\frac{\partial(R^2P)}{\partial t} + \frac{\partial(R^2P\dot{x})}{\partial x} = -\frac{\partial(R^2j_P)}{\partial x} - R^2r_{lip} + 2Rr_{perm} \quad (5.7)$$

$$\frac{\partial(R^2L)}{\partial t} + \frac{\partial(R^2L\dot{x})}{\partial x} = -\frac{\partial(R^2j_L)}{\partial x} + R^2(r_{lip} - r_{in}) \quad (5.8)$$

$$\frac{\partial(R^2E)}{\partial t} + \frac{\partial(R^2E\dot{x})}{\partial x} = -\frac{\partial(R^2j_E)}{\partial x} \quad (5.9)$$

$$j_\eta = -D_{mem} \frac{\partial \eta}{\partial x} \quad (5.10)$$

Im Originalmodell von Mavelli et al. [43] wurde angenommen, dass die Membranoberfläche mit jedem eingebauten Membranbaustein um die spezifische Oberfläche des Lipids α_L zunimmt. Daher wird die Änderung der Membranoberfläche in Abhängigkeit von der Lipideinbaurrate r_{in} beschrieben:

$$2 \frac{\partial R}{\partial t} + 2 \frac{\partial(R\dot{x})}{\partial x} = \frac{\alpha_L}{2} R^2 r_{in} \quad (5.11)$$

Hierbei wird angenommen, dass der Einbau der Membranbausteine L ausschließlich in der Mantelfläche der zylindrischen Protozelle erfolgt. Die Grundfläche des Zylinders wird dabei vernachlässigt, d. h. auch der Stoffaustausch erfolgt ausschließlich über die Mantelfläche der zylindrischen Protozelle.

Um das Gesamtsystem örtlich zu diskretisieren, wird die Finite-Volumen-Methode mit stückweise konstanter Profilannahme genutzt. Die Implementierung und Lösung der resultierenden Differentialgleichungen erfolgt in ProMoT/Diana [31] unter der Verwendung des *ida*-Lösers für dynamische Integration der SunDials-Bibliothek [28].

5.2 Divisom

Ein weiteres wichtiges Protozellmodul stellt das Divisom dar. Das Divisom beschreibt den Prozess der Membraneinschnürung im Protozellteilungsprozess in einem bestimmten Bereich der Membran.

Die Zellteilung in lebenden Zellen durchläuft mehrere Stadien, so auch das Stadium der Membraneinschnürung und die Teilung in zwei Tochterzellen. Für das Modell einer in-silico Protozelle wird sich hier der realen Prozesse der Cytokinese bedient. Zum Beispiel erfolgt die Membraneinschnürung in *E. coli* durch das FtsZ-Protein, das sich in der Zellmitte an die Membran anlagert. Dieser Bereich wird durch selbstorganisierende Min-Proteinwellen definiert [7, 33]. Daraus folgend wird das Divisom bei der Entwicklung eines Protozellmodells in zwei Submodule unter-

teilt: in das Positionierungs- und das Einschnürungsmodul.

Das Positionierungsmodul definiert die Stelle auf der Membran, an der die Einschnürung stattfinden soll. Mathematisch erfolgt dies zunächst auf eine makroskopische Weise durch die Annahme eines örtlich verteilten Bindungsparameters von bestimmten kontraktilen Proteinen, die schließlich die Einschnürung hervorrufen können. Anschließend wird das Modell durch einen komplexeren Positionierungsmechanismus aus realen biologischen Systemen - das Min-Protein-System - erweitert. Dabei wandern die Min-Proteine wellenförmig entlang der Membran. Die Wellenlänge der Min-Protein-Wanderung definiert Bereiche auf der Membran, in denen sich die kontraktilen Proteine anlagern und die Membran einschnüren können. Das Einschnürungsmodul sorgt dann für die eigentliche Membraneinschnürung durch die Anlagerung der kontraktilen Z -Proteine an die definierte Position und durch die schließliche Einstülpung der Membran durch die resultierende Z -Protein-Kontraktion.

5.2.1 Makroskopisch betrachteter Positionierer

Bei Betrachtung der realen Systeme lässt sich feststellen, dass bei Mikroorganismen, wie beispielsweise *E. coli*, die Zellteilung in der Mitte der Mutterzelle erfolgt. Diese Tatsache dient im ersten Schritt der Modellierung eines Teilungspositionierers als Vorbild.

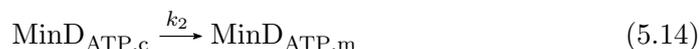
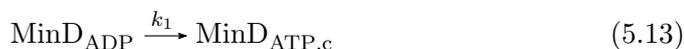
So wird im folgenden angenommen, dass die Einschnürung der Protozellmembran in der Mitte der Zelle stattfindet. Um dies im Modell zu beschreiben, wird die Anbindung des kontraktilen Proteins an die Protozellmembran mit Hilfe eines örtlich verteilten Anbindungsparameters $k_{att,d}$ realisiert. Dadurch bindet das kontraktile Protein an der vordefinierten Stelle der Membran, die sich durch die örtliche Verteilung des Anbindungsparameters in der Protozellmitte befindet, und verursacht schließlich die Membraneinschnürung. Die örtlich verteilte Anbindungskonstante $k_{att,d}$ wird durch die folgende Normalverteilung definiert:

$$k_{att,d} = k_{att} e^{-(x - x_{opt})^2 / \sigma^2}, \quad (5.12)$$

wobei k_{att} die Anbindungskonstante, x die Ortskoordinate, x_{opt} der erwartete Anbindungsbereich der Z-Proteine auf der Membran und σ die Standardabweichung der Normalverteilung sind.

5.2.2 Min-Protein-Positionierer

Das Positionierungsmodul in Form des Min-Protein-Systems wird mit einem bereits bestehenden Modell beschrieben [15, 27]. Das Min-Protein-System wird in synthetischen Systemen erfolgreich untersucht, wobei beispielsweise die Selbstorganisation der Min-Protein-Wellen auf oberflächenfixierten Lipiddoppelschichten (*supported lipid bilayer*) untersucht wird [32]. Die Abbildung 5.2 zeigt die Funktionsweise des Min-Protein-Systems, welches durch die folgenden Reaktionsgleichungen beschrieben werden kann:



Zunächst wird das cytosolische Protein MinD_{ADP} zu $\text{MinD}_{\text{ATP},c}$ mit der Nukleotidaustauschkonstanten k_1 phosphoryliert, was durch die Reaktionsrate r_1 beschrieben wird:

$$r_1 = k_1 \text{MinD}_{\text{ADP}} \quad (5.19)$$

Ausschließlich im phosphorylierten Zustand kann das MinD -Protein an die Membran binden mit der $\text{MinD}_{\text{ATP},c}$ -Bindungskonstanten k_2 . Dabei wird angenommen,

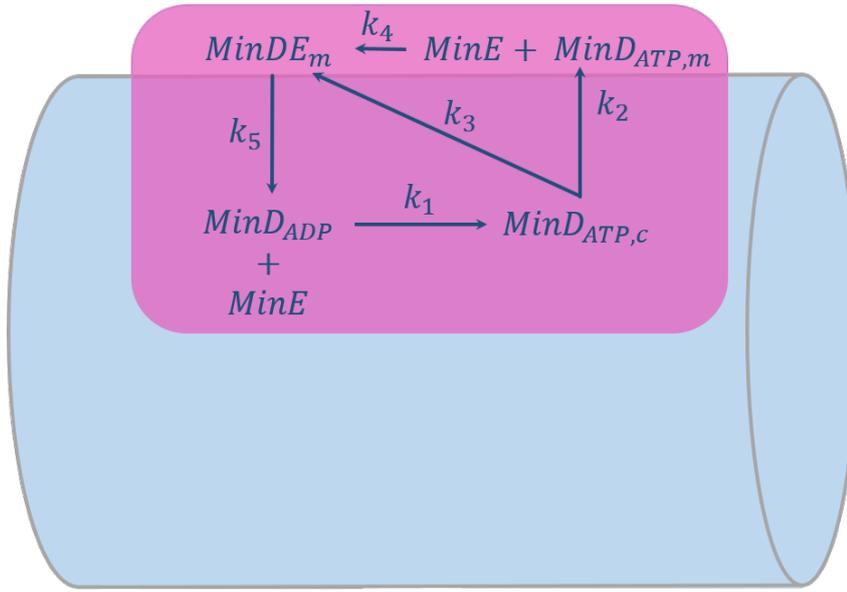


Abbildung 5.2: Min-Protein-System nach Huang et al. [27]: Das intrazelluläre Protein $MinD_{ADP}$ wird phosphoryliert zum $MinD_{ATP,c}$ mit der Reaktionskonstanten k_1 . Im phosphorylierten Zustand bindet das $MinD$ -Protein mit der Reaktionskonstanten k_2 an die Membran. Durch bereits membrangebundene $MinD_{ATP,m}$ - und $MinDE_m$ -Proteine wird die Anbindung der $MinD_{ATP,c}$ mit der Reaktionskonstanten k_3 verstärkt. Das membrangebundene $MinD_{ATP,m}$ -Protein bindet das $MinE$ -Protein mit der Reaktionskonstanten k_4 . Dies führt zur Dephosphorylierung von $MinD_{ATP,m}$, dessen Ablösung von der Membran sowie seiner Freisetzung aus dem Komplex $MinDE_m$ mit der Reaktionskonstanten k_5 .

dass die Anbindung des cytosolischen Proteins $MinD_{ATP,c}$ bevorzugt an Membranbereichen andockt, die bereits durch Min-Proteine besetzt sind [65]. Die Rekrutierung des cytosolischen Proteins $MinD_{ATP,c}$ an die Membran durch bereits membrangebundene Proteine $MinD_{ATP,m}$ erfolgt mit der gleichen $MinD_{ATP,c}$ -Bereitstellungskonstanten k_3 wie die Rekrutierung durch den membrangebundenen Komplex $MinDE_m$. Die Reaktionsraten r_2 , r_{31} und r_{32} beschreiben diese unterschiedlichen Rekrutierungs- und Anbindungsschritte:

$$r_2 = k_2 MinD_{ATP,c} \quad (5.20)$$

$$r_{31} = k_3 MinD_{ATP,m} MinD_{ATP,c} \quad (5.21)$$

$$r_{32} = k_3 MinDE_m MinD_{ATP,c} \quad (5.22)$$

Sobald $MinD_{ATP,m}$ an die Membran gebunden hat, bindet es das Protein $MinE$ mit der $MinE$ -Bindungskonstanten k_4 :

$$r_4 = k_4 MinE MinD_{ATP,m} \quad (5.23)$$

Das Protein $MinE$ ist für die Dephosphorylierung von $MinD_{ATP,m}$ und somit für dessen Ablösung von der Membran verantwortlich. Gleichzeitig löst sich $MinE$ aus dem Komplex $MinDE_m$ mit der Dephosphorylierungskonstanten k_5 . Diese Vorgänge der Dephosphorylierung sowie der Ablösung von der Membran werden durch die Reaktionsrate r_5 beschrieben:

$$r_5 = k_5 MinDE_m \quad (5.24)$$

Wie aus den Reaktionsgleichungen (5.13-5.18) ersichtlich, werden nur die Min-Proteine $MinD$ und $MinE$ betrachtet. Laut Huang et al. [27] ist dies ausreichend, um die Musterbildung zu beschreiben, da ein weiteres in dem Min-System aktives Protein $MinC$ an das $MinD$ gekoppelt wandert und somit die gleiche Wellenlänge besitzt wie $MinD$.

Die Bildung der Min-Protein-Muster wird durch die folgenden Bilanzgleichungen beschrieben, wobei nur die cytosolischen Komponenten frei im Protozellinneren diffundieren. Die Massenströme werden durch $j_{D_{ADP}}$, $j_{D_{ATP,c}}$ und j_E definiert und mit Hilfe des Diffusionskoeffizienten D_{Min} beschrieben:

$$\begin{aligned} \frac{\partial(R^2 MinD_{ADP})}{\partial t} + \frac{\partial(R^2 MinD_{ADP}\dot{x})}{\partial x} &= -\frac{\partial(R^2 j_{MinD_{ADP}})}{\partial x} - \frac{\partial(R^2 \dot{x})}{\partial x} r_1 \\ &+ 2 \frac{\partial(R\dot{x})}{\partial x} r_5 \end{aligned} \quad (5.25)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial(R^2 MinD_{ATP,c})}{\partial t} + \frac{\partial(R^2 MinD_{ATP,c}\dot{x})}{\partial x} &= -\frac{\partial(R^2 j_{MinD_{ATP,c}})}{\partial x} + \frac{\partial(R^2 \dot{x})}{\partial x} r_1 \\ &+ 2 \frac{\partial(R\dot{x})}{\partial x} (-r_2 - r_{31} - r_{32}) \end{aligned} \quad (5.26)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial(R^2 MinE)}{\partial t} + \frac{\partial(R^2 MinE\dot{x})}{\partial x} &= -\frac{\partial(R^2 j_{MinE})}{\partial x} \\ &+ 2 \frac{\partial(R\dot{x})}{\partial x} (-r_4 + r_5) \end{aligned} \quad (5.27)$$

$$\frac{\partial(RMinD_{ATP,m})}{\partial t} + \frac{\partial(RMinD_{ATP,m}\dot{x})}{\partial x} = \frac{\partial(R\dot{x})}{\partial x}(r_2 + r_{31} + r_{32} - r_4) \quad (5.28)$$

$$\frac{\partial(RMinDE_m)}{\partial t} + \frac{\partial(RMinDE_m\dot{x})}{\partial x} = \frac{\partial(R\dot{x})}{\partial x}(r_4 - r_5) \quad (5.29)$$

Hierbei wird zwischen volumenbezogenen Reaktionen unterschieden, wie r_1 , die ausschließlich cytosolische Komponenten beinhalten, und Reaktionen, die ausschließlich an der Membran stattfinden, wie r_2 , r_{31} , r_{32} , r_4 und r_5 , und deshalb oberflächenabhängig sind.

5.2.3 Makroskopische kontraktile Einheit mit einem makroskopischen Positionierer

Im ersten Schritt wird der Einschnürungsprozess auf die makroskopische Weise beschrieben um die Modellkomplexität so gering wie möglich zu halten. Das makroskopische Divisom besteht aus einem cytosolischen kontraktilen Protein Z_c und dem membrangebundenen kontraktilen Protein Z_m , welches mit Hilfe eines örtlich verteilten Anbindungsparameters $k_{att,d}$ an die vordefinierte Stelle an der Membran bindet (s. Kapitel 5.2.1). Das cytosolische kontraktile Protein Z_c wird aus dem Nebenprodukt W des Container-Moduls mit der Z -Bildungskonstanten k_{wz} gebildet. Dies stellt gleichzeitig eine Verknüpfung zwischen dem Container-Modul und dem Divisom-Modul dar. Das cytosolische kontraktile Protein Z_c bindet mit dem verteilten Parameter $k_{att,d}$ an die Membran und wird somit zum membrangebundenen kontraktilen Protein Z_m (Abb. 5.3). An der Membran gebunden, verbinden sich die Proteine Z_m spontan miteinander zu einer Ringstruktur auf der intrazellulären Membranoberfläche, was hier nicht im Detail betrachtet wird. Dieser Ring zieht sich spontan zusammen durch Hydrolyse zwischen den einzelnen verbundenen Proteinen Z_m . Die wichtigste Eigenschaft der kontraktilen Einheit besteht darin die Membran einzuschnüren. Daher wird angenommen, dass durch die Hydrolyse ein Z_m -Protein abgespalten wird, wodurch sich der Ringumfang verringert und sich somit die Membran zusammenzieht. Als Inspiration für diesen Mechanismus dient hier die GTP-Hydrolyse-Fähigkeit des FtsZ-Rings während der bakteriellen Cytokinese[13].

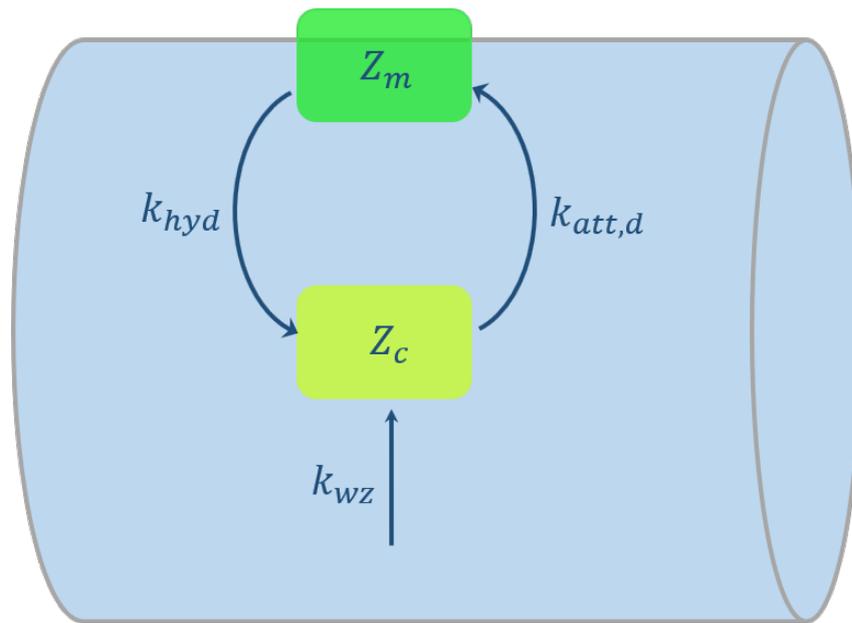


Abbildung 5.3: Makroskopische kontraktile Einheit mit einem makroskopischen Positionierer: Die makroskopische kontraktile Einheit besteht aus dem cytosolischen kontraktilen Protein Z_c und dem membrangebundenen kontraktilen Protein Z_m . Das cytosolische kontraktile Protein Z_c wird intrazellulär als Nebenprodukt des Containermoduls mit der Bildungskonstanten k_{wz} gebildet und bindet mit der örtlich verteilten Bindungskonstanten $k_{att,d}$ an die Membran. In einer Hydrolysereaktion löst sich das membrangebundene kontraktile Protein Z_m mit der Hydrolysekonstanten k_{hyd} von der Membran ab.

Makroskopisch betrachtet wird hier nur der Hydrolysierungsschritt beschrieben, der mit der Ablösung gleichgesetzt wird.

Der Gesamtprozess der kontraktilen Einheit wird durch folgende drei Reaktionsgleichungen beschrieben:



Daraus resultieren die jeweiligen Reaktionsraten für die Bildung des kontraktilen Proteins r_{wz} , für dessen Anbindung an die Membran $r_{att,d}$ sowie dessen Hydrolyse r_{hyd} :

5 Baukastenansatz

$$r_{wz} = k_{wz}W \quad (5.33)$$

$$r_{att,d} = k_{att,d}Z_c \quad (5.34)$$

$$r_{hyd} = k_{hyd}Z_m \quad (5.35)$$

Die örtlich verteilte Anbindung an die Membran, charakterisiert durch den verteilten Parameter $k_{att,d}$, garantiert, dass das kontraktile Protein ausschließlich in der Mitte der Protozelle an die Membran bindet. Die zwei Komponenten der kontraktilen Einheit werden unter der Berücksichtigung der volumenbezogenen Reaktionsrate r_{wz} und der oberflächenbezogenen Reaktionsraten $r_{att,d}$ und r_{hyd} durch folgende partielle Differentialgleichungen beschrieben:

$$\begin{aligned} \frac{\partial(R^2 Z_c)}{\partial t} + \frac{\partial(R^2 Z_c \dot{x})}{\partial x} &= -\frac{\partial(R^2 j_{Z_c})}{\partial x} + \frac{\partial(R^2 \dot{x})}{\partial x} r_{wz} \\ &\quad + 2 \frac{\partial(R \dot{x})}{\partial x} (r_{hyd} - r_{att,d}) \end{aligned} \quad (5.36)$$

$$\frac{\partial(R Z_m)}{\partial t} + \frac{\partial(R Z_m \dot{x})}{\partial x} = \frac{\partial(R \dot{x})}{\partial x} (r_{att,d} - r_{hyd}) \quad (5.37)$$

Da der membranassoziierte Ring sich durch die Hydrolyse verkürzt und somit die Protozellmembran zusammenzieht, muss sich dies auch auf den Protozellradius auswirken. Somit wird angenommen, dass die Änderung des Radius proportional zur Hydrolyserate r_{hyd} ist:

$$\frac{dR}{dt} = -k_{prop} r_{hyd}, \quad (5.38)$$

wobei k_{prop} der Proportionalitätskoeffizient ist. Durch die Membraneinschnürung werden die Membranbausteine L_m in Richtung der Protozellole gedrückt, was unter anderem zum Containerwachstum in axialer Richtung beiträgt.

5.2.4 Makroskopische kontraktile Einheit mit dem Min-Protein-Positionierer

Im weiteren Schritt wird das Modell erweitert bezüglich der Positionierung der kontraktile Einheit. Diese erfolgt mit Hilfe des Min-Protein-Systems. Die Ausbreitung der Min-Protein-Wellen von Zellpol zu Zellpol verursacht die Ausbildung von Membranbereichen mit hohen und niedrigen Min-Proteinkonzentrationen. Die Membranbereiche mit niedrigen Min-Proteinkonzentrationen werden durch die kontraktile Einheit des Divisoms besetzt. Dies stellt den Initialisierungsschritt der Membraneinschnürung dar. Die Funktionsweise der kontraktile Einheit wird mit folgenden Reaktionsgleichungen beschrieben:



Nach der Bildung des cytosolischen kontraktile Proteins Z_c aus dem Containernebenprodukt W (Abb. 5.4), was durch die Bildungsrate r_{wz} (Gl. 5.33) beschrieben wird, erfolgt seine Anbindung an die Membran in Abhängigkeit von freien Membranbindungsstellen, was durch die Anbindungsrate r_{att} ausgedrückt wird:

$$r_{att} = k_{att} Z_c (M_{max} - Min_{D_{ATP,m}} - Min_{DE_m}), \quad (5.43)$$

mit der Z_c -Anbindungskonstanten k_{att} und der maximalen Anzahl von Membranbindungsstellen M_{max} . Es wird angenommen, dass das kontraktile Protein Z_c an die freien Bindungsstellen der Membran bindet, die nicht von den Min-Proteinen besetzt sind.

Eine weitere Annahme, die aus den Beobachtungen in realen Systemen stammt und hier ebenfalls eingesetzt wird, ist die Verdrängung der bereits angebotenen kontraktile Proteine Z_m durch die membrangebundenen Min-Proteine [42]. Dieser

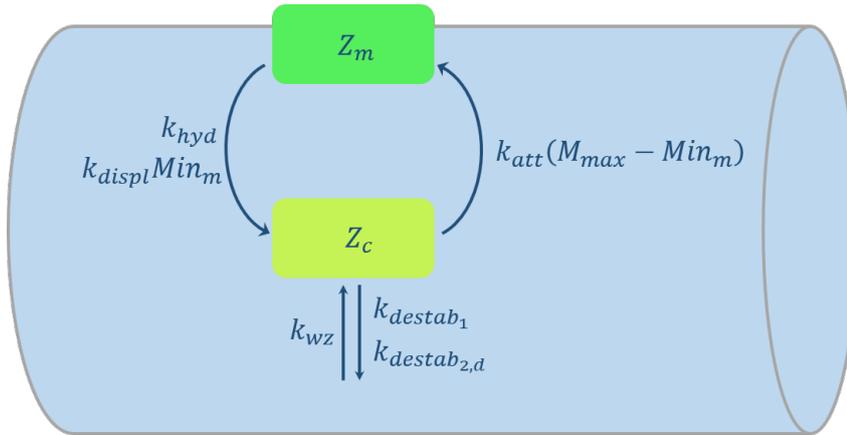


Abbildung 5.4: Makroskopische kontraktile Einheit mit dem Min-Positionierer: Die makroskopische kontraktile Einheit, bestehend aus dem cytosolischen kontraktilem Protein Z_c und dem membranengebundenen kontraktilem Protein Z_m , wird in dieser Modellvariante durch die Min-Proteine positioniert. Die Bildung des cytosolischen kontraktilem Proteins Z_c erfolgt intrazellulär als Nebenprodukt des Containermoduls mit der Bildungskonstanten k_{wz} . Das cytosolische kontraktile Protein Z_c bindet an die Membran mit der Bindungskonstanten k_{att} in Abhängigkeit von freien Membranbindungsstellen, die aus der Differenz aus der maximalen Anzahl der Membranbindungsstellen M_{max} und den membranengebundenen Min-Proteinen Min_m resultiert. Die Ablösung der membranengebundenen kontraktilem Proteine Z_m erfolgt zum einen in einer Hydrolysereaktion mit der Hydrolysekonstanten k_{hyd} und zum anderen durch deren Verdrängung durch die membranengebundenen Min-Proteine Min_m mit der Verdrängungskonstanten k_{displ} . Die cytosolischen kontraktilem Proteine Z_c werden durch die membranengebundenen Min-Proteine mit der Destabilisierungskonstanten k_{destab_1} und durch die Nukleoid-Okklusion mit der örtlich verteilten Destabilisierungskonstanten $k_{destab_{2,d}}$ gehämmt.

Vorgang wird durch die Verdrängungsrate r_{displ} beschrieben, wobei k_{displ} die Verdrängungskonstante ist:

$$r_{displ} = k_{displ} Z_m (Min_{D_{ATP,m}} + Min_{DE_m}) \quad (5.44)$$

Die Annahme der Verdrängung der kontraktilem Proteine Z_m von der Membran durch die membranengebundenen Min-Proteine verhindert die Akkumulation der membranengebundenen kontraktilem Proteine Z_m an den Zellpolen und somit die dort lokalisierte Einschnürung der Membran. Die Differentialgleichungen der kontraktilem

Einheit setzen sich mit den neuen Annahmen durch die Min-Protein-Positionierung wie folgt zusammen:

$$\frac{\partial(R^2 Z_c)}{\partial t} + \frac{\partial(R^2 Z_c \dot{x})}{\partial x} = -\frac{\partial(R^2 j_{Z_c})}{\partial x} + \frac{\partial(R^2 \dot{x})}{\partial x} r_{wz} + 2 \frac{\partial(R \dot{x})}{\partial x} (-r_{att} + r_{hyd} + r_{displ}) \quad (5.45)$$

$$\frac{\partial(R Z_m)}{\partial t} + \frac{\partial(R Z_m \dot{x})}{\partial x} = \frac{\partial(R \dot{x})}{\partial x} (r_{att} - r_{hyd} - r_{displ}) \quad (5.46)$$

Im nächsten Schritt und unter der Annahme, dass die cytosolischen Z-Proteine Z_c in bestimmten Bereichen der Zelle gehemmt werden durch die Min-Proteine, aber auch durch Nukleoid-Okklusion [96, 33], wodurch die Z-Proteine aus der Nähe des Chromosoms verdrängt werden, kann das Modell der makroskopischen kontraktile Einheit mit dem Min-Protein-Positionierer zusätzlich mit zwei Destabilisierungsgleichungen ergänzt werden:

$$Z_c \xrightarrow{k_{destab_1} (MinD_{ATP,m} + MinDE_m)} \quad (5.47)$$

$$Z_c \xrightarrow{k_{destab_2,d}} \quad (5.48)$$

Hierbei werden zwei unterschiedliche Destabilisierungsmechanismen angenommen: Zum einen erfolgt die Destabilisierung und somit die Hemmung der cytosolischen Z-Proteine Z_c durch die membrangebundenen Min-Proteine $MinD_{ATP,m}$ und $MinDE_m$ an den Zellpolen, was durch die Gleichung (5.47) beschrieben wird. Und zum anderen wird das cytosolische Z-Protein Z_c durch das Nukleoid gehemmt, das sich im Cytosol zunächst in der Zellmitte befindet, sich während der Cytokinese teilt, sich gleichmäßig auf die zwei Zellhälften verteilt und somit einen Bereich in der Zellmitte freierwerden lässt, in dem die Z-Proteine im Teilungsprozess aktiv werden können (Gl. (5.48)). Durch die Hemmung der kontraktile Einheit, die sich ausschließlich auf die cytosolischen Z-Proteine Z_c bezieht, ändert sich im Fall der Destabilisierung lediglich die Differentialgleichung für das cytosolische Z-Protein:

$$\frac{\partial(R^2 Z_c)}{\partial t} + \frac{\partial(R^2 Z_c \dot{x})}{\partial x} = -\frac{\partial(R^2 j_{Z_c})}{\partial x} + \frac{\partial(R^2 \dot{x})}{\partial x} (r_{wz} - r_{destab_2,d}) + 2 \frac{\partial(R \dot{x})}{\partial x} (-r_{att} + r_{hyd} + r_{displ} - r_{destab_1}), \quad (5.49)$$

5 Baukastenansatz

mit den Destabilisierungsraten r_{destab_1} für die Destabilisierung durch Min-Proteine und $r_{destab_{2,d}}$ für die Destabilisierung durch die Nukleoid-Okklusion:

$$r_{destab_1} = k_{destab_1} Z_c (MinD_{ATP,m} + MinDE_m) \quad (5.50)$$

$$r_{destab_{2,d}} = k_{destab_{2,d}} Z_c \quad (5.51)$$

Der Mechanismus der Nukleoid-Okklusion wird hier nicht im Detail betrachtet, sondern makroskopisch durch die Annahme einer örtlich verteilten Destabilisierung beschrieben mit der örtlich verteilten Destabilisierungskonstanten $k_{destab_{2,d}}$. Gemäß der Annahme, dass das sich geteilte Nukleoid bei der Zellteilung in der Zellmitte einen schmalen Bereich für die Z-Protein-Aktivität freilässt, kann die Destabilisierungskonstante $k_{destab_{2,d}}$ wie folgt definiert werden:

$$k_{destab_{2,d}} = \frac{k_{destab_2}}{2} - k_{destab_2} e^{-(x - x_{opt})^2/\sigma^2} \quad (5.52)$$

Dabei sind k_{destab_2} die Destabilisierungskonstante durch das Nukleoid, x die Ortskoordinate, x_{opt} der erwartete Aktivitätsbereich der Z-Proteine und σ die Standardabweichung der Normalverteilung.

5.2.5 FtsZ-basierte kontraktile Einheit mit dem Min-Protein-Positionierer

Eine weitere Ergänzung des Modells wird bezüglich der kontraktilen Einheit betrachtet, wobei die Positionierung mit Hilfe des Min-Protein-Systems erfolgt. Wie in der Abbildung 5.5 gezeigt wird, erfolgt in dieser Modellvariante zusätzlich ein Polymerisationsprozess des membrangebundenen kontraktilen Proteins, was an den FtsZ-Ring in realen biologischen Systemen angelehnt ist. Die Implementierung dieses Moduls basiert auf der mathematischen Beschreibung des FtsZ-Ringes von Surovtsev et al. [83]. Da jede individuelle Polymerlänge mit einer Bilanzgleichung beschrieben wird steigt bei dieser Betrachtungsweise die Modellkomplexität stark an.

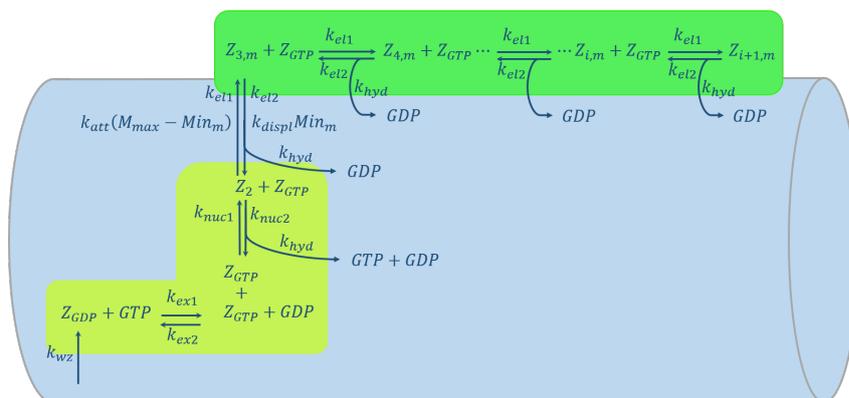


Abbildung 5.5: Kontraktile Einheit basierend auf dem FtsZ-Ring nach Surovtsev et al. [83].

Das mit der Reaktionskonstanten k_{wz} gebildete GDP-gebundene Protein Z_{GDP} reagiert mit dem freien GTP mit der Nukleotidaustauschkonstanten k_{ex1} zum GTP-gebundenen Z-Protein Z_{GTP} . Die Rückreaktion erfolgt mit einer geringeren Nukleotidaustauschkonstanten k_{ex2} . Zwei Z_{GTP} -Proteine lagern sich zu einem Dimer Z_2 zusammen mit der Nukleationskonstanten k_{nuc1} und können mit der reversiblen Nukleationskonstanten k_{nuc2} wieder zerfallen. Das Dimer Z_2 wächst durch die Bindung eines weiteren Z_{GTP} -Proteins mit der Elongationskonstanten k_{el1} zum kürzesten Polymer $Z_{3,c}$, welches sich zunächst im Cytosol befindet. Der Zerfall des Polymers erfolgt mit der kleineren reversiblen Elongationskonstanten k_{el2} . Das cytosolische Polymer $Z_{3,c}$ bindet an die freien Membranbindungsstellen, die durch $(M_{max} - Min_m)$ beschrieben sind mit der Anbindungskonstanten k_{att} . Dabei bezeichnet M_{max} die maximale Anzahl der Membranbindungsstellen und Min_m die Summe der membrangebundenen Min-Proteine $MinD_{ATP,m} + MinDE_m$. Das membrangebundene Polymer $Z_{3,m}$ wächst mit der Vorwärts-Elongationskonstanten k_{el1} und verkürzt sich mit der Rückwärts-Elongationskonstanten k_{el2} . Das kürzeste membrangebundenen Polymer $Z_{3,m}$ wird durch die membrangebundenen Min-Proteine Min_m mit der Verdrängungskonstante k_{displ} von der Membran abgelöst. Durch eine Hydrolyse-reaktion mit der Hydrolysekonstanten k_{hyd} verkürzen sich die cytosolischen und membrangebundene Polymere durch die Abspaltung von einem GDP-Molekül und das Z-Dimer spaltet sich in ein GDP- und ein GTP-Molekül.

Jedoch kann diese Erweiterung neue Wege zur Manipulation des Gesamtsystems ermöglichen.

Wie in den bereits beschriebenen Modulen der kontraktile Einheit erfolgt die Bildung des kontraktile Grundbausteins, der hier als GDP-bindendes Z-Protein Z_{GDP} definiert wird, aus dem Nebenprodukt des Containers W mit der Bildungskonstan-

5 Baukastenansatz

ten k_{wz} , was die folgende Reaktionsgleichung beschreibt:



Die daraus resultierende Bildungsrate wird durch die Gleichung (5.33) beschrieben. Das GDP-bindende Z-Protein Z_{GDP} wird durch die Bindung eines Nukleotids aus dem GTP in einer reversiblen Reaktion zum GTP-bindenden Z-Protein Z_{GTP} :



Die Hinreaktion mit der Nukleotidaustauschkonstanten k_{ex1} erfolgt dabei schneller als die Rückreaktion mit der Nukleotidaustauschkonstanten k_{ex2} .

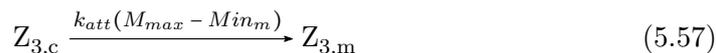
Im nächsten Schritt verbinden sich zwei GTP-bindende Z-Proteine Z_{GTP} reversibel zu einem Dimer Z_2 in der Hinreaktion mit der Nukleationskonstanten k_{nuc1} :



Die Rückreaktion der Nukleation findet mit der kleineren Nukleationskonstanten k_{nuc2} statt. Es wird angenommen, dass das Z-Protein nur im GTP-bindenden Zustand in der Lage zur Nukleation und Polymerisation ist. Das Dimer Z_2 verlängert sich reversibel durch die Bindung eines weiteren GTP-bindenden Z-Proteins Z_{GTP} zum kürzesten Polymer $Z_{3,c}$, das sich zunächst im Cytosol befindet. Die Terminologie Polymer wird genutzt für $i, j \geq 3$, wobei i und j die Polymerlängen definieren. Die maximale Polymerlänge wird mit i_{max} bezeichnet. Surovtsev et al. [83] nahmen an, dass Polymere bestehend aus drei oder mehr Monomeren membranassoziiert sind. In dem hier beschriebenen Modul wird angenommen, dass ein Polymer der Länge $i = 3$ auch cytosolisch sein kann. Auch der Schritt der Verlängerung zum kürzesten Polymer $Z_{3,c}$ ist vorwärts gerichtet mit der größeren Konstanten k_{el1} im Vergleich zur Rückreaktion mit der geringeren Geschwindigkeit, die durch die Konstante k_{el2} definiert wird:



Das kürzeste Polymer $Z_{3,c}$ bindet an eine freie Membranbindungsstelle mit der Anbindungskonstanten k_{att} . Dabei werden die freien Membranbindungsstellen durch den Ausdruck $(M_{max} - Min_m)$ beschrieben mit M_{max} als die Gesamtanzahl der Membranbindungsstellen und $Min_m = MinD_{ATP,m} + MinDE_m$ als die membrangebundenen Min-Proteine:



Das kürzeste membrangebundene Polymer $Z_{3,m}$ wird durch die membrangebundenen Min-Proteine Min_m mit der Verdrängungskonstanten k_{displ} von der Membran abgelöst:

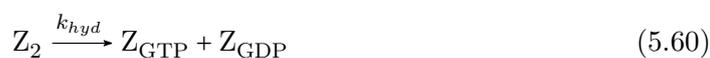


Dies stellt eine zusätzliche Annahme im Vergleich zum mathematischen Modell von Surovtsev et al. [83] dar, die auf Beobachtungen in realen biologischen Systemen beruht [42].

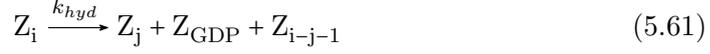
Das kürzeste, membrangebundene kontraktile Polymer $Z_{3,m}$ unterliegt ebenfalls einer reversiblen Polymerisationsreaktion unter Bindung GTP-bindender Z-Proteine Z_{GTP} . Dabei erfolgt die Bildung längerer Polymere Z_{i+1} mit der Reaktionskonstanten k_{el1} sowie deren Rückbildung mit der Reaktionskonstanten k_{el2} , wobei $k_{el1} > k_{el2}$ gilt:



Sowohl das Z-Dimer Z_2 als auch die Z-Polymere Z_i verkürzen sich durch eine Hydrolysereaktion mit der Hydrolysekonstanten k_{hyd} . Durch die Hydrolyse eines Dimers Z_2 entstehen ein GDP- und ein GTP-Molekül, wohingegen bei der Hydrolyse von Z-Polymeren Z_i für $i \geq 3$, unabhängig davon ob membrangebunden oder cytosolisch, ein GDP-Molekül in jedem Hydrolyseschritt entsteht:



5 Baukastenansatz



Aus den Reaktionsgleichungen resultieren folgende Reaktionsraten, die bei der Definition der partiellen Differentialgleichungen der FtsZ-basierten kontraktilen Einheit verwendet werden:

$$r_{ex1} = k_{ex1}GTPZ_{GDP} \quad (5.62)$$

$$r_{ex2} = k_{ex2}GDPZ_{GTP} \quad (5.63)$$

$$r_{nuc1} = k_{nuc1}Z_{GTP}^2 \quad (5.64)$$

$$r_{nuc2} = k_{nuc2}Z_2 \quad (5.65)$$

$$r_{el12} = k_{el1}Z_{GTP}Z_2 \quad (5.66)$$

$$r_{el22} = k_{el2}Z_{3,c} \quad (5.67)$$

$$r_{att} = k_{att}Z_{3,c}(M_{max} - MinD_{ATP,m} - MinDE_m) \quad (5.68)$$

$$r_{el1i} = k_{el1}Z_{GTP}Z_i \quad (5.69)$$

$$r_{el2i} = k_{el2}Z_j \quad (5.70)$$

$$r_{displ} = k_{displ}Z_{3,m}(MinD_{ATP,m} + MinDE_m) \quad (5.71)$$

$$r_{hyd2} = k_{hyd}Z_2 \quad (5.72)$$

$$r_{hyd3,c} = 2k_{hyd}Z_{3,c} \quad (5.73)$$

$$r_{hyd_i} = (i-1)k_{hyd}Z_i, \quad (5.74)$$

mit $3 \geq i \geq i_{max}$.

Auch bei der Beschreibung der FtsZ-basierten kontraktilen Einheit wird angenommen, dass die Radiusänderung proportional der Hydrolyserate der membrangebundenen kontraktilen Polymere r_{hyd_i} ist. Dies beruht auf der Annahme, dass sich die Polymere durch Hydrolyse verkürzen und somit die Membran mit sich ziehen, was letztendlich zur Einschnürung der Membran führt. Dabei werden die Hydrolyseraten aller möglichen Polymerlängen berücksichtigt:

$$\frac{dR}{dt} = -k_{prop} \sum_{i=3}^{i_{max}} r_{hyd_i} \quad (5.75)$$

Sowohl die GTP- als auch die GDP-Konzentration werden während des gesamten Prozesses als konstant angenommen.

Mit den getroffenen Annahmen lassen sich Bilanzgleichungen formulieren. Dabei wird ebenfalls zwischen volumenbezogenen Reaktionen, die ausschließlich im Cytosol stattfinden, und oberflächenbezogenen Reaktionen, die ausschließlich an der Membranoberfläche stattfinden, unterschieden.

Die volumenbezogenen Komponenten, die frei im Cytosol diffundieren können, werden mit dem Massenstrom der cytosolischen Komponenten j_η definiert:

$$\begin{aligned} \frac{\partial(R^2 Z_{GDP})}{\partial t} + \frac{\partial(R^2 Z_{GDP}\dot{x})}{\partial x} &= -\frac{\partial(R^2 j_{Z_{GDP}})}{\partial x} \\ &+ \frac{\partial(R^2 \dot{x})}{\partial x} (r_{wz} - r_{ex1} + r_{ex2} + r_{hyd2} + r_{hyd3,c}) \\ &+ 2 \frac{\partial(R\dot{x})}{\partial x} \left(\sum_{i=3}^{i_{max}} r_{hyd_i} \right) \end{aligned} \quad (5.76)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial(R^2 Z_{GTP})}{\partial t} + \frac{\partial(R^2 Z_{GTP}\dot{x})}{\partial x} &= -\frac{\partial(R^2 j_{Z_{GTP}})}{\partial x} \\ &+ \frac{\partial(R^2 \dot{x})}{\partial x} (r_{ex1} - r_{ex2} - r_{nuc1} + 2r_{nuc2} \\ &- r_{el1_2} + r_{el2_2} + r_{hyd2}) \\ &+ 2 \frac{\partial(R\dot{x})}{\partial x} \left(- \sum_{i=3}^{i_{max}-1} (r_{el1_i} + r_{el2_i}) \right) \end{aligned} \quad (5.77)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial(R^2 Z_2)}{\partial t} + \frac{\partial(R^2 Z_2\dot{x})}{\partial x} &= -\frac{\partial(R^2 j_{Z_2})}{\partial x} \\ &+ \frac{\partial(R^2 \dot{x})}{\partial x} (r_{nuc1} - r_{nuc2} - r_{hyd2} + \frac{1}{2} r_{hyd3,c} \\ &- r_{el1_2} + r_{el2_2}) \\ &+ 2 \frac{\partial(R\dot{x})}{\partial x} \left(\frac{1}{2} r_{hyd3} - \sum_{i=4}^{i_{max}} \left(\frac{2}{i-1} r_{hyd_i} \right) \right) \end{aligned} \quad (5.78)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial(R^2 Z_{3,c})}{\partial t} + \frac{\partial(R^2 Z_{3,c}\dot{x})}{\partial x} &= -\frac{\partial(R^2 j_{Z_{3,c}})}{\partial x} \\ &+ \frac{\partial(R^2 \dot{x})}{\partial x} (r_{el1_2} - r_{el2_2} - r_{hyd3,c}) \\ &+ 2 \frac{\partial(R\dot{x})}{\partial x} (-r_{att} + r_{displ}) \end{aligned} \quad (5.79)$$

Bei den membrangebundenen Komponenten Z_i (mit $i \geq 3$) sind die Reaktionsraten auf den rechten Seiten auf die Oberfläche des zylindrischen Containers bezogen:

$$\begin{aligned} \frac{\partial(RZ_3)}{\partial t} + \frac{\partial(RZ_3\dot{x})}{\partial x} &= \frac{\partial(R\dot{x})}{\partial x} (-r_{el1_3} + r_{el2_4} + r_{el1_2} - r_{hyd3} \\ &+ \frac{1}{3} r_{hyd4} + \sum_5^{i_{max}} \frac{2}{j-1} (r_{hyd_j})) \end{aligned}$$

$$\frac{\partial(RZ_i)}{\partial t} + \frac{\partial(RZ_i\dot{x})}{\partial x} = +r_{att} - r_{displ} \quad (5.80)$$

$$= \frac{\partial(R\dot{x})}{\partial x} (-r_{el1_i} + r_{el2_{i+1}} + r_{el1_{i-1}} - r_{el2_i} - r_{hyd_i} + \frac{1}{i}r_{hyd_{i+1}} + \sum_{j=i+2}^{i_{max}} (\frac{2}{j-1}r_{hyd_j})) \quad (5.81)$$

$$\frac{\partial(RZ_{i_{max}-1})}{\partial t} + \frac{\partial(RZ_{i_{max}-1}\dot{x})}{\partial x} = \frac{\partial(R\dot{x})}{\partial x} (-r_{el1_{i_{max}-1}} + r_{el2_{i_{max}}} + r_{el1_{i_{max}-2}} - r_{el2_{i_{max}-1}} - r_{hyd_{i_{max}-1}} + \frac{1}{i_{max}-1}r_{hyd_{i_{max}}}) \quad (5.82)$$

$$\frac{\partial(RZ_{i_{max}})}{\partial t} + \frac{\partial(RZ_{i_{max}}\dot{x})}{\partial x} = \frac{\partial(R\dot{x})}{\partial x} (r_{el1_{i_{max}-1}} - r_{el2_{i_{max}-1}} - r_{hyd_{i_{max}}} + \frac{1}{i_{max}-1}r_{hyd_{i_{max}}}) \quad (5.83)$$

Für die membrangebundenen Komponenten Z_i wird angenommen, dass keine Diffusion stattfindet.

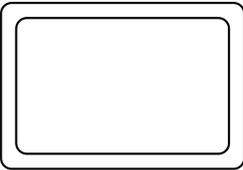
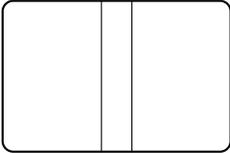
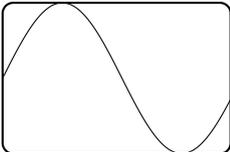
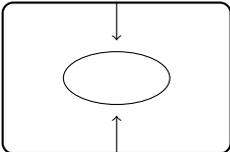
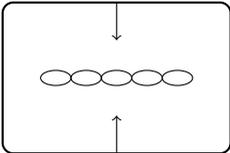
5.3 Konstruktion der modularen in-silico Protozelle und Simulationsergebnisse

Der modulare Charakter einer in-silico Protozelle ist stark geprägt von der Vorstellung eines Protozellbaukastens, aus dem nur die *funktionalen Module* entnommen werden, die für die Konstruktion einer Protozelle nötig sind. Dieser Wunsch gilt in der Synthetischen Biologie als das anspruchsvollste Ziel, dessen Realisierung noch Jahrzehnte dauern mag. Um dies in-silico zu verwirklichen, kann die Protozelle als eine Art Baukasten implementiert werden. Die in diesem Kapitel beschriebene in-silico Protozelle, die nach dem Baukastenprinzip entwickelt wurde, wird nach und nach aus unterschiedlichen, bereits mathematisch beschriebenen *funktionalen Modulen* aufgebaut. Die in der Tabelle 5.1 dargestellten *funktionalen Module* sind dabei von unterschiedlicher Struktur und Komplexität und können je nach Anforderung an das Gesamtmodell gewählt werden und fungieren dann als ein *funktionales Modul* in der in-silico Protozelle.

Der Modellierungsansatz, der hier verwendet wird, um eine in-silico Protozelle auf-

5.3 Konstruktion der modularen in-silico Protozelle und Simulationsergebnisse

Tabelle 5.1: Definierte *funktionale Module* einer in-silico Protozelle. Symbolische Darstellung und Nomenklatur.

Modulbezeichnung		Symbol	Beschreibung
Container			Membran, die die Systemgrenzen bildet
Divisom	Positionierer		makroskopisch
			Min-Proteine
	kontraktile		makroskopisch
		Einheit	

zubauen, orientiert sich stark an einem verfahrenstechnischen Ansatz - dem Konzept der Grundoperationen. Wie bereits beschrieben, werden zunächst die notwendigen Grundoperationen definiert, anschließend werden die geeigneten Funktionalitäten der Grundoperationen bestimmt und erst im letzten Schritt wird die gesamte Anlage zusammengebaut. Wird diese Vorgehensweise auf die Synthetische Biologie bezogen, so werden erst die für eine in-silico Protozelle benötigten *funktionalen Module* festgelegt, dann die gewünschten Eigenschaften definiert, die diese *funktionalen Module* besitzen sollen, und schließlich werden reelle, existierende, molekulare Systeme mit solchen gewünschten Eigenschaften genutzt, um eine strukturierte zellähnliche Ein-

heit aufzubauen.

Nachdem die unterschiedlichen *funktionalen Module* und ihre Funktionen in diesem Kapitel erläutert wurden, erfolgt im Weiteren die Konstruktion der in-silico Protozelle. Dabei werden unterschiedliche Varianten betrachtet, wobei verschiedene Systeme für ein und dasselbe Modul untersucht werden und diskutiert wird, welche Variante für welche Zwecke vorteilhaft ist.

5.3.1 Modell A: Örtlich verteilt parametrisiert positionierte, makroskopische kontraktile Einheit

Modell A beschreibt eine makroskopisch betrachtete in-silico Protozelle. Wie in der Abbildung 5.6 verdeutlicht wird, verwendet das Modell folgende *funktionale Module*: den Container, der das Membranmodell von Mavelli et al. [43] zur Grundlage hat; den makroskopischen Positionierer, der durch den örtlich verteilten Parameter die Membranposition für die Anbindung des kontraktilen Rings festlegt; und die makroskopische kontraktile Einheit, die aus einem Protein besteht, das in den Zuständen cytosolisch oder membrangebunden vorkommen kann. Durch diese vereinfachte Betrachtungsweise des Divisoms dient das Modell A als ein makroskopisches Modell, das erwartungserfüllend parametrisiert wird. Der für die Implementierung des Modells A verwendete Parametersatz und die Anfangsbedingungen sind in Tabelle 5.2 aufgelistet.

Obwohl das Modell A bezüglich der einzelnen *funktionalen Module* sehr vereinfacht dargestellt wird, hat es eine Gemeinsamkeit mit den komplexeren Modellvarianten: Die *funktionalen Module* werden auf die gleiche Weise miteinander durch minimalen Informationsaustausch verknüpft. So liefert das Container-Modul ausschließlich die geometrischen Daten an den makroskopischen Positionierer und dieser gibt die Information der korrekten Position an die makroskopische kontraktile Einheit weiter (Abb. 5.6). Die kontraktile Einheit, die mit ihren Bausteinen durch das Container-Modul versorgt wird, gibt dann den kontraktilen Stress an den Container weiter, was zur Geometrieänderung führt. Durch das Wachstum des Containers in axialer

5.3 Konstruktion der modularen in-silico Protozelle und Simulationsergebnisse

Tabelle 5.2: Anfangsbedingungen (AB) und Parametersatz der Modellvariante A des in-silico Protozellmodells nach dem Baukastenprinzip.

Modul	AB, Parameter	Bedeutung	Wert
Membran	P	Precursor	0.0
	E	Enzym	$1.25 * 10^2$
	L	Membranlipid	L_{eq}
	W	Abfallprodukt	0.0
	R	Radius	0.5
	k_{lip}	Lipidbildungskonstante	2.0
	k_{in}	Lipideinbaukonstante	2.0
	α_L	spezifische Lipidoberfläche	$1.0 * 10^{-6}$
	k_{perm}	Permeabilitätskonstante	$3.34 * 10^{-3}$
	P_{ext}	externe Precursorkonzentration	$1.0 * 10^5$
	L_{eq}	Gleichgewichtskonstante des Lipideinbaus	$1.7 * 10^{-2}$
	D_{mem}	Diffusionskoeffizient	2.5
	k_{prop}	Proportionalitätskonstante	1.5
nx	Anzahl der Stützstellen	100	
Divisom	Z_c	cytosolisches Z-Protein	0.0
	Z_m	membrangebundenes Z-Protein	0.0
	k_{wz}	Z-Bildungskonstante	$1.0 * 10^{-6}$
	k_{att}	Bindungskonstante	$5.0 * 10^{-2}$
	σ	Standardabweichung der $k_{att,d}$ -Verteilung erwarteter Bereich der maximalen Z-	$1.5 * 10^{-1}$
	i_0	Proteinanbindung	$nx/2 + 1/2$
	k_{hyd}	Hydrolysekonstante	$5.0 * 10^{-4}$
	D_z	Diffusionskoeffizient	2.5

Richtung ist dieser Kreislauf dynamischer Natur und unterliegt bezüglich der weiterzuleitenden Information kontinuierlicher Änderung.

Die Dynamik von Modell A zeigt das erwünschte und erwartete Verhalten einer Protozelle: In der Abbildung 5.7 ist ein Wachstumsverhalten und eine deutliche Membraneinschnürung, d.h. ein eingeleitetes Teilungsverhalten, erkennbar. Bei Betrachtung der zeitlichen Änderung der Precursor-Konzentration, ist ein Anstieg ersichtlich. Dies verursacht eine Zunahme der Lipidkonzentration in der Membran. Durch den Einbau der Lipide in die Membran wächst die Protozelle in axialer Richtung, so dass die anfängliche Protozelllänge von $4 LE$ nach $2000 ZE$ verdoppelt wird. Die steigenden Konzentrationsmaxima des Precursors P und des Membranlipids L in der Protozellmitte (Abb. 5.7) sind die Folge der stärkeren Versorgung dieser Membranregion mit den Membranlipiden L . Durch die Membraneinschnürung kommt es in dieser Region zur Oberflächenzunahme. Da die Membranlipide überall auf der Protozellmembran mit der gleichen Rate eingebaut werden, werden durch die Ober-

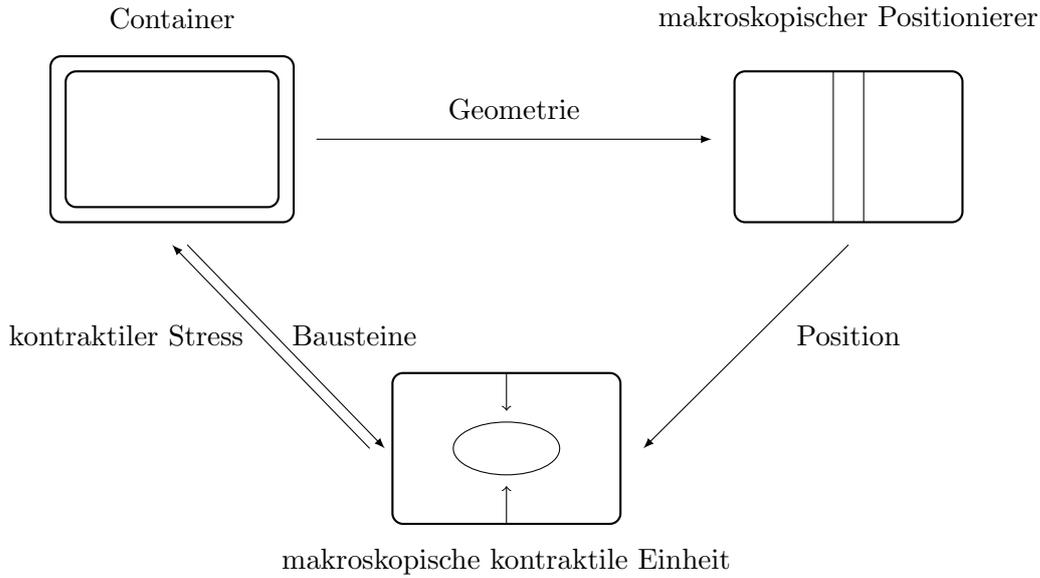


Abbildung 5.6: Schematische Struktur des Modells A. Das Membran-Modul nach Mavelli et al. [43] bildet den Container der Protozelle. Der Container definiert die Geometrie des Systems und gibt diese Information an den makroskopischen Positionierer weiter. Zusätzlich liefert der Container Bausteine der kontraktile Einheit. Der Positionierer definiert die Membranposition, an der die makroskopische kontraktile Einheit bindet. Die makroskopische kontraktile Einheit nimmt Einfluss auf den Container durch kontraktilen Stress.

flächenzunahme in der Protozellmitte lokal betrachtet mehr Lipide eingebaut.

Bei der makroskopischen Betrachtungsweise im Modell A wurde die Anbindungsrate des kontraktile Proteins mit der Anbindungskonstanten $k_{att,d}$ als verteilt angenommen (Abb. 5.8). Dessen Ziel war es, die Anbindung des kontraktile Proteins auf die Protozellmitte zu lenken.

Das dynamische Verhalten des Modells A zeigt genau dieses Ergebnis in den Simulationsergebnissen (Abb. 5.9). Werden die zeitlich gemittelten und normalisierten Konzentrationen des membrangebundenen kontraktile Proteins Z_m betrachtet, wird erkennbar, dass nur die Membranregion in der Protozellmitte mit dem membrangebundenen kontraktile Protein Z_m besetzt ist. Dabei wurde die Normalisierung auf den $[0, 1]$ -Bereich genutzt, um die Ergebnisse der unterschiedlichen Modellvarianten besser miteinander vergleichen zu können. Wird die zeitliche Radiusänderung der Protozelle untersucht, so wird deutlich, dass der Protozellradius

5.3 Konstruktion der modularen in-silico Protozelle und Simulationsergebnisse

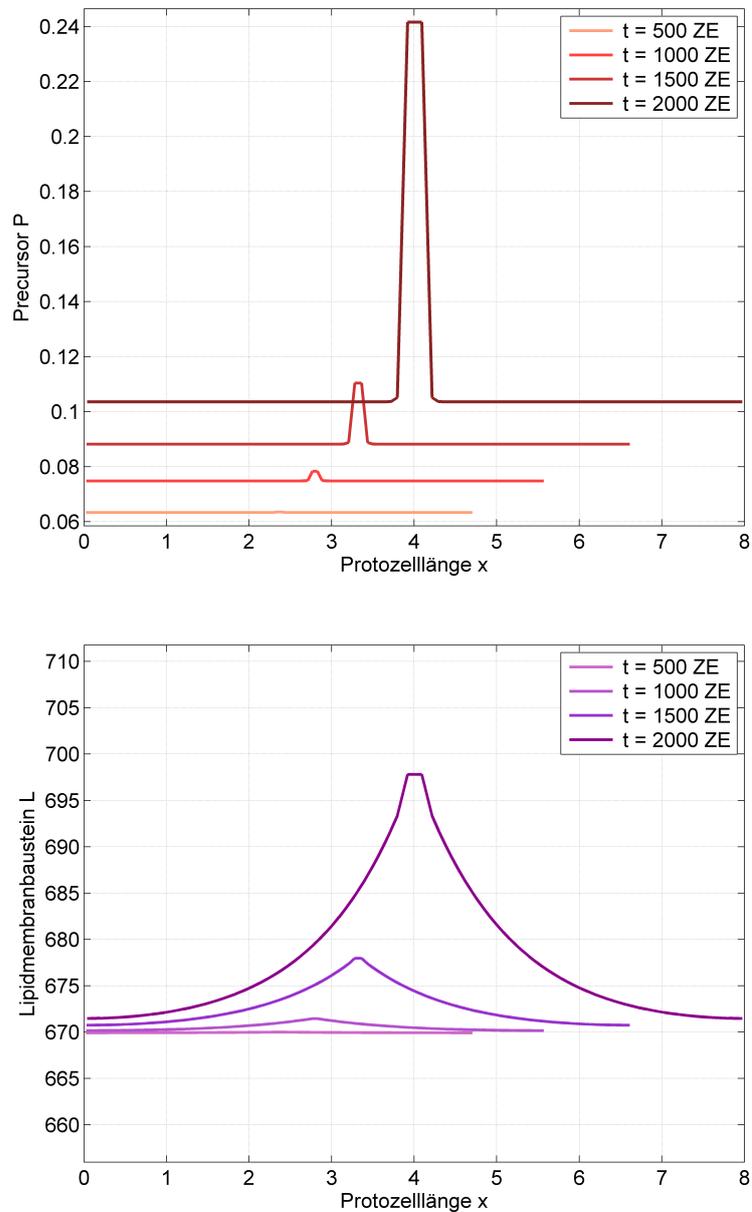


Abbildung 5.7: Simulationsergebnisse der Modellvariante A. Precursor-Konzentration P (oben) und Membranlipidkonzentration L (unten) zu unterschiedlichen Zeitpunkten t . Die Protozelllänge x nimmt mit der Zeit zu, wobei die maximalen Konzentrationen vom Precursor P und vom Membranlipid L zu jedem Zeitpunkt in der Protozellmitte zu verzeichnen sind.

genau in dieser Membranregion, in der das kontraktile Protein Z_m gebunden hat, stark abnimmt. So erfolgt zum Zeitpunkt $t = 2000$ ZE, in dem die Protozelllänge ver-

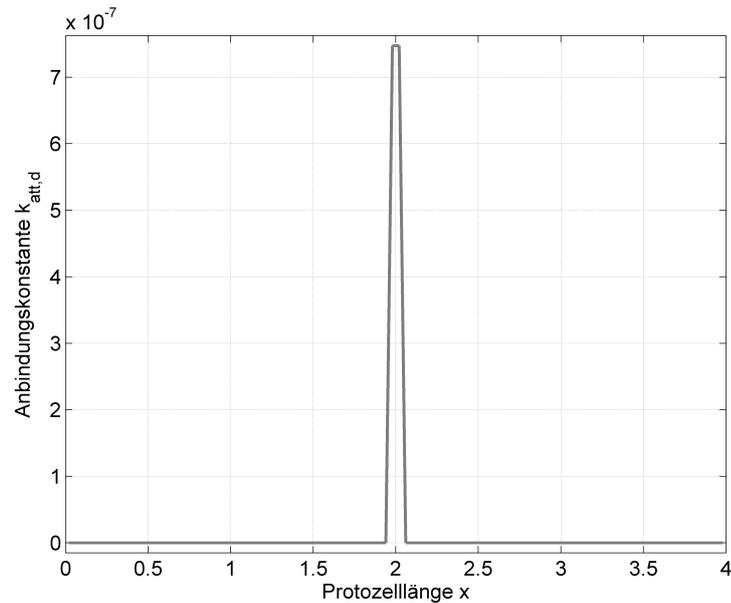


Abbildung 5.8: Örtliche Verteilung der Anbindungskonstanten $k_{att,d}$ in der Modellvariante A.

doppelt wurde, eine Radiusverringering in der Protozellmitte von anfänglich $0.5 LE$ (LE - Längeneinheit) auf $0.21 LE$.

5.3.2 Modell B: Min-Protein positionierte, makroskopische kontraktile Einheit

Die Modellvariante B beschreibt eine andere Art der Positionierung der kontraktilen Einheit. Hier wird im Gegensatz zur Modellvariante A der Positionierer nicht durch einen mechanistischen Ansatz beschrieben, sondern mit Hilfe eines bestehenden Vorbildmodells eines in lebenden Zellen vorkommenden Min-Protein-Positionierers. Mit dem Einsatz des Min-Protein-Vorbildmodells nimmt die Modellkomplexität deutlich zu aufgrund der komplexeren Struktur des Min-Protein-Moduls. Die Min-Proteine, die entlang der Membran wandern und Min-Protein-Wellen einer bestimmten Wellenlänge generieren, definieren unterschiedliche Membranbereiche. Während die Pole der Zelle, über die Zeit gemittelt betrachtet, nahezu konstant von den Min-Proteinen

5.3 Konstruktion der modularen in-silico Protozelle und Simulationsergebnisse

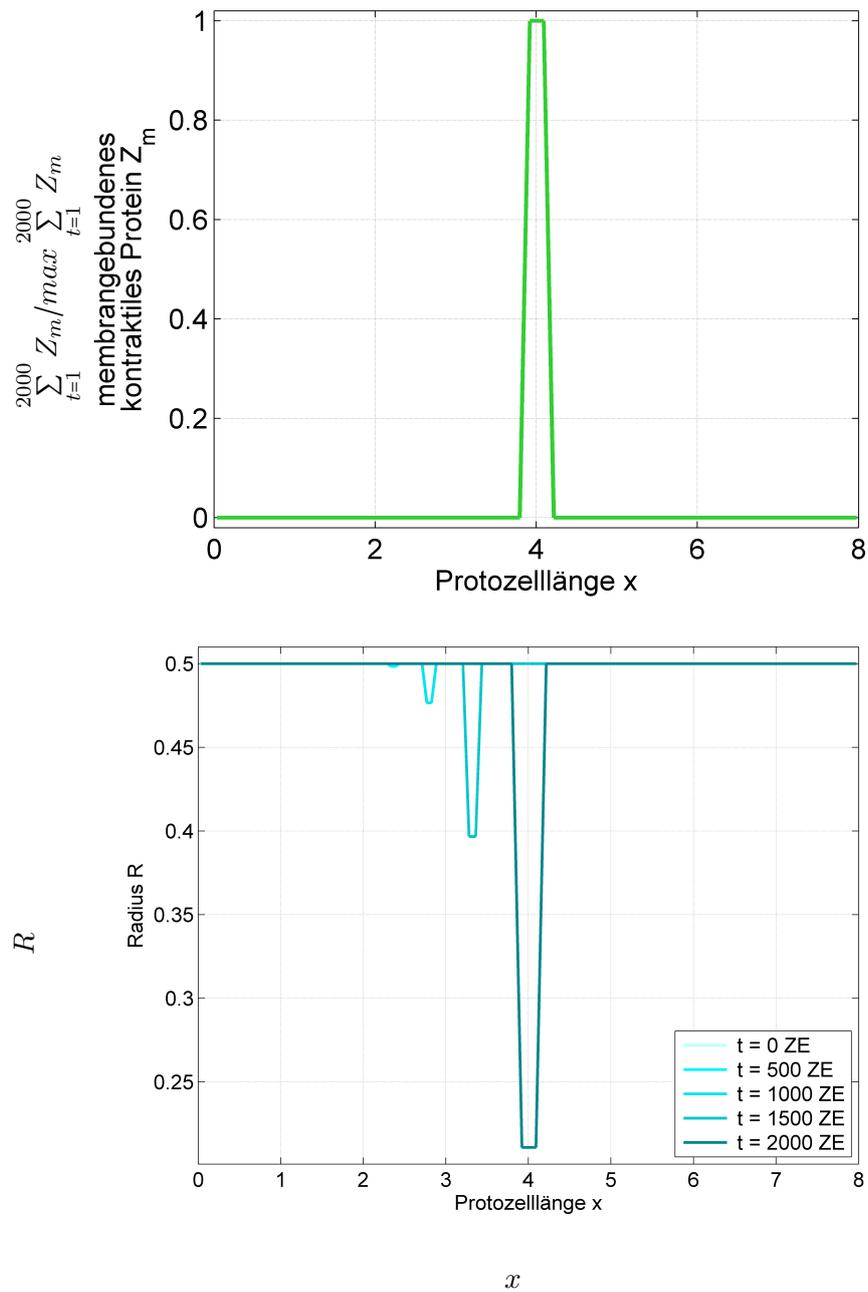


Abbildung 5.9: Simulationsergebnisse der Modellvariante A. Die Akkumulation des membrangebundenen kontraktiles Proteins Z_m über der Zeit bezüglich der Protozelllänge x ist dargestellt als zeitlich aufsummierte und mit dem maximalen Wert normalisierte Konzentration (oben). Änderung des Protozellradius R zu unterschiedlichen Zeitpunkten t (unten).

5 Baukastenansatz

besetzt sind, entsteht in der Zellmitte ein Min-Protein freier Bereich [33]. Genau dieser Bereich definiert die Membranstelle, an der das kontraktile Protein Z_m wirksam werden kann. Das Z_m -Protein akkumuliert auf diesem Membranabschnitt mit der Zeit und erzwingt die Membraneinschnürung durch seine kontraktile Eigenschaft infolge der Hydrolyse [9]. Bei der Modellvariante B werden zwei Fälle betrachtet: Im einfachsten Fall wird zunächst angenommen, dass die cytosolischen Z -Proteine Z_c sich gleichmäßig entlang der Protozelllänge verteilen (Modell B1). Inspiriert durch reale Vorgänge in *E. coli* muss jedoch ein weiterer Einfluss auf die Z -Proteine betrachtet werden, und zwar die Destabilisierung und somit die Verdrängung der cytosolischen Z -Proteine Z_c aus bestimmten Bereichen der Zelle (Modell B2). Im zweiten Fall wird somit die Aktivität des kontraktilen Proteins durch zwei Komponenten auf die Protozellmitte gelenkt: Zum einen destabilisieren die membrangebundenen Min-Proteine das Z_c -Protein an den Zellpolen. In realen Systemen erfolgt eine Inhibierung der Polymerisation von FtsZ-Filamenten durch den *MinD-MinC*-Komplex. Es wurde gezeigt, dass *MinC* direkt mit dem FtsZ-Protein interagiert und so die Polymerisation verhindert [26]. Darüber hinaus verhindert das Nukleoid, das sich bei der Zellteilung gleichermaßen auf die Zellhälften verteilt, dass sich in dessen Nähe Z_c -Proteine aufhalten. Dadurch wird das Z_c -Protein weiter zur Zellmitte gedrängt [33, 96].

Das Modell der in-silico Protozelle beschrieben durch die Modellvarianten B1 und B2 weist die in der Abbildung 5.10 gezeigte schematische Struktur auf.

Die Protozellgeometrie wird durch das Membranmodul definiert und dem Min-Protein-Positionierer als Information zur Verfügung gestellt. Das Membranmodul liefert auch die notwendigen Bausteine für die makroskopische kontraktile Einheit, indem es diese Bausteine als ein Nebenprodukt bereitstellt. Der Positionierer definiert den Membranbereich, in dem die kontraktile Einheit anbinden kann durch die Bereitstellung der Information über besetzte und freie Membranbindungsstellen. Die an die Membran bindende kontraktile Einheit verursacht durch deren Hydrolyse und daraus resultierenden kontraktile Stress die Membraneinschnürung in diesem Membranbereich.

Die numerische Implementierung der in-silico Protozellmodelle B1 und B2 - entwickelt nach dem Baukastenprinzip - erfolgte mit den in der Tabelle 5.3 aufgeführten

5.3 Konstruktion der modularen in-silico Protozelle und Simulationsergebnisse

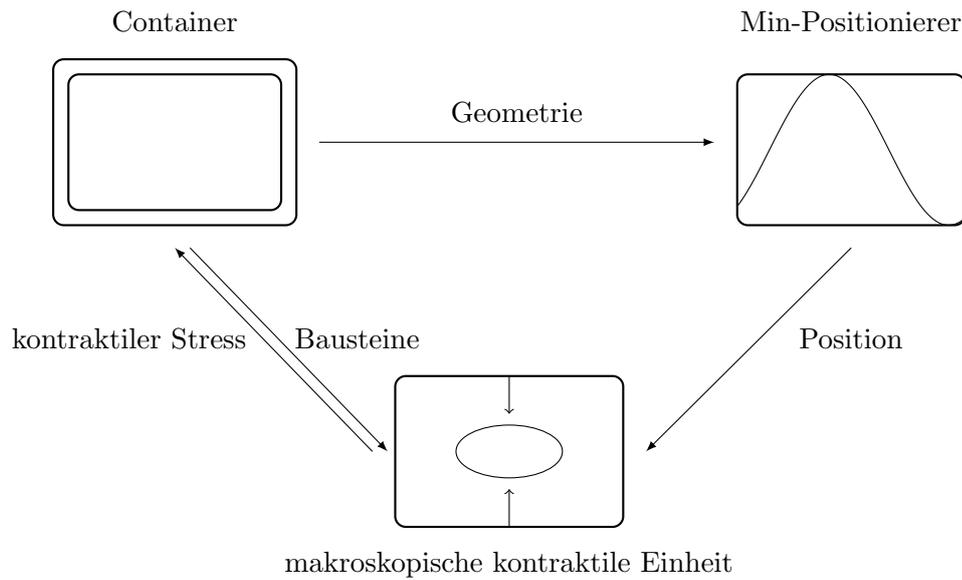


Abbildung 5.10: Schematische Struktur der Modellvariante B1 und B2. Wie im Modell A wird das Container-Modul der Protozelle durch das Modell von Mavelli et al. [43] zur Beschreibung des Membranwachstums definiert. Der Container gibt die geometrische Information an den Min-Protein-Positionierer [15, 27] weiter und liefert außerdem Bausteine an die kontraktile Einheit. Der Min-Protein-Positionierer erzeugt Bereiche auf der Membran, die von der makroskopischen kontraktilen Einheit besetzt werden können. Die makroskopische kontraktile Einheit erzwingt dann eine Geometrieänderung durch Kontraktionen der Membran.

Anfangsbedingungen und Parameterwerten. Hierbei sei erwähnt, dass die Anfangsbedingungen für $MinD_{ADP}$ und $MinE$ so gewählt wurden, dass sie bereits zu Beginn entlang der Protozelllänge wellenförmig verteilt sind. Damit wird die Phase der Wellenentwicklung übersprungen, die bei konstant angenommenen Anfangsbedingungen auftritt.

Die Betrachtung der Destabilisierung in der Modellvariante B2 macht eine Parameteranpassung notwendig, da sich die Destabilisierung stark auf das Wachstum der Protozelle auswirkt. Die entsprechenden Parameter sind ebenfalls in Tabelle 5.3 aufgelistet.

Die Simulationsergebnisse der Modellvariante B1 (Abb. 5.11) zeigen, dass sie mit der system-theoretischen Erwartung übereinstimmen. Die membrangebundenen Min-Proteine oszillieren von Zellpol zu Zellpol und haben somit gemittelt über die Zeit

5 Baukastenansatz

Tabelle 5.3: Anfangsbedingungen (AB) und Parametersatz für die numerische Berechnung des in-silico Protozell-Modells B nach dem Baukastenprinzip. Betrachtet werden zwei Varianten der cytosolischen Z-Protein-Lokalisierung: Varianten B1 und B2. Die $MinD_{ADP_0}$ - und $MinE_0$ -Proteine werden mit einer Schwingung $\Phi = (1 + \cos(ix/nx * \pi))$ verteilt.

Modul	AB, Parameter	Bedeutung	Variante B1	Variante B2
Membran	P_0	Precursor	0.0	0.0
	E_0	Enzym	1.25	1.25
	L_0	Membranlipid	L_{eq}	L_{eq}
	W_0	Abfallprodukt	0.0	0.0
	R_0	Radius	0.5	0.5
	k_{lip}	Lipidbildungskonstante	$2.85 * 10^{-5}$	$2.85 * 10^{-5}$
	k_{in}	Lipideinbaukonstante	10.0	10.0
	α_L	spezifische Lipidoberfläche	$1.0 * 10^{-5}$	$1.0 * 10^{-5}$
	k_{perm}	Permeabilitätskonstante	$2.5 * 10^{-5}$	$6.0 * 10^{-4}$
	P_{ext}	externe Precursorkonzentration	$1.0 * 10^5$	$1.0 * 10^5$
	L_{eq}	Gleichgewichtskonstante des Lipideinbaus	$1.7 * 10^{-2}$	$1.7 * 10^{-2}$
	D_{mem}	Diffusionskoeffizient	5.0	5.0
	k_{prop}	Proportionalitätskonstante	$1.0 * 10^{-2}$	$1.0 * 10^{-2}$
	nx	Anzahl der Stützstellen	100	100
M_{max}	Anzahl der Membranbindungsstellen	$1.0 * 10^4$	$1.0 * 10^4$	
Positionierer	$MinD_{ADP_0}$	cytosolisches $MinD_{ADP}$ -Protein	$\frac{MinD_{tot_0} \Phi}{R^2}$	$\frac{MinD_{tot} \Phi}{R^2}$
	$MinD_{ATP,c_0}$	cytosolisches $MinD_{ATP}$ -Protein	0.0	0.0
	$MinE_0$	cytosolisches $MinE$ -Protein	$\frac{MinE_{tot_0} \Phi}{R^2}$	$\frac{MinE_{tot} \Phi}{R^2}$
	$MinD_{ATP,m_0}$	membrangebundenes $MinD_{ATP}$ -Protein	0.0	0.0
	$MinDE_{m_0}$	membrangebundener Min-Proteinkomplex	0.0	0.0
	$MinD_{tot_0}$	Gesamtmenge von $MinD$	$5.0 * 10^3$	$5.0 * 10^3$
	$MinE_{tot_0}$	Gesamtmenge von $MinE$	$4.0 * 10^3$	$4.0 * 10^3$
	k_1	Nukleotid-Austauschkonstante	1.0	1.0
	k_2	$MinD_{ATP,c}$ -Bindungskonstante	$1.0 * 10^{-2}$	$1.0 * 10^{-2}$
	k_3	$MinD_{ATP,c}$ -Bereitstellungskonstante	$2.0 * 10^{-4}$	$2.0 * 10^{-4}$
	k_4	$MinE$ -Bindungskonstante	$5.7 * 10^{-3}$	$5.7 * 10^{-3}$
k_5	Dephosphorylierungskonstante	$2.44 * 10^{-1}$	$2.44 * 10^{-1}$	
D_{Min}	Diffusionskoeffizient	5.0	5.0	
kontraktile Einheit	Z_{c_0}	cytosolisches Z-Protein	0.0	0.0
	Z_{m_0}	membrangebundenes Z-Protein	0.0	0.0
	k_{wz}	Z-Bildungskonstante	$1.0 * 10^{-5}$	$1.0 * 10^{-4}$
	k_{att}	Bindungskonstante	20.0	$2.0 * 10^2$
	k_{hyd}	Hydrolysekonstante	$1.0 * 10^{-3}$	$1.0 * 10^{-3}$
	k_{displ}	Verdrängungskonstante	9.0	9.0
	k_{destab_1}	Min-Protein-Destabilisierungskonstante	–	$1.0 * 10^{-2}$
	$k_{destab_{2,d}}$	Nukleoid-Destabilisierungskonstante	–	$1.0 * 10^3$
D_z	Diffusionskoeffizient	5.0	5.0	

ihre maximalen Konzentrationen an den Zellpolen. Damit entsteht ein für die Z-Proteinanbindung freier Membranbereich in der Protozellmitte (Abb. 5.12).

Im Vergleich mit der Modellvariante A der in-silico Protozelle wird deutlich, dass der Membranbereich, der durch die kontraktile Einheit besetzt ist in der Modellvariante

5.3 Konstruktion der modularen in-silico Protozelle und Simulationsergebnisse

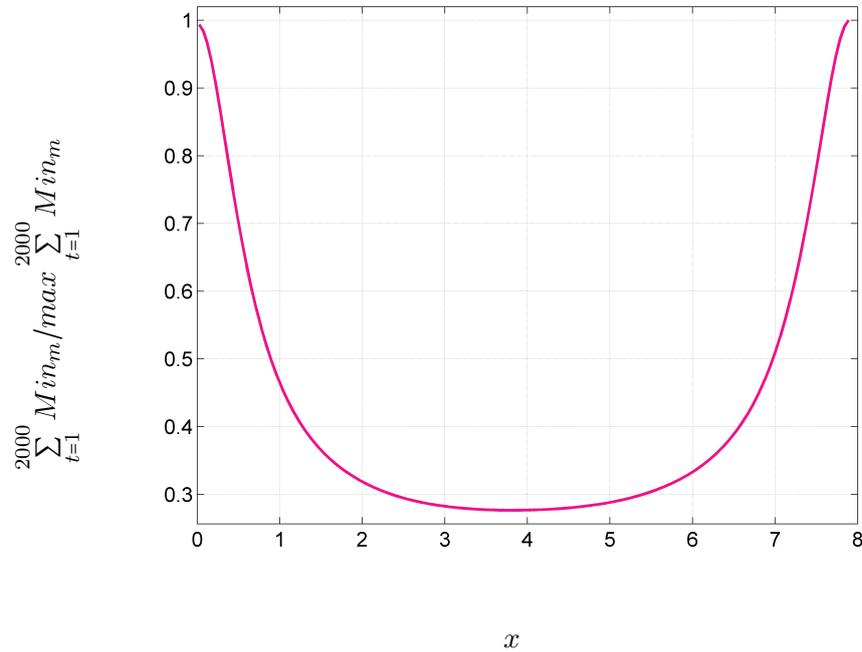


Abbildung 5.11: Simulationsergebnisse der membrangebundenen Min-Proteine Min_m im Modell B1 des in-silico-Modells nach dem Baukastenprinzip. Örtliche Verteilung der über die Zeit summierten und mit dem Maximum gewichteten Konzentrationen der membrangebundenen Min_m -Proteine ($Min_m = Min_{D_{ATP,m}} + Min_{DE_m}$).

B1 deutlich breiter ist (Abb. 5.12), was durch den Min-Protein-Positionierer verursacht wird. Dies wird wie folgt begründet: Je größer die durch die Min-Proteine besetzten Polkappen sind und je kleiner der Membranbereich, der frei von Min-Proteinen ist, desto geringer fällt die Breite der kontraktilen Einheit an der Membran aus. Es ist jedoch nicht trivial die örtliche Verteilung der membrangebundenen Z_m -Proteine in der Modellvariante B1 zu beeinflussen, beispielsweise durch Parameteranpassung, ohne Einbußen bei den Funktionalitäten der anderen zwei *funktionalen Module* und der Synchronisation zwischen allen drei Modulen. Aufgrund der Z_m -Hydrolyse in der Mitte der Protozelle und der resultierenden Membraneinschnürung, kann eine Radiusabnahme in diesem Bereich beobachtet werden. Es fällt jedoch auf, dass der Radius nicht nur in der Protozellmitte abnimmt, sondern im geringen Maße auch an den Protozelpolen. Der Effekt der Membraneinschnürung durch die Hydrolyse der membrangebundenen Z_m -Proteine ist in der Modellvariante B1 somit nicht so ausgeprägt wie in der Modellvariante A.

5 Baukastenansatz

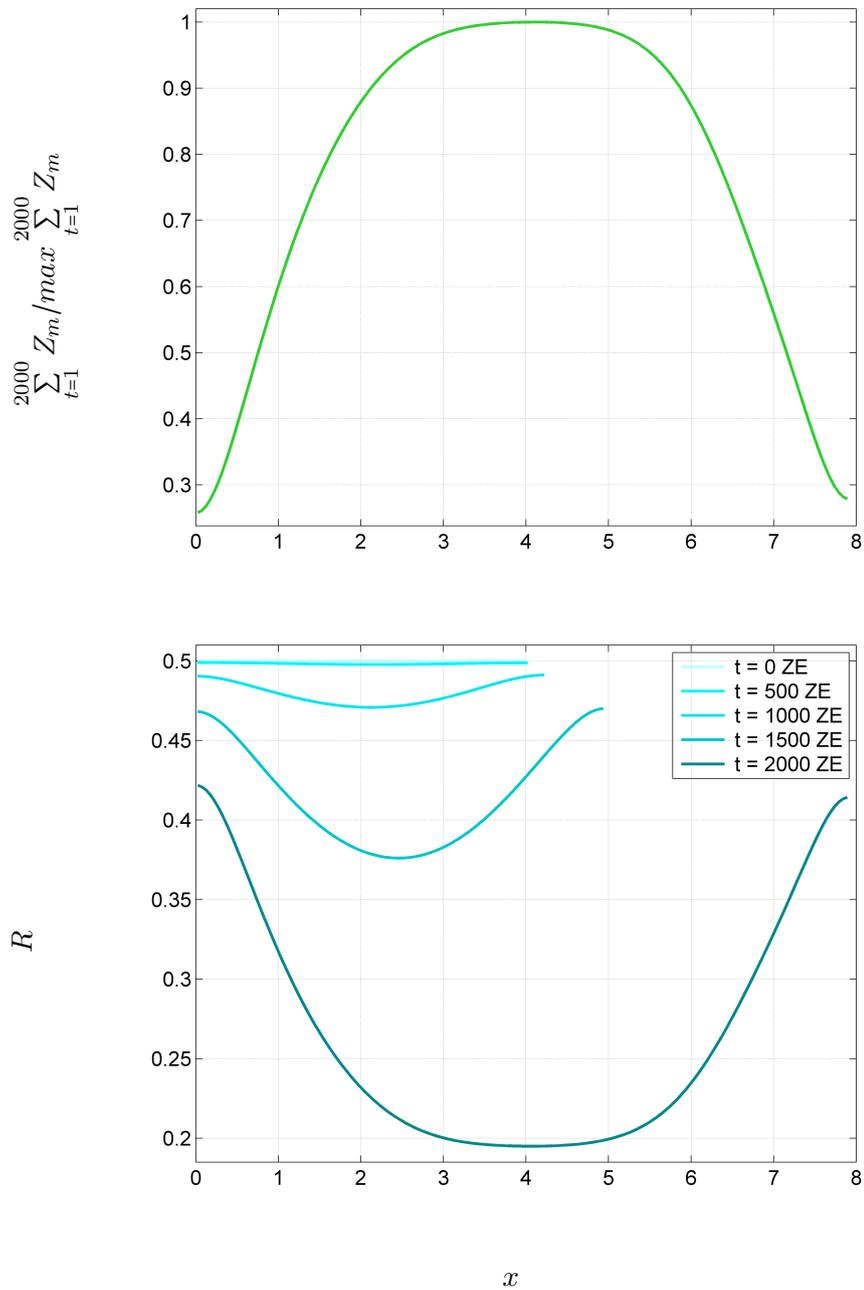


Abbildung 5.12: Simulationsergebnisse des membrangebundenen kontraktilen Proteins Z_m und des Radius R im Modell B1 des in-silico-Modells nach dem Baukastenprinzip. Örtliche Verteilung der über der Zeit summierten und mit dem Maximum gewichteten Konzentrationen des membrangebundenen kontraktilen Proteins Z_m (oben) und die Änderung des Radius R entlang der Protozelllänge x zu unterschiedlichen Zeitpunkten (unten).

Hingegen zeigt das dynamische Verhalten der Modellvariante B2, in der die Z_c -

5.3 Konstruktion der modularen in-silico Protozelle und Simulationsergebnisse

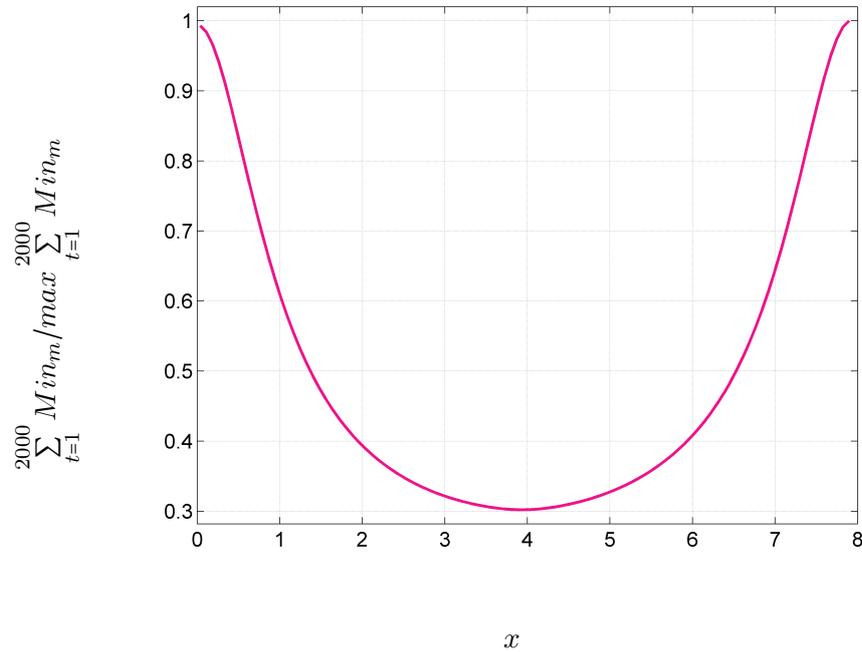


Abbildung 5.13: Simulationsergebnisse der membrangebundenen Min-Proteine Min_m im Modell B2 des in-silico-Modells nach dem Baukastenprinzip. Örtliche Verteilung der über der Zeit summierten und mit dem Maximum gewichteten Konzentrationen der membrangebundenen Min_m -Proteine ($Min_m = MinD_{ATP,m} + MinDE_m$).

Proteine durch die membrangebundenen Min-Proteine und durch das geteilte Nukleoid aus den Protozellohlen verdrängt werden, einen deutlichen Einfluss der Destabilisierung auf das Gesamtsystem. Eine leichte Veränderung ist in der Verteilung der membrangebundenen Min-Proteine entlang der Protozellmembran zu erkennen (Abb. 5.13). Im Vergleich zur Modellvariante B1 ist der durch die Min-Proteine besetzte Bereich an den Polkappen größer, so dass ein schmalerer Membranbereich entsteht, der frei von Min-Proteinen und somit frei für die kontraktile Proteine bleibt.

Die Nukleoid-Destabilisierungskonstante $k_{destab_{2,d}}$ wurde so verteilt, dass die Annahme erfüllt wird, dass das geteilte Nukleoid sich gleichmäßig auf die zwei Protozellohlen verteilt und dort im Cytoplasma das Z_c -Protein verdrängen kann (Abb. 5.14). In der Mitte der Protozelle nimmt das Nukleoid jedoch keinen Einfluss auf das kontraktile Protein, welches in dieser Protozellregion aktiv werden kann.

Der Einfluss der verteilten Nukleoid-Destabilisierungskonstante $k_{destab_{2,d}}$ wird vor

5 Baukastenansatz

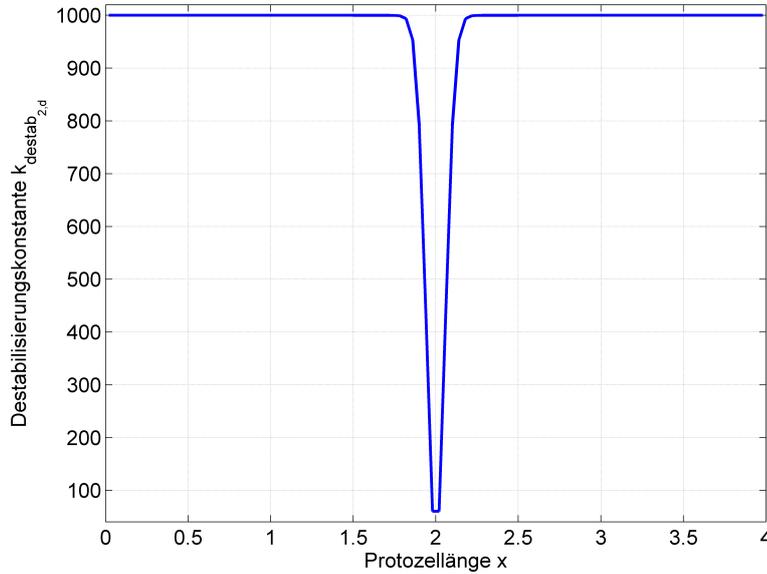


Abbildung 5.14: Örtliche Verteilung der Nukleoid-Destabilisierungskonstanten $k_{destab_{2,d}}$ in der Modellvariante B2 mit der Annahme der Aktivitätsbeschränkung des Z_c -Proteins durch das Nukleoid auf einen schmalen Bereich in der Protozellmitte.

allem in der Verteilung der membrangebundenen kontraktilen Proteine sichtbar (Abb. 5.15). Während an den Zellpolen nur wenig Z_m -Proteine an der Membran gebunden sind, da das cytosolische Z_c -Protein durch die membrangebundenen Min-Proteine und die Nukleole von den Protozellpolen verdrängt werden, nimmt die Konzentration der Z_m -Proteine in der Protozellmitte deutlich zu. Die beschränkte Aktivität der Z -Proteine auf die Protozellmitte wird auch bei der Änderung des Protozellradius R deutlich, welcher in der Protozellmitte stark abnimmt - von initial $0.5 LE$ auf einen minimalen Wert von $0.29 LE$ nach der Verdoppelung der Protozelllänge x .

Wie bereits erwähnt, beeinflusst die Destabilisierung der Z_c -Proteine die Wachstumsgeschwindigkeit der Protozelle, weshalb die kinetischen Parameter k_{perm} und k_{att} angepasst werden mussten. Sowohl k_{perm} als auch k_{att} mussten im Vergleich zur Modellvariante B1 erhöht werden: Zum einen musste die Bereitstellung der Z_c -Proteine aus dem Membranmodul durch die Erhöhung der Permeabilitätskonstante k_{perm} verstärkt werden, um den Effekt der Destabilisierung auf das Wachstum der Protozelle auszugleichen. Zum anderen kann durch die schnellere Anbindung der

5.3 Konstruktion der modularen in-silico Protozelle und Simulationsergebnisse

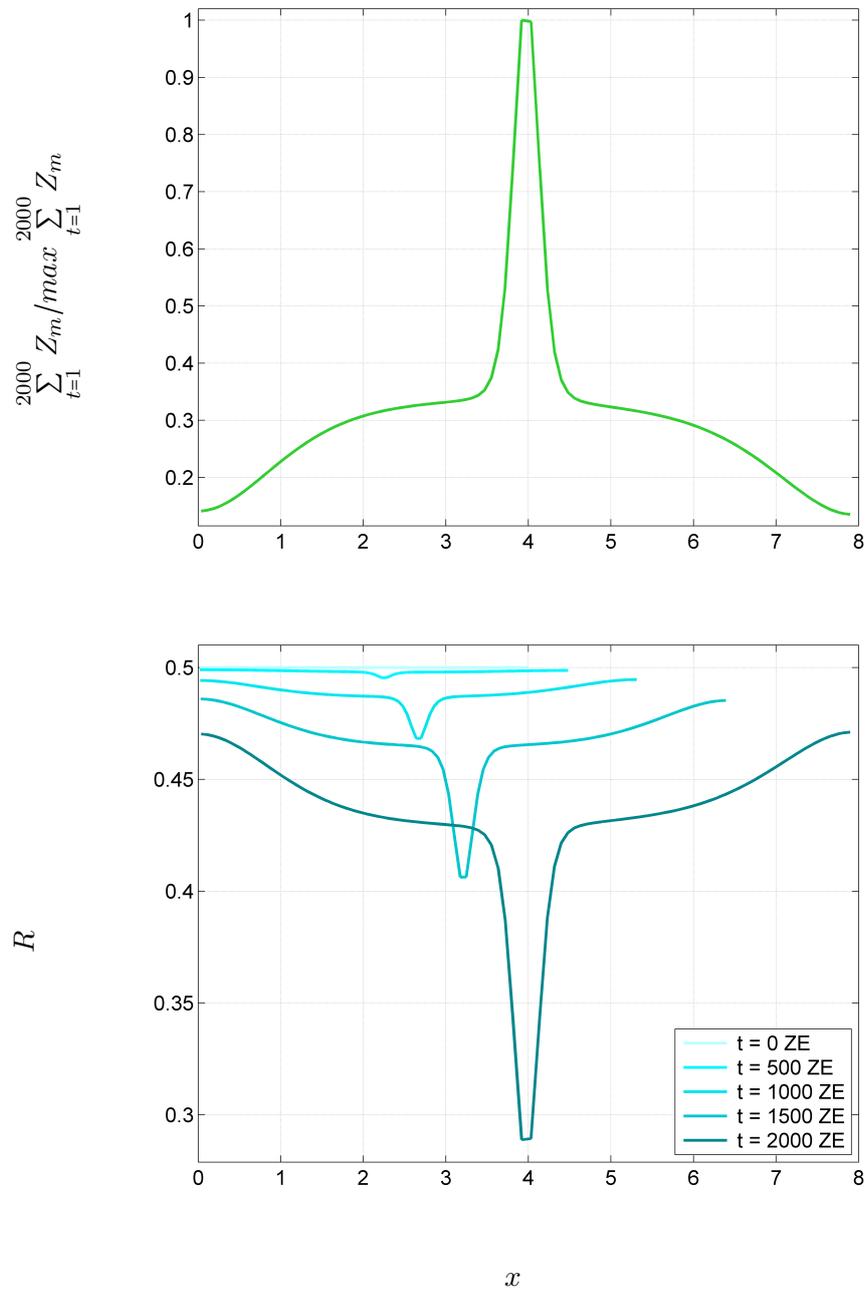


Abbildung 5.15: Simulationsergebnisse des membrangebundenen kontraktilen Proteins Z_m und des Radius R im Modell B2 des in-silico-Modells nach dem Baukastenprinzip. Örtliche Verteilung der über der Zeit summierten und mit dem Maximum gewichteten Konzentrationen des membrangebundenen kontraktilen Proteins Z_m (oben) und die Änderung des Radius R entlang der Protozelllänge x zu unterschiedlichen Zeitpunkten (unten).

Z_c -Proteine an die Membran durch die Erhöhung der Anbindungskonstanten k_{att} die Wachstumsgeschwindigkeit indirekt über Protozelleinschnürung reguliert werden. Ein stärkerer Einfluss auf die kontraktilen Z -Proteine durch die Nukleoid-Destabilisierung muss in einem detaillierterem Modell untersucht werden. Dabei wäre es sinnvoll ein funktionelles Modul zu implementieren, das die Vorgänge bei der Nukleoid-Teilung und die Verdrängung der Z -Proteine genauer beschreibt.

5.3.3 Modell C: FtsZ-Ring basierte, kontraktile Einheit positioniert durch Min-Proteine

In der Modellvariante C des in-silico Protozellmodells nach dem Baukastenprinzip kommen weiterhin das betrachtete Membranmodul und der Min-Protein-Positionierer zum Einsatz, jedoch wird die kontraktile Einheit durch ein anderes Vorbildmodell ausgetauscht. Dabei bleiben die von der kontraktilen Einheit erwarteten, zu erfüllenden Eigenschaften gleich, jedoch werden diese auf eine deutlich detailliertere Art beschrieben, orientiert an dem realen FtsZ-Ring-Systemen in *E. coli*. Diese detailliertere Betrachtungsweise zieht eine höhere Komplexität des Modells im Vergleich zu den bereits betrachteten Modellvarianten nach sich. Dennoch kann die Modellvariante C ermöglichen das Gesamtsystem so zu manipulieren, dass die Z_m -Protein-Verteilung sich auf einen schmalen Bereich in der Protozellmitte beschränkt, ohne die Annahme jeglicher Destabilisierung der cytosolischen Z -Proteine Z_c , da für dessen detailliertere Beschreibung kein geeignetes Vorbildmodell zur Verfügung steht. Als mathematisches Vorbildmodell dient hierbei die Herangehensweise von Surovtsev et al. [83]. Dieses bestehende Modell wird dennoch an die im Gesamtmodell zu erfüllenden Bedingungen aufgrund der Verknüpfung von mehreren *funktionalen Modulen* angepasst.

Die systemtheoretische Beschreibung erfolgt trotz eines anderen Systems der kontraktilen Einheit auf die gleiche Weise wie in der Modellvariante B. In der Abbildung 5.16 wird deutlich, dass auch in der Modellvariante C das Modul Container zum einen die notwendige Information über die Protozellgeometrie an den Min-

5.3 Konstruktion der modularen in-silico Protozelle und Simulationsergebnisse

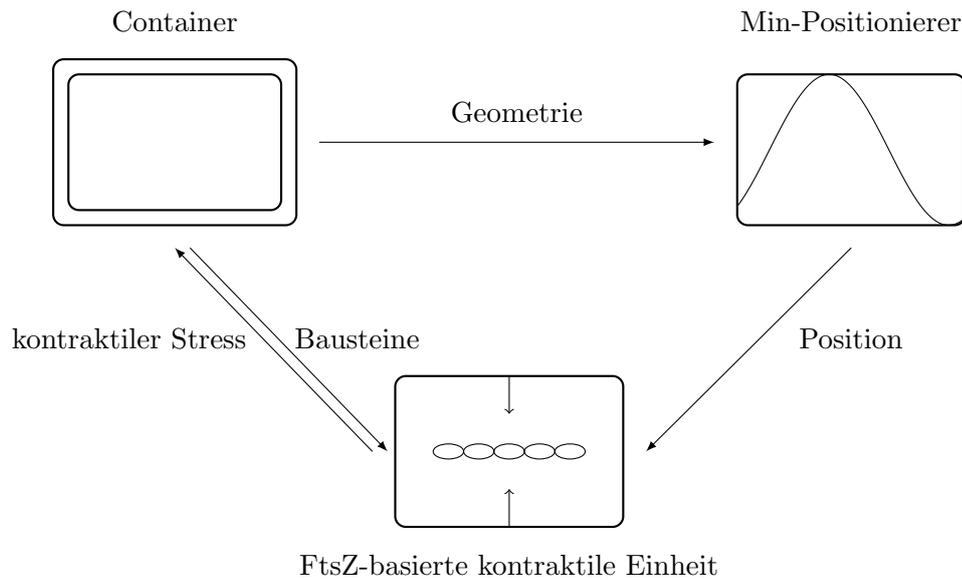


Abbildung 5.16: Schematische Struktur der Modellvariante C der in-silico Protozelle nach dem Bukastenprinzip. Das Membran-Modul nach Mavelli et al. [43] bildet den Container der Protozelle. Der Container gibt die geometrischen Daten an den Min-Protein-Positionierer weiter und bildet Bausteine für die FtsZ-basierte kontraktile Einheit. Durch den Min-Protein-Positionierer wird die Membranposition festgelegt, an der der FtsZ-Ring bindet und kontrahiert, wodurch es zur Membraneinschnürung und somit zur Geometrieänderung kommt.

Protein-Positionierer liefert und zum anderen die notwendigen Bausteine für die FtsZ-basierte kontraktile Einheit bereitstellt. Durch den Min-Protein-Positionierer eingeteilte Membranbereiche erlauben es der FtsZ-basierten kontraktilen Einheit an bestimmten Membranregionen zu binden und durch die Verkürzung der angebundenen FtsZ-Proteine - resultierend aus der Hydrolysereaktion - die Membran zusammenzuziehen. Der kontraktile Stress wirkt also wieder auf den Container und bewirkt eine Geometrieänderung aufgrund der Radiusverringering im Bereich der membrangebundenen FtsZ-basierten kontraktilen Einheit.

Der bei der numerischen Lösung verwendete Parametersatz und die Anfangsbedingungen sind in der Tabelle 5.4 aufgeführt.

Trotz der erweiterten Betrachtungsweise der kontraktilen Einheit in der Modellvariante C verglichen mit der Modellvariante B1 können keine schmalere Akkumulationsbereiche der kontraktilen Proteine an der Membran beobachtet werden (Abb.

5 Baukastenansatz

Tabelle 5.4: Anfangsbedingungen (AB) und Parametersatz für die Modellvariante C des Protozellmodells nach dem Baukastenprinzip bestehend aus einem Membranmodul, einem Min-Protein-Positionierer und dem kontraktilen FtsZ-Ring-Modul. Die $MinD_{ADP_0}$ - und $MinE_0$ -Proteine werden mit einer Schwingung $\Phi = (1 + \cos(ix/nx * \pi))$ verteilt.

Modul	AB, Parameter	Bedeutung	Wert
Membran	P_0	Precursor	P_{ext}
	E_0	Enzym	$1.25 * 10^{-1}$
	L_0	Membranlipid	L_{eq}
	W_0	Abfallprodukt	0.0
	R_0	Radius	0.5
	k_{lip}	Lipidbildungskonstante	$1.3 * 10^{-4}$
	k_{in}	Lipideinbaukonstante	1.0
	α_L	spezifische Lipidoberfläche	$1.0 * 10^{-6}$
	k_{perm}	Permeabilitätskonstante	$7.0 * 10^{-3}$
	P_{ext}	externe Precursorkonzentration	$1.0 * 10^5$
	L_{eq}	Gleichgewichtskonstante des Lipideinbaus	$1.7 * 10^{-2}$
	D_{mem}	Diffusionskoeffizient	5.0
	k_{prop}	Proportionalitätskonstante	$1.0 * 10^{-2}$
	nx	Anzahl der Stützstellen	100
Positionierer	$MinD_{ADP_0}$	cytosolisches $MinD_{ADP}$ -Protein	$\frac{MinD_{tot_0} \Phi}{R^2}$
	$MinD_{ATP,c_0}$	cytosolisches $MinD_{ATP}$ -Protein	0.0
	$MinE_0$	cytosolisches $MinE$ -Protein	$\frac{MinE_{tot_0} \Phi}{R^2}$
	$MinD_{ATP,m_0}$	membrangebundenes $MinD_{ATP}$ -Protein	0.0
	$MinDE_{m_0}$	membrangebundenes Min-Proteinkomplex	0.0
	$MinD_{tot_0}$	Gesamtmenge von $MinD$	$5.0 * 10^3$
	$MinE_{tot_0}$	Gesamtmenge von $MinE$	$4.0 * 10^3$
	k_1	Nukleotidaustauschkonstante	1.0
	k_2	$MinD_{ATP,c}$ -Bindungskonstante	$1.0 * 10^{-2}$
	k_3	$MinD_{ATP,c}$ Bereitstellungskonstante	$1.7 * 10^{-4}$
	k_4	$MinE$ -Bindungskonstante	$5.7 * 10^{-3}$
	k_5	Dephosphorylierungs- und Ablösungskonstante	$2.4 * 10^{-1}$
D_{Min}	Diffusionskoeffizient	5.0	
kontraktiler Einheit	Z_{GDP_0}	cytosolisches GDP-gebundenes Z-Protein	0.0
	Z_{GTP_0}	cytosolisches GTP-gebundenes Z-Protein	0.0
	Z_{i,c_0}	cytosolisches Z-Protein, $i = 2, 3$	0.0
	Z_{i,m_0}	membrangebundenes Z-Protein, $3 \leq i \leq i_{max}$	0.0
	i_{max}	maximale Polymerlänge	100
	k_{wz}	Z-Bildungskonstante	$1.0 * 10^{-5}$
	k_{att}	Bindungskonstante	20.0
	k_{displ}	Verdrängungskonstante	15.0
	k_{hyd}	Hydrolysekonstante	$1.0 * 10^{-3}$
	M_{max}	maximale Anzahl der Membranbindungsstellen	$1.0 * 10^4$
	k_{ex1}	Nukleotidaustauschkonstante	$1.0 * 10^{-2}$
	k_{ex2}	reversible Nukleotidaustauschkonstante	$8.9 * 10^{-3}$
	k_{nuc1}	Nukleationskonstante	$4.0 * 10^1$
	k_{nuc2}	reversible Nukleationskonstante	$4.0 * 10^{-2}$
	k_{el1}	Elongationskonstante	5.0
	k_{el2}	reversible Elongationskonstante	$5.0 * 10^{-1}$
	GDP	GDP-Konzentration	$1.0 * 10^{-1}$
	GTP	GTP-Konzentration	$1.0 * 10^{-2}$
D_z	Diffusionskoeffizient	5.0	

5.17).

Bei der Betrachtung der Simulationsergebnisse in Abbildungen 5.17 und 5.18 wird deutlich, dass die komplexere Betrachtungsweise der kontraktilen Einheit zu keiner gravierenden Änderung des dynamischen Verhaltens des Gesamtsystems führt verglichen mit den Simulationsergebnissen in der Modellvariante B1 (siehe Abb. 5.11, S. 79, und Abb. 5.12, S. 80). Die Radiusänderung der wachsenden Protozelle ist in der Modellvariante C in einem größeren Membranbereich zu beobachten.

Die Idee, durch die komplexere Betrachtungsweise der kontraktilen Einheit mehrere Regulierungsstellen in Form von Designparametern zu erhalten, wurde an der Modellvariante C geprüft. Die Polymerisationskonstanten der kontraktilen Einheit können genutzt werden, um die Z_m -Verteilung in die Protozellmitte zu drängen. Durch Parameterstudien ist es gelungen die Elongationskonstanten k_{el1} und k_{el2} als geeignete Regulationsparameter zu bestimmen, da diese stärker als alle anderen Parameter der kontraktilen Einheit die Breite der Z_m -Verteilung auf der Membran beeinflussen. Werden unterschiedliche Werte von k_{el1} und k_{el2} betrachtet, wird deutlich, dass je höher die Rückwärts-Elongationskonstante k_{el2} ist, desto ausgeprägter ist die Akkumulation von Z_m -Proteinen in der Protozellmitte und desto weniger Z_m -Proteine akkumulieren an Protozellpolen (Abb. 5.19). Dies hat den erwünschten Effekt zur Folge, dass der Radius R an den Protozellpolen weniger stark verringert wird.

Die Simulation des FtsZ-Ring-basierten Modells zeigt, dass der gewünschte Effekt einer schmalen Verteilung der membrangebundenen Z-Proteine, wie beispielsweise durch die Annahme der Destabilisierung der Z-Proteine in der Modellvariante B2, nicht erreicht werden konnte durch zusätzliche Zwischenzustände des FtsZ-Ringes in Form der unterschiedlich langen Polymere. Dennoch bietet der Polymerisationsprozess mit den zusätzlichen Parametern innerhalb der kontraktilen Einheit eine weitere Möglichkeit das dynamische Verhalten des Systems zu beeinflussen und in eine bestimmte Richtung zu lenken.

5 Baukastenansatz

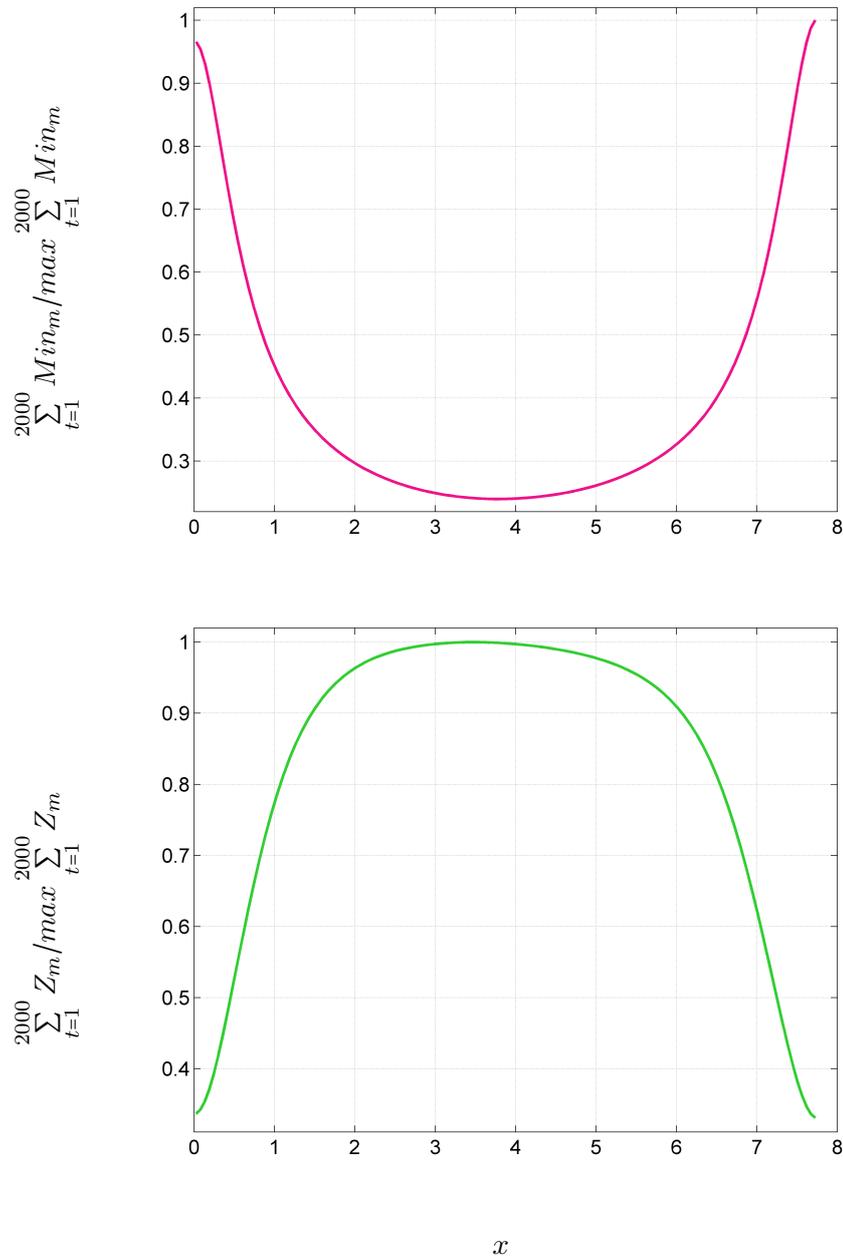


Abbildung 5.17: Simulationsergebnisse der membrangebundenen Min-Proteine Min_m und des membrangebundenen kontraktilen Proteins Z_m in der Modellvariante C des in-silico Protozellmodells nach dem Baukastenprinzip. Die Konzentration der membrangebundenen Min-Proteine ($Min_m = MinD_{ATP,m} + MinDE_m$) (oben) und die Konzentration der membrangebundenen kontraktilen Proteine Z_m (unten) sind als Summe über der Zeit relativ zu dem jeweiligen maximalen Wert dargestellt.

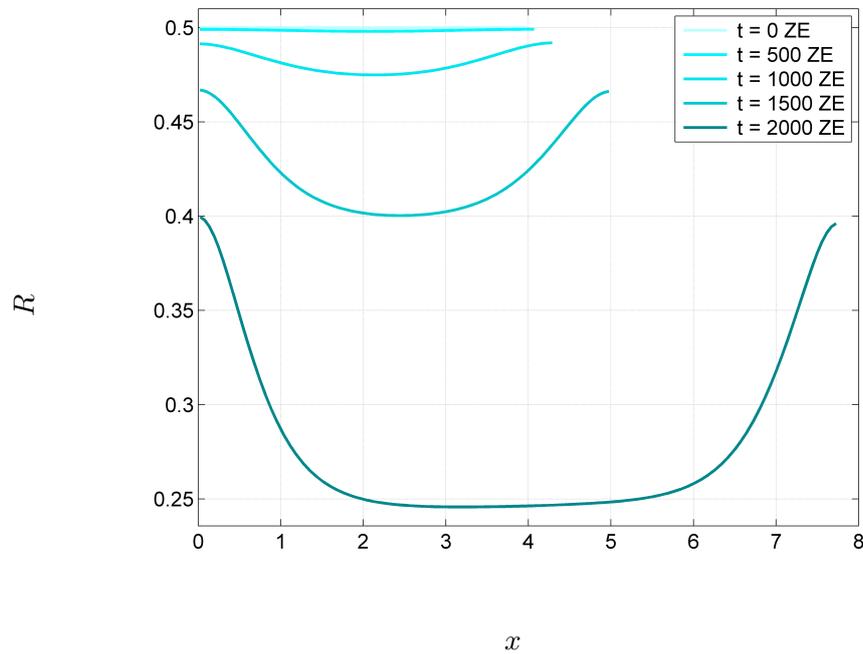


Abbildung 5.18: Simulationsergebnisse der Modellvariante C des in-silico Protozellmodells nach dem Baukastenprinzip: Der Radius R ist über der Protozelllänge x zu verschiedenen Zeitpunkten t dargestellt.

5.4 Zusammenfassung

Die Entwicklung der modular aufgebauten in-silico Protozelle aus bestehenden *funktionalen Modulen* nach dem Baukastenansatz erfolgt schrittweise. Von einer Modellvariante mit zum Teil vereinfachten Annahmen in mechanistisch beschriebenen Modulen, die miteinander zu einem Gesamtsystem verknüpft werden, wird das Modell durch den Einsatz von immer detaillierter beschriebenen *funktionalen Modulen* weiterentwickelt.

Während das Container-Modul in allen Modellvarianten auf die gleiche Weise beschrieben wird, nämlich durch die Verwendung des Vorbildmodells eines wachsenden sich selbst-reproduzierenden Vesikels nach Mavelli et al. [43], wird das Divisom bestehend aus einem Positionierer und einer kontraktilen Einheit mit verschiedenen Ansätzen betrachtet. In der Modellvariante A werden sowohl für den Positionierer der kontraktilen Einheit als auch für die kontraktile Einheit selbst vereinfachte

5 Baukastenansatz

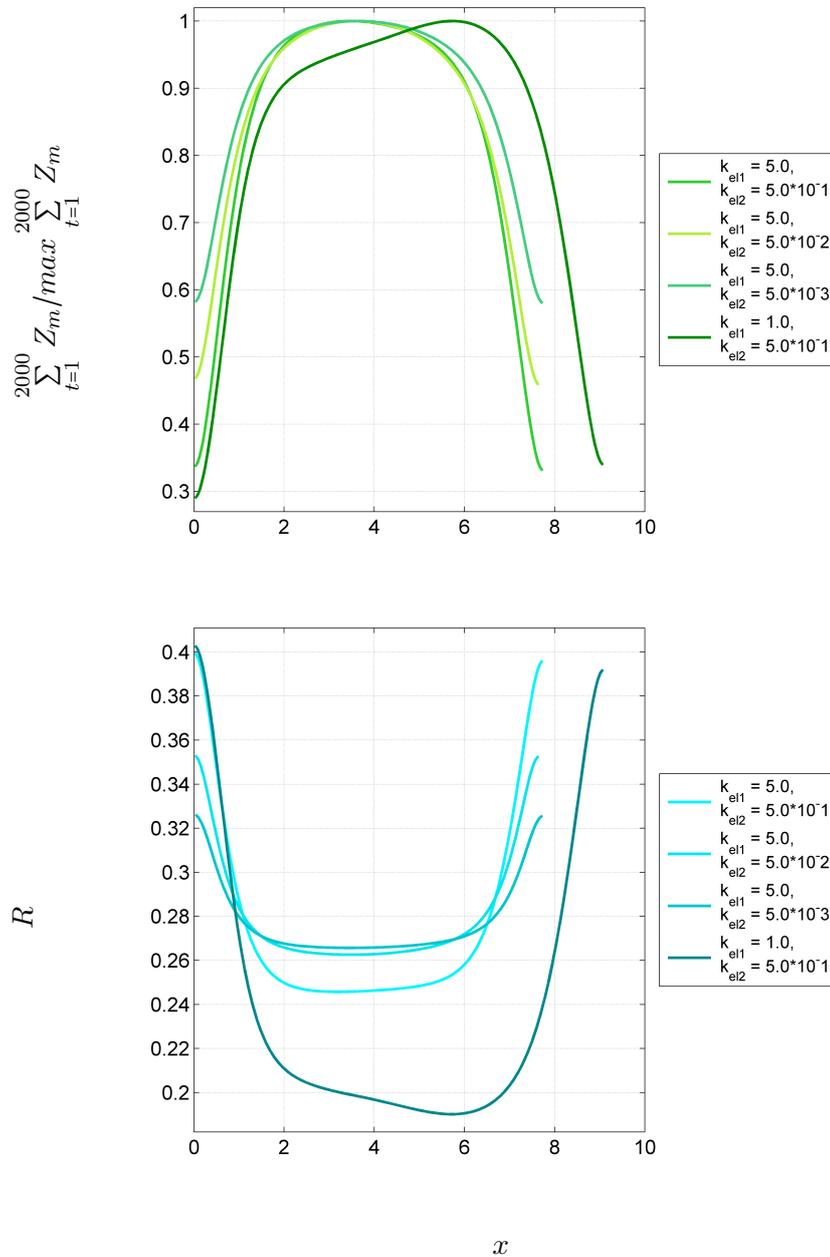


Abbildung 5.19: Simulationsergebnisse einer Parameterstudie bezüglich der Elongationskonstanten k_{el1} und k_{el2} im Modell C. Die Akkumulation des membrangebundenen kontraktilen Proteins Z_m ist als relative Summe in der Zeit über der Protozelllänge x für unterschiedliche Werte von k_{el1} und k_{el2} aufgetragen (oben). Einfluss der Elongationskonstanten k_{el1} und k_{el2} auf den Radius R (unten). Gezeigt ist der Radius R über der Protozelllänge x zum Zeitpunkt $t = 2000$ ZE für unterschiedliche Werte von k_{el1} und k_{el2} .

Annahmen verwendet. Hierbei wird die Anbindung der kontraktilen Einheit an die Membran durch einen verteilten Parameter auf die Protozellmitte beschränkt, da nur in diesem Bereich die kontraktile Einheit wirksam werden und die Membran einschnüren soll.

Die Modellvarianten B1 und B2 bedienen sich des in natürlichen Systemen vorkommenden Positionierers - des Min-Protein-Systems, welches hier nach den Vorbildmodellen von Di Ventura und Sourjik [15] und Huang et al. [27] implementiert wird. Durch sich selbst organisierende Min-Protein-Wellen werden Membranbereiche definiert, in denen die kontraktile Einheit an die Membran bindet und dort zur Verringerung des Protozellradius führt. Dabei wird die kontraktile Einheit in den Modellvarianten B1 und B2 immer noch makroskopisch betrachtet. Im Modell B1 wird davon ausgegangen, dass die membrangebundenen Min-Proteine Min_m die kontraktile Einheit lediglich insofern beeinflussen, dass sie die bereits an die Membran gebundenen Z -Proteine Z_m verdrängen, sobald sie selbst an die Membran binden. Dies stellt den ersten Regulationsschritt dar, der die Z_m -Proteine in die Protozellmitte lenken soll, was jedoch nur in solch einem Maß erfolgen kann, wie die Größe der durch die Min-Proteine besetzten Polkappen und somit der Min-Protein-freier Bereich es zulassen. Um diesen Bereich weiter zu begrenzen und eine deutlichere Membraneinschnürung in der Protozellmitte zu bewirken, wird in der Modellvariante B2 ein weiterer Regulationsschritt eingefügt, nämlich die Z -Protein-Destabilisierung, die zwar auf eine makroskopische Weise, aber dennoch zum gewünschten dynamischen Verhalten des Gesamtmodells führt. Durch die geeignete Wahl der Nukleoid-Destabilisierungs-Verteilung wird hier der Membranbereich, in dem die Einschnürung stattfinden kann, deutlich verringert. Dieser Regulationsschritt der Membraneinschnürung durch die Z -Protein-Destabilisierung muss jedoch durch geeignete mathematische Modelle erweitert und überprüft werden, was im Umfang dieser Arbeit noch nicht erfolgt ist. Als ein weiterer Regulationsschritt der kontraktilen Einheit in der Modellvariante C wird dieses *funktionale Modul* nicht auf die makroskopische Weise untersucht, sondern mit einem detaillierten Vorbildmodell des kontraktilen FtsZ-Rings, der ebenfalls in natürlichen Systemen vorkommt und durch das mathematische Modell von Surovtsev et al. [83] beschrieben ist. Die parametrische Manipulation der Modellvariante C wird jedoch durch deren stark zugenommene Komplexität im Vergleich

5 Baukastenansatz

Tabelle 5.5: Vergleich der Rechenzeiten der Modellvarianten der in-silico Protozelle nach dem Baukastenprinzip. Betriebssystem: Linux 3.5. Prozessor: Intel(R) Core(TM) i3-2100 CPU @ 3.10 GHz. Software: ProMoT (Version: v-0-8-5 9772)/Diana (Version: 0.8.3 r9768).

Modell	Anzahl der Differentialgleichungen	Anzahl der algebraischen Gleichungen	Anzahl der Hilfsvariablen	Rechenzeit ProMoT [s]	Rechenzeit Diana [s]
A	800	200	1200	8.317	9.325
B1	1300	200	2300	10.640	15.992
B2	1300	200	2600	12.188	13.855
C	11300	200	42200	585.560	1833.289

zu den anderen Modellvarianten schwieriger aufgrund der ansteigenden Rechenzeit, wie in der Tabelle 5.5 verdeutlicht ist.

Werden die Rechenzeiten der einzelnen Modellvarianten verglichen, wird erkennbar, dass je genauer beziehungsweise realitätsnäher die *funktionalen Module* beschrieben sind und somit je komplexer das Gesamtsystem wird, desto höher ist die Rechenzeit. So ist ein genaues Abwägen erforderlich, ob mit der in-silico Modellierung einer Protozelle die molekulare Detailtreue zu den realen Vorbildmodellen erwartet wird oder ob eine grobe Schätzung der im Gesamtsystem ablaufenden Mechanismen verdeutlicht werden sollen, sodass sich die Rechenzeit durch makroskopische Beschreibungen deutlich reduzieren ließe.

Wie bereits erwähnt, spielt die parametrische Manipulation des in-silico Protozellmodells eine wichtige Rolle, um das Gesamtsystem in eine gewünschte Richtung zu lenken und so ein gewünschtes dynamisches Verhalten zu erzielen. Als erster Anhaltspunkt bezüglich der Parameterwerte dienten immer die Werte aus den originalen Modellen in der Literatur. Nach der Identifikation von sensitiven Parametern wurden diese an die gewünschten Dynamiken des Gesamtsystems angepasst. In jedem einzelnen Modul gibt es Parameter, die nicht nur ihr eigenes dynamisches Verhalten beeinflussen, sondern auch das des gesamten Systems. Diese werden als Designvariablen betrachtet, um das System in den gewünschten Zustand zu versetzen.

Die wichtigsten Designparameter im Container-Modul sind die Permeabilitätskonstante k_{perm} und die Lipidbildungskonstante k_{lip} . Diese wurden genutzt, um die Protozelllänge und das Ende des Wachstumsprozesses sowie des Einschnürungsprozesses anzupassen. Je höher diese zwei Parameter eingestellt werden, umso schneller ist das

Protozellwachstum. Die Parameter des Min-Protein-Systems beeinflussen nicht nur ihre eigene Dynamik, sondern auch das Verhalten des Container-Moduls und der kontraktilen Einheit.

Durch das Justieren der Parameter des Min-Protein-Systems wird beispielsweise die Konzentration der Z -Proteine an der Membran beeinflusst, aufgrund der Abhängigkeit deren Membranbindung und -ablösung von den membrangebundenen Min-Proteinen. Zudem wird auch das Container-Modul stark beeinflusst. So ist die Konstante k_4 für die Größe der Protozell-Polkappen verantwortlich, die durch die Min-Proteine besetzt sind, und nimmt somit einen Einfluss auf die Breite der Membranregion, wo das membrangebundene kontraktile Protein Z_m über die Zeit akkumulieren kann. Auch die Protozelllänge ist von der Konstanten k_4 abhängig. Je kleiner k_4 ist, umso größer sind die Polkappen und umso kleiner ist die Breite der Z_m -Verteilung auf der Membran, aber gleichzeitig ist das Protozellwachstum langsamer. Die axiale Symmetrie der propagierenden Min-Protein-Wellen ist stark abhängig von den Parametern k_2 , k_3 und k_5 . Eine sehr feine Justierung dieser drei Parameter ist erforderlich für die Positionierung der kontraktilen Einheit in der Protozellmitte. Dabei beeinflussen die Konstanten k_2 und k_5 die Gesamtkonzentration der Min-Proteine vor allem an den Protozellpolen. Die Konstante k_3 beeinflusst die Retentionszeit der Min-Proteine auf der Membran. Je größer k_3 gewählt wird, desto länger verbleiben die Min-Proteine an einer Polkappe und somit haben auch die Z -Proteine mehr Zeit, um an der entgegengesetzten Polkappe zu akkumulieren. Im Fall der Betrachtung der Z -Protein-Verdrängung durch die Min-Proteine ist jedoch die Verdrängungskraft nicht stark genug, um die akkumulierten Z -Proteine auf der entgegengesetzten Polkappe vollständig von der Membran abzulösen. Über mehrere Oszillationsperioden wird daher eine uniform verteilte Akkumulation der Z -Proteine entlang der Protozellmembran beobachtet. Dies zieht eine ebenso uniforme Radiusverringerung entlang der gesamten Protozelle nach sich ohne den gewünschten Effekt des lokal begrenzten Einschnürungsbereiches.

Eine erfolgreiche Begrenzung des Einschnürungsbereiches erfolgt erst mit der Einführung der Destabilisierung der cytosolischen Z -Proteine Z_c durch die Min-Proteine und das Nukleoid, was durch die Erweiterung im Modell B2 erreicht wird. Dies hängt wiederum sehr stark von der Wahl der Verteilung der Nukleoid-Destabilisie-

5 Baukastenansatz

rungskonstanten $k_{destab_{2,d}}$ ab, die die Membranregion vorgibt, in der die kontraktile Einheit wirksam werden kann. Bezüglich der Synchronisation des Einschnürungsprozesses - sowohl innerhalb der kontraktilen Einheit als auch mit den anderen zwei *funktionalen Modulen* - sind die am meisten einflussnehmenden Parameter der kontraktilen Einheit die Anbindungskonstante k_{att} und die Ablösungskonstante k_{displ} . Um eine geeignete Akkumulation der membrangebundenen Z -Proteine Z_m entlang der Protozellmembran zu erhalten, müssen diese zwei Parameter in einem gut balanciertem Verhältnis zu einander stehen. Damit wird die genügend starke Anbindungsaffinität und die gleichzeitig genügend starke, aber nicht zu starke, Ablösung von der Membran garantiert. Die Parameter der kontraktilen Einheit nehmen Einfluss ebenso nicht nur auf ihr eigenes dynamisches Verhalten, sondern auch auf die anderen zwei Module. So beeinflusst beispielsweise die Bildungskonstante k_{wz} sowohl die Konzentration des cytosolischen Z -Proteins als auch die Wachstumsrate der Protozelle. Je größer k_{wz} ist, umso schneller wächst die Protozelle. Wie erwartet spielt die Hydrolysekonstante k_{hyd} eine wichtige Rolle bei der Membraneinschnürung aufgrund der Abhängigkeit der Radiusänderung von der Hydrolyserate r_{hyd} . In dem komplexen Modell C konnte beispielsweise beobachtet werden, dass die Elongationskonstanten k_{el1} und k_{el2} eine wichtige Rolle bei der Breite der Z_m -Verteilung auf der Membran spielen. Je kleiner die Elongationskonstante der Rückreaktion k_{el2} ist und somit je mehr lange Z -Polymere an der Membran gebunden sind, desto flacher ist deren Verteilung auf der Protozellmembran. Um das gesamte System zu synchronisieren, müssen die Parameter genau untersucht und eingestellt werden. Nicht nur die Parameter an den Interaktionsstellen zwischen den einzelnen Modulen, wie die Proportionalitätskonstante k_{prop} , die Bildungskonstante k_{wz} , die Anbindungskonstante k_{att} sowie die Ablösungskonstante k_{displ} , sind bei der Synchronisation von großer Bedeutung, sondern auch die Parameter innerhalb der einzelnen Module.

6 Resümee

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung von mathematischen Modellen von in-silico Protozellen und deren Weiterentwicklung unter Nutzung der in Simulationen gewonnenen Erkenntnissen sowie unter Einbeziehung aktueller Forschungsergebnisse in der Synthetischen Biologie.

Als erster Schritt mussten *funktionale Module* definiert werden, die für den Aufbau einer Protozelle geeignet erscheinen und zu einem Gesamtsystem in-silico zusammengebaut werden können. Im Hinblick auf den Nachbau einer solchen Protozelle im Labor ist es wichtig mit Hilfe der mathematischen Modellierung zu untersuchen, ob die Verknüpfung der betrachteten *funktionalen Module* grundsätzlich möglich ist beziehungsweise mit welchen Problemen bei der Konstruktion einer Protozelle unter realen Laborbedingungen zu rechnen wäre. Zum einen aus dem Konzept des MaxSynBio-Projektes als auch aus der Untersuchung bereits bestehender theoretischer Modelle einer Protozelle wurden *funktionale Module* definiert, die für das Design einer in-silico Protozelle verwendet werden können.

Die Entwicklung eines mathematischen Modells einer in-silico Protozelle wurde im Umfang dieser Arbeit aus zwei unterschiedlichen Blickwinkeln betrachtet. Zu Beginn dieser Arbeit waren noch keine Modularisierungskonzepte in der Synthetischen Biologie bekannt. Um eine Grundlage für eine sinnvolle Modularisierung zu bilden, wurde als erster Ansatz das Modularisierungsprinzip definiert, welches die Nutzung von bestehenden Vorbildmodellen vorsieht. Dabei werden bereits existierende Gesamtzellmodelle in einzelne *funktionale Module* zerlegt und diese für den Aufbau eines neuen mathematischen Modells verwendet. Die verwendeten *funktionalen Module* werden im weiteren Schritt durch reale Komponenten ersetzt. Vereinfacht dar-

gestellt, kann man sagen: Von hypothetischen Annahmen nähert man sich schrittweise den realen Systemen an. Im Gegensatz dazu beginnt die Modellierung einer in-silico Protozelle beim zweiten Ansatz - dem Baukastenprinzip - bereits mit realen Systemen. Hierbei werden bereits experimentell validierte *funktionale Module* einer Protozelle untersucht, für jedes einzelne Modul ein mathematisches Modell entwickelt und zum Schluss werden diese zu einem Gesamtzellmodell verknüpft. Aus den zwei definierten Modellierungsansätzen sind im Umfang dieser Arbeit zwei Modelle entwickelt und in unterschiedlichen Modellvarianten untersucht worden.

Das Protozell-Modell nach dem Modularisierungsansatz wurde nach den Vorbildmodellen Chemoton, das drei *funktionale Module* zu einer theoretischen, synthetischen Zelle verknüpft [22], und Goldbeter-Minimalkaskade, die den mitotischen Oszillator lebender Zellen beschreibt [25], entwickelt. Somit werden die Eigenschaften der *funktionalen Module* des Chemoton-Modells, nämlich Metabolismus, Polymerisation und Membran, mit der Selbstreproduzierbarkeit der geringer komplexen Minimalkaskade kombiniert. Der Metabolismus wird durch das Polymerisationssystem aktiviert, was jedoch mit einer fortschreitenden Polymerreplikation, die durch den Metabolismus katalysiert wird, abnimmt. Durch die Polymerisation wird das Membranwachstum katalysiert, bis sich eine Tochterzelle mit einem Teil des Metabolismus, dem während des Polymerisationsprozesses neu synthetisierten Polymer und der durch Selbst-Reproduzierbarkeit neu gebildeten Membran, abspaltet. Das entwickelte in-silico Protozell-Modell beschreibt einen selbst-reproduzierbaren Protozellzyklus, der robust bezüglich Parameterunsicherheiten ist und somit für einen großen Parameterraum das selbst-reproduzierbare Verhalten behält. Dabei steht die Eigenschaft der Selbstreproduzierbarkeit für die Fähigkeit aus abgespaltenen Mutterzellkomponenten nach jedem Protozellzyklus einen Tochterzellzyklus zu initiieren. Das Modell wurde zunächst für ein konstantes Volumen betrachtet und im nächsten Schritt mit Verdünnungstermen erweitert, die eine Volumenänderung für eine allgemeine Protozellgeometrie innehaben. Dabei mussten die zeitlichen Änderungen der intrazellulären Komponentenkonzentrationen mit der Volumenänderung synchronisiert werden. Dies wurde durch Parameterjustierung erreicht. Vor allem der Proportionalitätsfaktor σ wurde bei der Synchronisation als ein Designparameter definiert. Während für $\sigma = 0$ das Volumen konstant bleibt, treten für größere σ -Werte Volu-

menänderungseffekte auf. Für $\sigma = 1$ ist dabei eine Volumenverdoppelung während eines Protozellzyklus zu beobachten, während für $0 < \sigma < 1$ die Volumenverdoppelung nicht erreicht wird und eine kleinere Tochterzelle im Vergleich zum Mutterzellvolumen abgespalten wird. Das entwickelte Modell nach dem Modularisierungsansatz eignet sich besonders für Protozell-in-silico-Studien auf einer makroskopischen Ebene von *funktionalen Modulen*, wobei diese sehr vereinfacht mit so wenigen Komponenten wie möglich beschrieben werden. Dies ermöglicht eine genauere Untersuchung der Interaktionen zwischen den einzelnen zu einem System verknüpften *funktionalen Modulen*. Eine Verfeinerung des Modells zu detaillierteren Beschreibungen der *funktionalen Module* ist jedoch ebenfalls möglich. So könnte beispielsweise das Polymerisationsmodul hinsichtlich einer tatsächlichen Informationsspeicherung in Form einer vordefinierten Sequenz erweitert werden, was wiederum der Struktur des Chemoton-Vorbildmodells näher käme aber zugleich die Modellkomplexität erhöhen würde.

Das nach dem Baukastenprinzip entwickelte in-silico Protozellmodell wurde aus experimentell validierten und mathematisch beschriebenen *funktionalen Modulen*, die für das Design einer Gesamtprotozelle für geeignet erscheinen, aufgebaut. Wichtige Eigenschaften einer Protozelle, die im Modularisierungsansatz ihre Anwendung finden, wie Teilung, Protozellwachstum durch Membranwachstum oder die Interaktion von Metabolismus und Membran, werden im Baukastenansatz verwendet und an die experimentelle Realität angenähert. Drei *funktionale Module* wurden so miteinander verknüpft, dass sie eine zellähnliche Einheit bilden. Das Membranmodul nach dem Vorbildmodell von Mavelli et al. [43] bildet dabei die Systemgrenzen und das Divisom bestehend aus zwei Untermodulen, dem Positionierer und der kontraktilen Einheit, ist für die korrekte Einschnürung der Membran in der Protozellmitte verantwortlich. Dabei wurde das Divisom zunächst auf eine makroskopische Art beschrieben: Der makroskopische Positionierer legt durch vordefinierte Parameterverteilung einen Membranbereich fest, in dem die kontraktile Einheit wirksam werden kann. Die makroskopische kontraktile Einheit - bestehend aus lediglich zwei Komponenten, einer intrazellulären und einer membrangebundenen Spezies - sorgt in dem vom Positionierer definierten Membranbereich für die Membraneinschnürung (Modell A). Anschließend erfolgt eine schrittweise Erweiterung des Modells nach dem Baukastenprinzip, indem in einer weiteren Modellvariante zunächst der makro-

skopisch definierte Positionierer durch ein reales Vorbildmodell - das Min-Protein-System - ersetzt wird. Als theoretisches Vorbildmodell für dessen mathematische Modellierung wurde das Modell von Huang et al. [27] verwendet. Hierbei wurden unterschiedliche Annahmen bezüglich des Einflusses der Min-Proteine auf die kontraktile Einheit untersucht. Während im Modell B1 davon ausgegangen wird, dass das cytosolische kontraktile Protein Z_c im gesamten Cytosol gleichmäßig verteilt ist, betrachtet die Modellvariante B2 den Fall der Destabilisierung der Z_c -Proteine zum einen durch die Min-Proteine und zum anderen durch das Nukleoid [33]. Durch diese zwei Destabilisierungseffekte wird die Aktivität der kontraktilen Einheit verstärkt in die Protozellmitte gedrängt. Die kontraktile Einheit wird in den Modellen B1 und B2 weiterhin auf die makroskopische Weise beschrieben. Die Modellvariante C untersucht hingegen eine mikroskopische Beschreibung der kontraktilen Einheit angelehnt an reale biologische Systeme, in denen der FtsZ-Ring die Funktionalitäten dieser übernimmt. Das mathematische Vorbildmodell, das für die Modellierung der FtsZ-basierten kontraktilen Einheit verwendet wurde, stammt von Surovtsev et al. [83].

Im sehr vereinfacht dargestellten Modell A sind sowohl das Protozellwachstum als auch die korrekte Positionierung der kontraktilen Einheit und die damit verbundene Membraneinschnürung in der Protozellmitte zu beobachten. Für eine mechanistische Darstellung der Protozelle ist diese Modellvariante womöglich ausreichend, zumal solch eine vereinfachte Betrachtungsweise der *funktionalen Module* es ermöglicht die Interaktionen zwischen diesen genau zu untersuchen und mögliche regulatorische Komponenten, die die Synchronisation zwischen den *funktionalen Modulen* erlauben, zu ergänzen. So wurden beispielsweise das Container-Modul und die kontraktile Einheit direkt miteinander verschaltet durch die Annahme, dass das cytosolische kontraktile Protein Z_c als Nebenprodukt aus dem Container-Modul hervorgeht. Die makroskopische Beschreibung im Modell A ermöglichte so den Parametersatz zu bestimmen, der die Synchronisation der *funktionalen Module* sicherstellt. Der Nachteil an der Modellvariante A bleibt jedoch die Tatsache, dass das erzielte dynamische Verhalten nicht von der Eigendynamik der verknüpften *funktionalen Module* herrührt, sondern von der vorausgesetzten Verteilung der Z -Protein-Anbindung an die Membran. Um dieses Defizit des Protozellmodells zu beheben, wurde das Modell B1 um

den real existierenden Min-Protein-Positionierer erweitert. So erfolgt die Positionierung der kontraktilen Einheit in einer autonomen Weise durch die von den Min-Proteinen festgelegten Membranbereiche für die Akkumulation des membrangebundenen Z -Proteins Z_m . Im Modell B1 zeigt sich jedoch nicht das gewünschte Verhalten der sich auf einen minimalen Bereich der Protozellmembran beschränkenden Z -Proteinakkumulation. Durch eine auf die Protozelllänge bezogene breite Verteilung der membrangebundenen Z -Proteine Z_m erfolgt auch die Membraneinschnürung entlang dieses breiten Bereiches. Dieses Systemverhalten zu unterdrücken, gelang es durch die Annahme der Z -Protein-Destabilisierung in der Modellvariante B2. Durch die Verdrängung der cytosolischen Z -Proteine Z_c aus den Zellpolen durch die Min-Proteine und durch die zusätzliche Verdrängung dieser durch das sich geteilte Nukleoid beschränkt sich die kontraktile Aktivität auf einen schmalen Bereich der Protozellmembran. Die Nukleoid-Destabilisierungseffekte sind zwar ähnlich wie die Positionierung im Modell A mit Hilfe einer verteilten Parametrierung makroskopisch beschrieben, sind jedoch mit Hinblick auf die korrekte Positionierung der kontraktilen Einheit lohnenswert weiterführend detaillierter zu betrachten. Mit der Modellvariante C wurde ein real existierendes *funktionales Modul* gewählt, um die kontraktile Einheit detaillierter zu beschreiben und um so mögliche zusätzliche regulatorische Ebenen zu definieren, die die Positionierung der kontraktilen Proteine an der Protozellmembran positiv beeinflussen. Da die FtsZ-Ring-Implementierung Polymerisations- und Depolymerisationsprozesse der Z -Proteine beinhaltet, werden damit eine Reihe zusätzlicher Synchronisationsmöglichkeiten geschaffen. Die jedoch damit einhergehende signifikant erhöhte Modellkomplexität macht die Manipulation des Modells im Hinblick auf die Bestimmung des geeigneten Parametersatzes schwieriger. Hauptursache dafür ist der hohe Aufwand bei der numerischen Lösung. Dennoch konnten die Elongationskonstanten k_{el1} und k_{el2} als geeignete regulatorische Parameter für die Manipulation der Z -Protein-Verteilung entlang der Protozellmembran identifiziert werden. Die erwartete schmale Verteilung der membrangebundenen Z -Proteine Z_m konnte jedoch durch den Einsatz der FtsZ-basierten kontraktilen Einheit nicht erzielt werden. So bleibt abzuwägen, ob die detailliertere Beschreibung der kontraktilen Einheit, die realen Systemen näher kommt, einer geringeren Rechenzeit, wie beispielsweise im Modell B2, vorzuziehen ist. Um die Wechselwirkungen

der einzelnen *funktionalen Module* zu untersuchen, ist die Erweiterung des nach dem Baukastenansatz entwickelten Modells mit der FtsZ-Ring-basierten kontraktilen Einheit nicht empfehlenswert. Sind jedoch die Vorgänge und Funktionalitäten innerhalb des Moduls der kontraktilen Einheit von Bedeutung, muss hierfür dieses *funktionale Modul* bezüglich weiterer Annahmen weiterentwickelt werden.

Zusammenfassend bezüglich des Modells nach dem Baukastenprinzip lässt sich sagen, dass durch die Justierung der Modellparameter das Modell zwar beeinflussbar ist und bis zu einem gewissen Grad die Synchronisation der einzelnen *funktionalen Module* erreicht werden kann, diese Parameter jedoch sehr fein angepasst werden müssen. Des Weiteren ist es nicht in allen Fällen möglich das gewünschte dynamische Verhalten mit Hilfe einer Parameteradaption zu erreichen. Diese Tatsache spricht dafür, dass das Protozellmodell durch weitere *funktionale Teile* und *funktionale Module* erweitert werden muss, um die Erwartungen, die an das System gestellt werden, zu erfüllen. Ein sehr interessantes und zur Weiterentwicklung dieses Protozellmodells geeignetes *funktionales Modul* ist die Energieversorgung. Sowohl das Min-Protein-System als auch der kontraktile FtsZ-Ring werden in realen Systemen direkt durch energiereiche Moleküle ATP beziehungsweise GTP beeinflusst. Durch Ergänzung des Protozellmodells durch ein Energiemodul würden zusätzliche intermodulare Schnittstellen geschaffen werden, die für die Synchronisation des Positionierers mit der kontraktilen Einheit verwendet werden könnten. Zur Justierung der kinetischen Parameter in der Realität müssen geeignete Mechanismen gesucht werden, die die Systemdynamik beeinflussen. Solche Mechanismen existieren zwar, aber deren Betrachtung zieht ebenfalls die Erweiterung des Modells um weitere regulierende Module nach sich. Von lebenden Organismen ist bekannt, dass beispielsweise das Membranpotenzial eine wichtige Rolle im Teilungsprozess spielt. Es wird gezeigt, dass die Membrananker für das MinD-Protein sensitiv bezüglich des Membranpotenzials sind [82]. Die kontraktile Einheit nutzt dieselben Membrananker, so dass angenommen wird, dass der FtsZ-Ring in realen Systemen ebenso vom Protonengradienten abhängig ist. Weiterhin ist bekannt, dass die Lipidzusammensetzung und die Salzkonzentration einen direkten Einfluss auf das selbstorganisierende Verhalten der Min-Protein-Muster auf oberflächengebundenen Lipiddoppelschichten in-vitro haben [92]. Obwohl die Min-Protein-Muster robust gegenüber eines breiten Spek-

trums an anionischen Lipiddichten und Salzkonzentrationen sind, verursachen eine höhere Konzentration an anionischen Lipiden in der Membran und eine geringere Salzkonzentration kürzere Min-Protein-Wellenlängen und eine langsamere Wellenausbreitung. Weitere Faktoren, wie Temperatur [88] und Zellgeometrie [75, 99], beeinflussen ebenfalls die Min-Protein-Oszillationen und somit auch die Positionierung der kontraktilen Einheit. So kann beispielsweise durch die Erhöhung der Temperatur die Oszillationsperiode der Min-Protein-Wellen verringert werden [88] oder durch Erhöhung der Protozelllänge die Anzahl der Min-Protein-Perioden entlang der Protozelle erhöht werden [99]. Die kontraktile Einheit kann aber auch direkt manipuliert werden. Beispielsweise ist es bekannt, dass durch die Abwesenheit der Proteine FtsA und ZipA, die in den hier betrachteten Modellen nicht berücksichtigt wurden, jedoch in realen Systemen einen Grundbaustein der kontraktilen Einheit darstellen, es zu keiner Ringbildung kommt und die bereits gebildeten FtsZ-Polymere destabilisiert werden [56]. Die zusätzliche Betrachtung der Proteine FtsA und ZipA in den beschriebenen modularen Protozellmodellen könnte eine weitere Justierungsstelle liefern, um die Z-Protein-Polymerisation und dessen Akkumulation an der Membran zu regulieren. Auch bezüglich des Container-Moduls kann das Protozellmodell nach dem Baukastenprinzip weiterentwickelt werden. In dieser Arbeit wird ein zylindrischer Container betrachtet unter der Annahme, dass keinerlei Reaktionen an den Polkappen direkt stattfinden. Wird jedoch das reale Min-Protein-System betrachtet, so sind genau an den Zellpolen die meisten membrangebundenen Min-Proteine lokalisiert. Folglich wird die Beschreibung der Polkappengeometrie unumgänglich. Ein weiterer wichtiger Punkt, der bislang vernachlässigt wurde, ist die Betrachtung des Protozellmodells bis zur tatsächlichen Zellteilung. Daraus würde ein reproduzierbares, modular aufgebautes Protozellmodell resultieren. Somit wäre in dem bereits entwickelten Modell nach dem Baukastenprinzip die Eigenschaft der Reproduzierbarkeit wie im Modell nach dem Modularisierungsprinzip gegeben. Weiterhin muss über die Selbsterhaltung des entwickelten in-silico Systems nachgedacht werden. Ist die Selbsterhaltung der Protozelle von großer Bedeutung, so müssen die Bausteine, wie das Enzym E und die Min-Proteine intrazellulär gebildet werden. Hierbei müssten die *funktionalen Module* Container und Positionierer erweitert werden, um die intrazelluläre Synthese dieser *funktionaler Bausteine* sicherzustellen.

6 Resümee

Hinsichtlich der Einordnung dieser Arbeit im Gesamtbereich der Synthetischen Biologie kann behauptet werden, dass sie wichtige Erkenntnisse bezüglich einiger zu verknüpfender *funktionaler Module* liefert. Es wird deutlich, dass die mathematische Modellierung von künstlichen Systemen sich noch mit grundlegenden Fragen beschäftigt, zum größten Teil verschuldet durch die noch fehlenden, in Realität synthetisierten Protozellen. Dennoch sind diese Grundlagen von höchstem Interesse für die Formulierung von Hypothesen und Vorhersagen, die den Experimentatoren in Zukunft behilflich sein können. Die hier entwickelten in-silico Protozellmodelle liefern eine solide Grundlage für die theoretische Synthetische Biologie. Ebenso bieten sie zahlreiche Möglichkeiten zur Weiterentwicklung und Anpassung an reale Subsysteme, derer man sich noch lange Zeit bedienen wird, da die reine bottom-up Synthese von Protozellen nach dem heutigen Stand der Forschung noch nicht möglich ist.

Literaturverzeichnis

- [1] Ernesto Andrianantoandro, Subhayu Basu, David K. Karig, and Ron Weiss. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. *Molecular Systems Biology*, 2(1):2006.0028, January 2006. doi:10.1038/msb4100073.
- [2] Pascale Angelica Bachmann, Pier Luigi Luisi, and Jacques Lang. Autocatalytic self-replicating micelles as models for prebiotic structures. *Nature*, 357:57–59, May 1992. URL: <https://doi.org/10.1038/357057a0>.
- [3] David P. Bartel and Peter J. Unrau. Constructing an RNA world. *Trends in Cell Biology*, 9(12):M9 – M13, 1999. doi:[https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(99\)01669-4](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(99)01669-4).
- [4] Jeremy Bartosiak-Jentys, Ali H. Hussein, Claire J. Lewis, and David J. Leak. Modular system for assessment of glycosyl hydrolase secretion in *Geobacillus thermoglucosidasius*. *Microbiology*, 159(7):1267–1275, 2013. doi:10.1099/mic.0.066332-0.
- [5] Mark A. Bedau. A functional account of degrees of minimal chemical life. *Synthese*, 185(1):73–88, March 2012. doi:10.1007/s11229-011-9876-x.
- [6] Afke Wieke Betten, Jacqueline E W Broerse, and Frank Kupper. Dynamics of problem setting and framing in citizen discussions on synthetic biology. *Public understanding of science (Bristol, England)*, 27(3):294–309, April 2018. doi:10.1177/0963662517712207.
- [7] Erfei Bi and Joe Lutkenhaus. FtsZ ring structure associated with division in

Literaturverzeichnis

- Escherichia coli. *Nature*, 354(6349):161–164, November 1991. doi:10.1038/354161a0.
- [8] BrisSynBio - a BBSRC / EPSRC funded Synthetic Biology Research Centre, 2018. URL: <http://www.bristol.ac.uk/brissynbio/>, last checked: 12.03.2018.
- [9] Elisa J. Cabré, Alicia Sánchez-Gorostiaga, Paolo Carrara, Noelia Roperero, Mercedes Casanova, Pilar Palacios, Pasquale Stano, Mercedes Jiménez, Germán Rivas, and Miguel Vicente. Bacterial division proteins FtsZ and ZipA induce vesicle shrinkage and cell membrane invagination. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(37):26625–26634, September 2013. doi:10.1074/jbc.M113.491688.
- [10] Center for fundamental Living Technology - FLinT, 2018. URL: <http://www.flint.sdu.dk/>, last checked: 12.03.2018.
- [11] D. Chandran, W. B. Copeland, S. C. Sleight, and H. M. Sauro. Mathematical modeling and synthetic biology. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 5(4):299 – 309, 2008. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2009.07.002>.
- [12] Peter Dabrock. Playing God? Synthetic biology as a theological and ethical challenge. *Systems and synthetic biology*, 3(1-4):47–54, December 2009. doi:10.1007/s11693-009-9028-5.
- [13] Piet de Boer, Robin Crossley, and Lawrence Rothfield. The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature*, 359(6392):254–256, September 1992. doi:10.1038/359254a0.
- [14] Deutsche Forschungsgemeinschaft, acatech – Deutsche Akademie der Technikwissenschaften, and Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften. *Synthetische Biologie - Stellungnahme, Standpunkte*. 2009.
- [15] Barbara Di Ventura and Victor Sourjik. Self-organized partitioning of dynamically localized proteins in bacterial cell division. *Molecular Systems Biology*, 7:457, January 2011. doi:10.1038/msb.2010.111.

- [16] Taylor B Dolberg, Patrick S Donahue, and Joshua N Leonard. Reframing cell therapy for cancer. *Nature Chemical Biology*, 14:204–205, February 2018.
- [17] Alicja J. Dzieciol and Stephen Mann. Designs for life: protocell models in the laboratory. *Chemical Society Reviews*, 41(1):79–85, December 2011. doi:10.1039/C1CS15211D.
- [18] Lukas Endler, Nicolas Rodriguez, Nick Juty, Vijayalakshmi Chelliah, Camille Laibe, Chen Li, and Nicolas Le Novère. Designing and encoding models for synthetic biology. *Journal of The Royal Society Interface*, 2009. doi:10.1098/rsif.2009.0035.focus.
- [19] Drew Endy. Foundations for engineering biology. *Nature*, 438(7067):449–453, November 2005. doi:10.1038/nature04342.
- [20] Stephanie Galanie, Kate Thodey, Isis J. Trenchard, Maria Filsinger Interrante, and Christina D. Smolke. Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science*, 349(6252):1095–1100, 2015. doi:10.1126/science.aac9373.
- [21] Daniel G. Gibson, John I. Glass, Carole Lartigue, Vladimir N. Noskov, Ray-Yuan Chuang, Mikkel A. Algire, Gwynedd A. Benders, Michael G. Montague, Li Ma, Monzia M. Moodie, Chuck Merryman, Sanjay Vashee, Radha Krishnakumar, Nacyra Assad-Garcia, Cynthia Andrews-Pfannkoch, Evgeniya A. Denisova, Lei Young, Zhi-Qing Qi, Thomas H. Segall-Shapiro, Christopher H. Calvey, Prashanth P. Parmar, Clyde A. Hutchison, Hamilton O. Smith, and J. Craig Venter. Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome. *Science*, 329(5987):52–56, July 2010. doi:10.1126/science.1190719.
- [22] T Gánti. Organization of chemical reactions into dividing and metabolizing units: the chemotons. *Bio Systems*, 7(1):15–21, July 1975.
- [23] T. Gánti. *Chemoton theory*, volume 1: Theoretical foundations of fluid machineries, pages 144–159. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.
- [24] Tibor Gánti. Biogenesis Itself. *Journal of Theoretical Biology*, 187(4):583–593, August 1997. doi:10.1006/jtbi.1996.0391.

- [25] A. Goldbeter. A minimal cascade model for the mitotic oscillator involving cyclin and cdc2 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(20):9107–9111, October 1991. doi:10.1073/pnas.88.20.9107.
- [26] Zonglin Hu, Amit Mukherjee, Sebastien Pichoff, and Joe Lutkenhaus. The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26):14819–14824, December 1999. doi:10.1073/pnas.96.26.14819.
- [27] Kerwyn Casey Huang, Yigal Meir, and Ned S. Wingreen. Dynamic structures in *Escherichia coli*: Spontaneous formation of MinE rings and MinD polar zones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22):12724–12728, October 2003. doi:10.1073/pnas.2135445100.
- [28] IDA Solver, February 2016. URL: <http://computation.llnl.gov/projects/sundials/ida>, last checked: 12.03.2018. URL: <https://computation.llnl.gov/projects/sundials/ida>.
- [29] Thomas Kjeldsen, Jakob Brandt, Asser S. Andersen, Michi Egel-Mitani, Morten Hach, Annette Frost Pettersson, and Knud Vad. A removable spacer peptide in an α -factor-leader/insulin precursor fusion protein improves processing and concomitant yield of the insulin precursor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 170(1):107 – 112, 1996. doi:[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00822-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00822-5).
- [30] Chad Knutson, Gil Benko, Tristan Rocheleau, Fouzi Mouffouk, Jerzy Maselko, Liaohai Chen, Andrew P. Shreve, and Steen Rasmussen. Metabolic Photofragmentation Kinetics for a Minimal Protocell: Rate-Limiting Factors, Efficiency, and Implications for Evolution. *Artificial Life*, 14(2):189–201, 2008.
- [31] M. Krasnyk, K. Bondareva, O. Milokhov, K. Teplinskiy, M. Ginkel, and A Kienke. The ProMoT/diana simulation environment. *Computer Aided Chemical Engineering*, 21:445–450, January 2006. doi:10.1016/S1570-7946(06)80086-6.
- [32] Simon Kretschmer and Petra Schwille. Toward Spatially Regulated Division

- of protocells: Insights into the E. coli Min System from in Vitro Studies. *Life (Basel, Switzerland)*, 4(4):915–928, 2014. doi:10.3390/life4040915.
- [33] Simon Kretschmer and Petra Schwille. Pattern formation on membranes and its role in bacterial cell division. *Current Opinion in Cell Biology*, 38:52–59, February 2016. doi:10.1016/j.ceb.2016.02.005.
- [34] Bastian Kubsch, Tom Robinson, Reinhard Lipowsky, and Rumiana Dimova. Solution Asymmetry and Salt Expand Fluid-Fluid Coexistence Regions of Charged Membranes. *Biophysical Journal*, 110(12):2581–2584, June 2016. doi:10.1016/j.bpj.2016.05.028.
- [35] Kensuke Kurihara, Mieko Tamura, Koh-ichiroh Shohda, Taro Toyota, Kentaro Suzuki, and Tadashi Sugawara. Self-reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA. *Nature Chemistry*, 3:775–781, September 2011.
- [36] Felix H. Lam, Adel Ghaderi, Gerald R. Fink, and Gregory Stephanopoulos. Engineering alcohol tolerance in yeast. *Science*, 346(6205):71–75, 2014. doi:10.1126/science.1257859.
- [37] Effendi Leonard, David Nielsen, Kevin Solomon, and Kristala Jones Prather. Engineering microbes with synthetic biology frameworks. *Trends in Biotechnology*, 26(12):674 – 681, 2008. doi:https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.08.003.
- [38] Pier Luigi Luisi. An Open Question on the Origin of Life: The First Forms of Metabolism. *Chemistry & Biodiversity*, 9(11):2635–2647, 2012. doi:10.1002/cbdv.201200281.
- [39] J Maniloff. The minimal cell genome: “on being the right size”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(19):10004–10006, September 1996.
- [40] Stephen Mann. The Origins of Life: Old Problems, New Chemistries. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(1):155–162, January 2013. doi:10.1002/anie.201204968.

- [41] Chiara Martino, Shin-Hyun Kim, Louise Horsfall, Alireza Abbaspourrad, Susan J. Rosser, Jonathan Cooper, and David A. Weitz. Protein expression, aggregation, and triggered release from polymersomes as artificial cell-like structures. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(26):6416–6420, 2012. doi:10.1002/anie.201201443.
- [42] Ariadna Martos, Ana Raso, Mercedes Jiménez, Zdeněk Petrášek, Germán Rivas, and Petra Schwill. FtsZ Polymers Tethered to the Membrane by ZipA Are Susceptible to Spatial Regulation by Min Waves. *Biophysical Journal*, 108(9):2371–2383, May 2015. doi:10.1016/j.bpj.2015.03.031.
- [43] Fabio Mavelli, Emiliano Altamura, Luigi Cassidei, and Pasquale Stano. Recent theoretical approaches to minimal artificial cells. *Entropy*, 16(5):2488–2511, 2014.
- [44] Fabio Mavelli and Pier L. Luisi. Autopoietic Self-Reproducing Vesicles: A Simplified Kinetic Model. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(41):16600–16607, January 1996. doi:10.1021/jp960524e.
- [45] Fabio Mavelli and Kepa Ruiz-Mirazo. Theoretical conditions for the stationary reproduction of model protocells. *Integrative Biology*, 5(2):324–341, January 2013. doi:10.1039/C2IB20222K.
- [46] MaxSynBio - Max Planck Research Network in Synthetic Biology, 2018. URL: <https://www.maxsynbio.mpg.de/13480/maxsynbio>, last checked: 12.03.2018.
- [47] H.J. Morowitz, B. Heinz, and D.W. Deamer. The chemical logic of a minimum protocell. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 18(3):281–287, 1988. doi:10.1007/BF01804674.
- [48] Kary B. Mullis. The Polymerase Chain Reaction (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 33(12):1209–1213, 1994. doi:10.1002/anie.199412091.
- [49] Vincent Noireaux and Albert Libchaber. A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

- of the United States of America*, 101(51):17669–17674, December 2004. doi:10.1073/pnas.0408236101.
- [50] T. Oberholzer, R. Wick, P.L. Luisi, and C.K. Biebricher. Enzymatic RNA Replication in Self-Reproducing Vesicles: An Approach to a Minimal Cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 207(1):250–257, February 1995. doi:10.1006/bbrc.1995.1180.
- [51] A. I. Oparin. *The Origin of Life*. Macmillan, New York, 1938.
- [52] Lado Otrin, Nika Marušič, Claudia Bednarz, Tanja Vidaković-Koch, Ingo Lieberwirth, Katharina Landfester, and Kai Sundmacher. Toward Artificial Mitochondrion: Mimicking Oxidative Phosphorylation in Polymer and Hybrid Membranes. *Nano Letters*, 17(11):6816–6821, 2017. doi:10.1021/acs.nanolett.7b03093.
- [53] Pamela P. Peralta-Yahya, Fuzhong Zhang, Stephen B. del Cardayre, and Jay D. Keasling. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. *Nature*, 488(7411):320–328, August 2012. doi:10.1038/nature11478.
- [54] Julien Petit, Ingmar Polenz, Jean-Christophe Baret, Stephan Herminghaus, and Oliver Bäumchen. Vesicles-on-a-chip: A universal microfluidic platform for the assembly of liposomes and polymersomes. *The European Physical Journal E*, 39(6):39–59, June 2016. doi:10.1140/epje/i2016-16059-8.
- [55] Julien Petit, Laura Thomi, Jennifer Schultze, Marcin Makowski, Inka Negwer, Kaloian Koynov, Stephan Herminghaus, Frederik R. Wurm, Oliver Bäumchen, and Katharina Landfester. A modular approach for multifunctional polymersomes with controlled adhesive properties. *Soft Matter*, 14(6):894–900, 2018. doi:10.1039/C7SM01885A.
- [56] Sebastien Pichoff and Joe Lutkenhaus. Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 21(4):685–693, February 2002. doi:10.1093/emboj/21.4.685.
- [57] Andrew Pohorille and David Deamer. Artificial cells: prospects for biotech-

- nology. *Trends in Biotechnology*, 20(3):123–128, March 2002. doi:10.1016/S0167-7799(02)01909-1.
- [58] Priscilla E. M. Purnick and Ron Weiss. The second wave of synthetic biology: from modules to systems. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(6):410–422, June 2009. doi:10.1038/nrm2698.
- [59] N. Rashevsky. An approach to the mathematical biophysics of biological self-regulation and of cell polarity. *The bulletin of mathematical biophysics*, 2(1):15–25, March 1940. doi:10.1007/BF02478028.
- [60] Steen Rasmussen, Liaohai Chen, Martin Nilsson, and Shigeaki Abe. Bridging nonliving and living matter. *Artificial Life*, 9(3):269–316, 2003. doi:10.1162/106454603322392479.
- [61] Sarah M. Richardson, Leslie A. Mitchell, Giovanni Stracquadanio, Kun Yang, Jessica S. Dymond, James E. DiCarlo, Dongwon Lee, Cheng Lai Victor Huang, Srinivasan Chandrasegaran, Yizhi Cai, Jef D. Boeke, and Joel S. Bader. Design of a synthetic yeast genome. *Science*, 355(6329):1040–1044, 2017. doi:10.1126/science.aaf4557.
- [62] Emeline Rideau, Frederik R. Wurm, and Katharina Landfester. Giant polymerosomes from non-assisted film hydration of phosphate-based block copolymers. *Polymer Chemistry*, 9(44):5385–5394, 2018. doi:10.1039/C8PY00992A.
- [63] Dae-Kyun Ro, Eric M. Paradise, Mario Ouellet, Karl J. Fisher, Karyn L. Newman, John M. Ndungu, Kimberly A. Ho, Rachel A. Eachus, Timothy S. Ham, James Kirby, Michelle C. Y. Chang, Sydnor T. Withers, Yoichiro Shiba, Richmond Sarpong, and Jay D. Keasling. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 440(7086):940–943, April 2006. doi:10.1038/nature04640.
- [64] Sascha Rollié, Michael Mangold, and Kai Sundmacher. Designing biological systems: Systems Engineering meets Synthetic Biology. *Chemical Engineering Science*, 69(1):1–29, February 2012. doi:10.1016/j.ces.2011.10.068.

- [65] L. I. Rothfield, Y. L. Shih, and G. King. Polar explorers: membrane proteins that determine division site placement. *Cell*, 106(1):13–16, July 2001.
- [66] F. Sanger and A. R. Coulson. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3):441 – 448, 1975. doi:[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2).
- [67] Markus Schmidt. Diffusion of synthetic biology: a challenge to biosafety. *Systems and Synthetic Biology*, 2(1):1–6, June 2008. doi:[10.1007/s11693-008-9018-z](https://doi.org/10.1007/s11693-008-9018-z).
- [68] Eugenia Schneider and Michael Mangold. Discussion of synchronization problems during cell cycle in artificial cell modeling. *ALIFE 2014: The Fourteenth International Conference on the Synthesis and Simulation of Living Systems*, (26):691–692, July 2014. doi:[10.1162/978-0-262-32621-6-ch110](https://doi.org/10.1162/978-0-262-32621-6-ch110).
- [69] Eugenia Schneider and Michael Mangold. Development and analysis of a mathematical model for a synthetic biological cell. *IFAC-PapersOnLine*, 48(1):447–452, January 2015. doi:[10.1016/j.ifacol.2015.05.018](https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2015.05.018).
- [70] Eugenia Schneider and Michael Mangold. Modular assembling process of an in-silico protocell. *Biosystems*, 165:8 – 21, March 2018. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2017.12.004>.
- [71] Eugenia Schneider, Jakob Schweizer, and Michael Mangold. Bringing the parts together: Steps towards an in-silico protocell. *IFAC-PapersOnLine*, 49(26):20–25, January 2016. doi:[10.1016/j.ifacol.2016.12.097](https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2016.12.097).
- [72] E. Schrödinger. *What is Life?* Cambridge University Press, Cambridge, 1944.
- [73] Jason P. Schrum, Ting F. Zhu, and Jack W. Szostak. The Origins of Cellular Life. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(9), September 2010. doi:[10.1101/cshperspect.a002212](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002212).
- [74] Thomas Schwander, Lennart Schada von Borzyskowski, Simon Burgener, Niña Socorro Cortina, and Tobias J Erb. A synthetic pathway for the fixa-

- tion of carbon dioxide in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, 354(6314):900–904, November 2016. doi:10.1126/science.aah5237.
- [75] Jakob Schweizer, Martin Loose, Mike Bonny, Karsten Kruse, Ingolf Monch, and Petra Schwille. Geometry sensing by self-organized protein patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(38):15283–15288, September 2012. doi:10.1073/pnas.1206953109.
- [76] Petra Schwille. Jump-starting life? Fundamental aspects of synthetic biology. *The Journal of Cell Biology*, 210(5):687–690, 2015. doi:10.1083/jcb.201506125.
- [77] Petra Schwille, Joachim Spatz, Katharina Landfester, Eberhard Bodenschatz, Stephan Herminghaus, Victor Sourjik, Tobias J. Erb, Philippe Bastiaens, Reinhard Lipowsky, Anthony Hyman, Peter Dabrock, Jean-Christophe Baret, Tanja Vidakovic-Koch, Peter Bieling, Rumiana Dimova, Hannes Mutschler, Tom Robinson, T.-Y. Dora Tang, Seraphine Wegner, and Kai Sundmacher. MaxSynBio: Avenues Towards Creating Cells from the Bottom Up. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(41):13382–13392, 2018. doi:10.1002/anie.201802288.
- [78] Daniel Segré, Dafna Ben-Eli, David W. Deamer, and Doron Lancet. The Lipid World. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 31(1):119–145, 2001. doi:10.1023/A:1006746807104.
- [79] Ricard V Solé, Andreea Munteanu, Carlos Rodriguez-Caso, and Javier Macía. Synthetic protocell biology: from reproduction to computation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 362(1486):1727–1739, October 2007. doi:10.1098/rstb.2007.2065.
- [80] Johannes Starkbaum, Matthias Braun, and Peter Dabrock. The synthetic biology puzzle: a qualitative study on public reflections towards a governance framework. *Systems and synthetic biology*, 9(4):147–157, December 2015. doi:10.1007/s11693-015-9182-x.
- [81] Jan Steinkühler, Jaime Agudo-Canalejo, Reinhard Lipowsky, and Rumiana Dimova. Modulating Vesicle Adhesion by Electric Fields. *Biophysical Journal*,

- 111(7):1454 – 1464, 2016. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.08.029>.
- [82] Henrik Strahl and Leendert W. Hamoen. Membrane potential is important for bacterial cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(27):12281–12286, July 2010. doi:[10.1073/pnas.1005485107](https://doi.org/10.1073/pnas.1005485107).
- [83] Ivan V. Surovtsev, Jeffrey J. Morgan, and Paul A. Lindahl. Kinetic modeling of the assembly, dynamic steady state, and contraction of the ftsz ring in prokaryotic cytokinesis. *PLoS Comput Biol*, 4(7):e1000102, July 2008. doi:[10.1371/journal.pcbi.1000102](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000102).
- [84] Synberc - Synthetic Biology Engineering Research Center, 2018. URL: <https://www.synberc.org/about>, last checked: 12.03.2018.
- [85] Eörs Szathmáry. The origin of replicators and reproducers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1474):1761–1776, October 2006. doi:[10.1098/rstb.2006.1912](https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1912).
- [86] Hiroshi Takahashi, Yoshiyuki Kageyama, Kensuke Kurihara, Katsuto Takakura, Shigeru Murata, and Tadashi Sugawara. Autocatalytic membrane-amplification on a pre-existing vesicular surface. *Chemical Communications*, 46(46):8791–8793, November 2009. doi:[10.1039/C0CC02758H](https://doi.org/10.1039/C0CC02758H).
- [87] Katsuto Takakura and Tadashi Sugawara. Membrane Dynamics of a Myelin-like Giant Multilamellar Vesicle Applicable to a Self-Reproducing System. *Langmuir*, 20(10):3832–3834, May 2004. doi:[10.1021/la049738a](https://doi.org/10.1021/la049738a).
- [88] Ahmed Touhami, Manfred Jericho, and Andrew D. Rutenberg. Temperature Dependence of MinD Oscillation in Escherichia coli: Running Hot and Fast. *Journal of Bacteriology*, 188(21):7661–7667, November 2006. doi:[10.1128/JB.00911-06](https://doi.org/10.1128/JB.00911-06).
- [89] Taro Toyota, Katsuto Takakura, Yoshiyuki Kageyama, Kensuke Kurihara, Naoto Maru, Kiyoshi Ohnuma, Kunihiko Kaneko, and Tadashi Sugawara. Popula-

- tion Study of Sizes and Components of Self-Reproducing Giant Multilamellar Vesicles. *Langmuir*, 24(7):3037–3044, April 2008. doi:10.1021/la703017s.
- [90] John J. Tyson, Attila Csikasz-Nagy, and Bela Novak. The dynamics of cell cycle regulation. *BioEssays*, 24(12):1095–1109, 2002. doi:10.1002/bies.10191.
- [91] F. G. Varela, H. R. Maturana, and R. Uribe. Autopoiesis: The organization of living systems, its characterization and a model. *Biosystems*, 5(4):187–196, May 1974. doi:10.1016/0303-2647(74)90031-8.
- [92] Anthony G. Vecchiarelli, Min Li, Michiyo Mizuuchi, and Kiyoshi Mizuuchi. Differential affinities of MinD and MinE to anionic phospholipid influence Min Patterning dynamics in vitro. *Molecular microbiology*, 93(3):453–463, August 2014. doi:10.1111/mmi.12669.
- [93] Sven K. Vogel. Reconstitution of a Minimal Actin Cortex by Coupling Actin Filaments to Reconstituted Membranes. In Ray H. Gavin, editor, *Cytoskeleton Methods and Protocols: Methods and Protocols*, pages 213–223. Springer New York, New York, NY, 2016. doi:10.1007/978-1-4939-3124-8_11.
- [94] Hui Wang, Mingqi Xie, Ghislaine Charpin-El Hamri, Haifeng Ye, and Martin Fussenegger. Treatment of chronic pain by designer cells controlled by spearmint aromatherapy. *Nature Biomedical Engineering*, 2(2):114–123, February 2018. doi:10.1038/s41551-018-0192-3.
- [95] Christian Wölfer, Sven K. Vogel, and Michael Mangold. A curvilinear Model Approach: Actin Cortex Clustering Due to ATP-induced Myosin Pulls. *IFAC-PapersOnLine*, 49(26):103 – 108, 2016. doi:https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2016.12.110.
- [96] Ling Juan Wu and Jeff Errington. Nucleoid occlusion and bacterial cell division. *Nature Reviews Microbiology*, 10:8–12, October 2011. doi:10.1038/nrmicro2671.
- [97] Simge G. Yüz, Julia Ricken, and Seraphine V. Wegner. Independent Control over Multiple Cell Types in Space and Time Using Orthogonal Blue and Red

- Light Switchable Cell Interactions. *Advanced Science*, 5(8):1800446, 2018. doi:10.1002/advs.201800446.
- [98] Weimin Zhang, Guanghou Zhao, Zhouqing Luo, Yicong Lin, Lihui Wang, Yakun Guo, Ann Wang, Shuangying Jiang, Qingwen Jiang, Jianhui Gong, Yun Wang, Sha Hou, Jing Huang, Tianyi Li, Yiran Qin, Junkai Dong, Qin Qin, Jiaying Zhang, Xinzhi Zou, Xi He, Li Zhao, Yibo Xiao, Meng Xu, Erchao Cheng, Ning Huang, Tong Zhou, Yue Shen, Roy Walker, Yisha Luo, Zheng Kuang, Leslie A. Mitchell, Kun Yang, Sarah M. Richardson, Yi Wu, Bing-Zhi Li, Ying-Jin Yuan, Huanming Yang, Jiwei Lin, Guo-Qiang Chen, Qingyu Wu, Joel S. Bader, Yizhi Cai, Jef D. Boeke, and Junbiao Dai. Engineering the ribosomal DNA in a megabase synthetic chromosome. *Science*, 355(6329), 2017. doi:10.1126/science.aaf3981.
- [99] Katja Zieske and Petra Schwille. Reconstitution of self-organizing protein gradients as spatial cues in cell-free systems. *eLife*, 3, October 2014. doi:10.7554/eLife.03949.