



MAX-PLANCK-INSTITUT
FÜR KOLLOID- UND
GRENZFLÄCHENFORSCHUNG



Assemblierung von Proteinkomplexen *in vitro* und *in vivo*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin Theoretische Biologische Physik

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Institut für Physik und Astronomie
der Universität Potsdam

angefertigt in der
Abteilung Theorie und Bio-Systeme
des Max-Planck-Instituts für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Potsdam

von
Stefanie Förste

30.03.22

Förste, Stefanie:

Assemblierung von Proteinkomplexen in vitro und in vivo / Stefanie Förste.

–Dissertation, Potsdam: Universität Potsdam, 2022. 102 Seiten.

Hauptbetreuer*in: Prof. Dr. Reinhard Lipowsky

Betreuer*innen: Prof. Dr. Sophia Rudorf
Prof. Dr. Svetlana Santer

Gutachter*innen: Prof. Dr. Sophia Rudorf
Prof. Dr. Reinhard Lipowsky
Prof. Dr. Dr. h.c. Edda Klipp

Online veröffentlicht auf dem

Publikationsserver der Universität Potsdam:

<https://doi.org/10.25932/publishup-55074>

<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-550742>

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht, sowie selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich bin damit einverstanden, dass meine Arbeit veröffentlicht wird, d. h. dass die Arbeit elektronisch gespeichert, in andere Formate konvertiert, auf den Servern der Universität Potsdam öffentlich zugänglich gemacht und über das Internet verbreitet werden darf.

Potsdam, 30.03.22

Stefanie Förste

Zusammenfassung

Assemblierung von Proteinkomplexen *in vitro* und *in vivo*

Proteine sind an praktisch allen Prozessen in lebenden Zellen maßgeblich beteiligt. Auch in der Biotechnologie werden Proteine in vielfältiger Weise eingesetzt. Ein Protein besteht aus einer Kette von Aminosäuren. Häufig lagern sich mehrere dieser Ketten zu größeren Strukturen und Funktionseinheiten, sogenannten Proteinkomplexen, zusammen. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine Proteinkomplexbildung bereits während der Biosynthese der Proteine (*co-translational*) stattfinden kann und nicht stets erst danach (*post-translational*) erfolgt. Da Fehlassemblierungen von Proteinen zu Funktionsverlusten und adversen Effekten führen, ist eine präzise und verlässliche Proteinkomplexbildung sowohl für zelluläre Prozesse als auch für biotechnologische Anwendungen essenziell. Mit experimentellen Methoden lassen sich zwar u.a. die Stöchiometrie und die Struktur von Proteinkomplexen bestimmen, jedoch bisher nicht die Dynamik der Komplexbildung auf unterschiedlichen Zeitskalen. Daher sind grundlegende Mechanismen der Proteinkomplexbildung noch nicht vollständig verstanden. Die hier vorgestellte, auf experimentellen Erkenntnissen aufbauende, computergestützte Modellierung der Proteinkomplexbildung erlaubt eine umfassende Analyse des Einflusses physikalisch-chemischer Parameter auf den Assemblierungsprozess. Die Modelle bilden möglichst realistisch die experimentellen Systeme der Kooperationspartner (Bar-Ziv, Weizmann-Institut, Israel; Bukau und Kramer, Universität Heidelberg) ab, um damit die Assemblierung von Proteinkomplexen einerseits in einem quasi-zweidimensionalen synthetischen Expressionssystem (*in vitro*) und andererseits im Bakterium *Escherichia coli* (*in vivo*) untersuchen zu können. Mit Hilfe eines vereinfachten Expressionssystems, in dem die Proteine nur an die Chip-Oberfläche, aber nicht aneinander binden können, wird das theoretische Modell parametrisiert. In diesem vereinfachten *in-vitro*-System durchläuft die Effizienz der Komplexbildung drei Regime – ein bindedominiertes Regime, ein Mischregime und ein produktionsdominiertes Regime. Ihr Maximum erreicht die Effizienz dabei kurz nach dem Übergang vom bindedominierten ins Mischregime und fällt anschließend monoton ab. Sowohl im nicht-vereinfachten *in-vitro*- als auch im *in-vivo*-System koexistieren je zwei konkurrierende Assemblierungspfade: Im *in-vitro*-System erfolgt die Komplexbildung entweder spontan in wässriger Lösung (*Lösungsassemblierung*) oder aber in einer definierten Schrittfolge an der Chip-Oberfläche (*Oberflächenassemblierung*); Im *in-vivo*-System konkurrieren hingegen die *co*- und die *post-translational*e Komplexbildung. Es zeigt

sich, dass die Dominanz der Assemblierungspfade im in-vitro-System zeitabhängig ist und u.a. durch die Limitierung und Stärke der Bindestellen auf der Chip-Oberfläche beeinflusst werden kann. Im in-vivo-System hat der räumliche Abstand zwischen den Syntheseorten der beiden Proteinkomponenten nur dann einen Einfluss auf die Komplexbildung, wenn die Untereinheiten schnell degradieren. In diesem Fall dominiert die co-translationale Assemblierung auch auf kurzen Zeitskalen deutlich, wohingegen es bei stabilen Untereinheiten zu einem Wechsel von der Dominanz der post- hin zu einer geringen Dominanz der co-translationalen Assemblierung kommt. Mit den *in-silico*-Modellen lässt sich neben der Dynamik u.a. auch die Lokalisierung der Komplexbildung und -bindung darstellen, was einen Vergleich der theoretischen Vorhersagen mit experimentellen Daten und somit eine Validierung der Modelle ermöglicht. Der hier präsentierte *in-silico* Ansatz ergänzt die experimentellen Methoden, und erlaubt so, deren Ergebnisse zu interpretieren und neue Erkenntnisse davon abzuleiten.

Inhaltsverzeichnis

Symbolverzeichnis	vii
1. Einleitung	1
1.1. Biologie der Proteinsynthese	4
1.2. Reaktionsdiffusionssysteme	6
1.2.1. Diffusion	6
1.2.2. Bimolekulare Elementarreaktion	7
2. Numerische Methoden	11
2.1. Explizites Eulervorwärtsverfahren	12
2.2. Reaktion-verlangsamt-Diffusion-Methode	14
2.3. Die RvD-Methode im Vergleich zum expliziten Eulerverfahren	18
3. Experimentelle Methoden	21
3.1. Chip-Design	22
3.2. Messung der Verteilung der an der Oberfläche gebundenen Proteine	23
4. Fallen-Effizienz in Systemen mit einer Proteinuntereinheit	27
4.1. Ein-Boxmodell – homogene Erzeugung der Reaktanten	27
4.2. Zwei-Boxenmodell – inhomogene Erzeugung der Reaktanten	33
4.3. Bindung und Diffusion in quasi-realistischen Systemen	38
4.4. Variation der Fallenverteilung	45
4.5. Variation des Abstandes von Translationsort und Fallen	48
4.6. Erhöhung der Fallenkapazität	50
4.7. Modellvalidierung	51
5. Oberflächen- vs. Lösungsassemblierung in Systemen mit zwei Proteinuntereinheiten	57
5.1. Modellierung der Proteinkomplexbildung	58
5.2. Dynamik der Komplexbildung und Verteilung der Komplexe	61
5.3. Vergleich von Simulation und Experiment	67
5.4. Einfluss des Abstands der Translationsorte	70
6. Proteinkomplexbildung in der lebenden Zelle	77
6.1. Modellierung der <i>in vivo</i> -Proteinkomplexbildung	81

6.2. Degradation und Lokalisierung	86
6.3. Initiationsrate beeinflusst den Assemblierungsprozess	93
6.4. Einfluss der Operonanordnung auf die Assemblierung	94
7. Fazit und Ausblick	97
8. Danksagung	101
A. Parameter	103
A.1. Fallenverteilung	117
A.2. Startkonzentration	117
B. Zusatzmaterial zu Kapitel 2	121
B.1. Euler-Verfahren Population \mathcal{B} und \mathcal{C}	121
B.2. RvD-Methode Population \mathcal{B} und \mathcal{C}	122
C. Zusatzmaterial zu Kapitel 4	125
D. Zusatzmaterial zu Kapitel 5	129
D.1. Abschätzung der Diffusionskonstanten der Proteine	129
D.2. Theoretische Betrachtung – Validierung Modell	131
D.2.1. Gemischte DNA-Bürsten	132
D.3. Dominanz der Assemblierungspfade	134
E. Zusatzmaterial zu Kapitel 6	137
E.1. Abschätzung der Diffusionskonstanten der Proteine	137
E.2. Initiationsrate beeinflusst den Assemblierungsprozess	139
F. Betrachtung der im Modell verwendeten Proteinexpression	141
F.1. Theoretische Betrachtung der Proteinexpression <i>in vitro</i>	141
F.2. Theoretische Betrachtung der Proteinexpression <i>in vivo</i>	142
F.3. Vergleich Proteinexpression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Modell	142
Abkürzungsverzeichnis	xi
Tabellenverzeichnis	xiii
Abbildungsverzeichnis	xv
Literatur	xxix

Symbolverzeichnis

Allgemein

Symbol	Einheit	Bezeichnung
b	μm	Tiefe des Biochips in y-Richtung
$const.$		Konstante
D	$\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	Diffusionskonstante
Erf		Fehlerfunktion
${}_1F_1(d; g; z)$		konfluente hypergeometrische Kummer Funktion [1]
h	μm	Höhe des Biochips in z-Richtung
i		Box-Index
i_{prod}		Box-Index des Erzeugungsortes der Moleküle
$[i = i_{\text{prod}}]$		Iverson-Klammer (engl. <i>Iverson bracket</i>), wenn $i = i_{\text{prod}}$ ist 1 andernfalls 0
j		Bin-Index
k		Zeitschritt-Index
L	μm	Länge des Biochips in x-Richtung
Q		Anzahl der Quellen
N		maximale Anzahl an Boxen
Δt	s	infinitesimal kleiner Zeitschritt
$\Delta x, l$	μm	Länge einer einzelnen Box in x-Richtung
\mathcal{X}		verallgemeinerte Namensbezeichnung der jeweiligen Population

Populationen \mathcal{X}

\mathcal{A}	Population der frei diffundierenden Proteine \mathcal{A}
\mathcal{AB}	Population des Proteinkomplexes \mathcal{AB}

\mathcal{AB}_{co}	Population des Proteinkomplexes nach Freilassung von \mathcal{AnascB} und dessen Faltung – co-translational entstandener Proteinkomplex, der frei in Lösung diffundiert
$\mathcal{AB}_{\text{post}}$	Population des frei in Lösung entstandenen Proteinkomplexes aus frei diffundieren Proteinen \mathcal{A} und \mathcal{B}
\mathcal{AnascB}	Population des Proteinkomplex aus naszierender nascB Kette und Protein \mathcal{A} – Bereich wo bereits Komplexbildung stattfindet
b	Population gebundener Proteine
\mathcal{B}	Population der frei diffundierenden Proteine \mathcal{B}
\mathcal{F}	Population der Fallen (Proteine)
\mathcal{FA}	Population der an Fallen gebundenen \mathcal{A} -Proteine \mathcal{FA}
$\mathcal{F}(\mathcal{AB})$	Population des an Fallen gebundenen \mathcal{AB} -Proteinkomplexes $\mathcal{F}(\mathcal{AB})$
$(\mathcal{FA})\mathcal{B}$	Population der an Fallen $(\mathcal{FA})\mathcal{B}$
nascA	Population der naszierenden Kette des Proteins \mathcal{A}
nascB	Population der naszierenden Kette des Proteins \mathcal{B}
u	Population ungebundener Proteine

Konzentrationen

Symbol	Einheit	Bezeichnung
	M	mol dm^{-3}
$C_{\mathcal{X}}(t)$	μM	Konzentration der Moleküle \mathcal{X}
$C_{i,\mathcal{X}}$	μM	Konzentration der Moleküle der \mathcal{X} in Box i
$C_{i,b}^{\text{max}}$	μM	Fallenkonzentration in Box i: maximal mögliche Konzentration an gebundenen Molekülen in Box i
C_b^{max}	μM	Maximale Fallenkonzentration über alle Boxen; $C_b^{\text{max}} = \max(C_{i,b}^{\text{max}})$
$C_{\text{ges}}(t)$	μM	Gesamtkonzentration der Moleküle
$C_{\text{Comp.possible}}(t)$	μM	größt mögliche Konzentration gebildeten Komplexen

Symbol	Einheit	Bezeichnung
$C_{\text{sol}}(t)$	μM	Die Konzentrationen der <i>lösungsassemblierten</i> Komplexe
$C_{\text{surf}}(t)$	μM	Die Konzentrationen der <i>oberflächenassemblierten</i> Komplexe
$C_{\text{b,Comp}}(t)$	μM	Konzentration der an der oberfläche gebundenen Komplexe – Summe aus <i>oberflächen-</i> $C_{\text{surf}}(t)$ und <i>lösungsassemblierten</i> $C_{\text{sol}}(t)$ Komplexe
$C_{\text{b,Comp}}^{\text{max,mix}}$	μM	maximale Konzentration der an der oberfläche gebundenen Komplexe für den Fall der gemischten DNA-Bürsten

Effizienzen

Symbol	Einheit	Bezeichnung
$f_{\text{b}}(t)$	-	Fallen-Effizienz der gebundenen Moleküle an der Oberfläche; Kapitel 4
$f_{\text{b,Comp}}$	-	Effizienz der an der Oberfläche gebundenen Komplexe; Kapitel 5
$f_{\text{b,A+Comp}}(t)$	-	Effizienz der Bindung der an der Oberfläche: beinhaltet an der Oberfläche gebundene Moleküle \mathcal{A} und gebundene Komplexe; Kapitel 5

Raten

Symbol	Einheit	Bezeichnung
$\alpha_{\mathcal{A}}$	$\mu\text{M s}^{-1}$	Produktionsrate der Proteine \mathcal{A} ; Kapitel 5
$\alpha_{\mathcal{B}}$	$\mu\text{M s}^{-1}$	Produktionsrate der Proteine \mathcal{B} ; Kapitel 5
$\alpha_{\text{ini}}^{\text{nasc}\mathcal{A}}$	$\mu\text{M s}^{-1}$	Erzeugung der naszierenden Kette <i>nasc</i> \mathcal{A} ; Kapitel 6
$\alpha_{\text{ini}}^{\text{nasc}\mathcal{B}}$	$\mu\text{M s}^{-1}$	Erzeugung der naszierenden Kette <i>nasc</i> \mathcal{B} ; Kapitel 6
α_{prod}	$\mu\text{M s}^{-1}$	Produktionsrate von Molekülen; Kapitel 4
$\gamma_{\text{deg}}^{\mathcal{A}}$	s^{-1}	Degradationsrate der Population \mathcal{A} ; Kapitel 6
$\gamma_{\text{deg}}^{\mathcal{B}}$	s^{-1}	Degradationsrate der Population \mathcal{B} ; Kapitel 6
\tilde{D}	s^{-1}	Diffusionsrate $\tilde{D} = \frac{D}{\Delta x^2}$
$\tilde{D}_{\mathcal{X}}$	s^{-1}	Diffusionsrate der Population \mathcal{X}
κ_{bin}	$\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$	Binderate mit der Moleküle an Fallen gebunden werden; Kapitel 4

Symbol	Einheit	Bezeichnung
κ_{co}	$s^{-1} \mu M^{-1}$	Binderate eines frei diffundierenden Proteins \mathcal{A} mit einer noch am Ribosom befindlichen naszierenden Kette $nasc\mathcal{B}$
$\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}}$	$s^{-1} \mu M^{-1}$	Binderate der in Lösung diffundierenden \mathcal{A} an Fallen
$\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{AB}}$	$s^{-1} \mu M^{-1}$	Binderate der in Lösung diffundierenden Komplexe \mathcal{AB} an die Fallen
κ_l	$s^{-1} \mu M^{-1}$	Binderate der frei in Lösung diffundieren \mathcal{A} und \mathcal{B} zu einem frei in Lösung diffundierenden Komplex \mathcal{AB}
κ_o	$s^{-1} \mu M^{-1}$	Binderate der in Lösung diffundierenden \mathcal{B} an bereits an der Oberfläche gebundene Proteine \mathcal{A}
κ_{post}	$s^{-1} \mu M^{-1}$	Binderate der diffundieren Porteinuntereinheiten in Lösung
$\omega_{term}^{nasc\mathcal{A}}$	s^{-1}	Freilassungsrate der naszierenden Kette $nasc\mathcal{A}$ zu einem fertigen Protein \mathcal{A} ; Kapitel 6
$\omega_{term}^{nasc\mathcal{B}}$	s^{-1}	Freilassungsrate der naszierenden Kette $nasc\mathcal{B}$ zu einem fertigen Protein \mathcal{B} ; Kapitel 6

Kapitel 1

Einleitung

Proteine sind die Hauptbestandteile jedes lebenden Organismus und werden zur Steuerung und Umsetzung verschiedenster Prozesse in der Zelle benötigt [2]. Einige dieser Prozesse – wie z. B. Zellbewegung [3], [4], Zellteilung [5], [6], Zellzyklusregulierung [7], Stofftransport [8], [9] oder Metabolismus [10, Kapitel 3, S. 128], [11] – sind essentiell für das Überleben der Zelle. Biomoleküle wie Peptide [12]–[20], Nukleinsäuren [21]–[26], Polysacchariden [14], [27], [28] inspirieren und werden genutzt für den Bau von künstlichen Nanogeräten, die interessante Eigenschaften wie Biokompatibilität, Reiz-Reaktionsfähigkeit [29] und Selbstmontage [30] besitzen, was zu vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten im Biotechnologiebereich führt [31]. So können Proteine potentiell als Nanomaschinen, Nanosensoren oder als Abgabesystem für Medikamente dienen.

Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaut, wobei die Information für ihre Synthese in den Genen eines jeden Organismus codiert sind [32]. Durch die Verknüpfung von Aminosäuren entstehen lineare Ketten, die nach ihrer Faltung zu funktionalen Proteinen werden. Um ihre Aufgaben in der Zelle oder in biotechnologischen Anwendungen übernehmen zu können, müssen sich oftmals einzelne Proteine zu Proteinkomplexen zusammenfinden. Diese einzelnen Proteine werden in der folgenden Arbeit als Proteinuntereinheiten bezeichnet, um zu verdeutlichen, dass es sich um einen Teil des Proteinkomplexes handelt. Die Komplexbildung ist ein bemerkenswert effizienter Prozess [33], der im dicht gepackten (engl. *crowded*) Zellinneren stattfindet. Ein bekanntes Beispiel für die Proteinkomplexbildung ist der präzise und effiziente Aufbau des *T4-Phagen* (Abbildung 1.1). Dieses Bakterienvirus besitzt einen Kopf und einen Schwanz, wobei allein der Schwanz aus 500 Polypeptidketten besteht, die wiederum das Produkt 22 verschiedener Gene sind

1. Einleitung

[34]. Trotz dieser Komplexität existieren schon 25 Minuten nach der Infektion eines *Escherichia-coli*-Bakteriums (*E. coli*) mit einem *T4-Phagen* bereits 300 neue Kopien dieses Virus [35]. Die Gründe für die hohe Effizienz der Proteinkomplexbildung sind bisher nicht gut verstanden und Gegenstand aktueller Forschung [36]–[38].

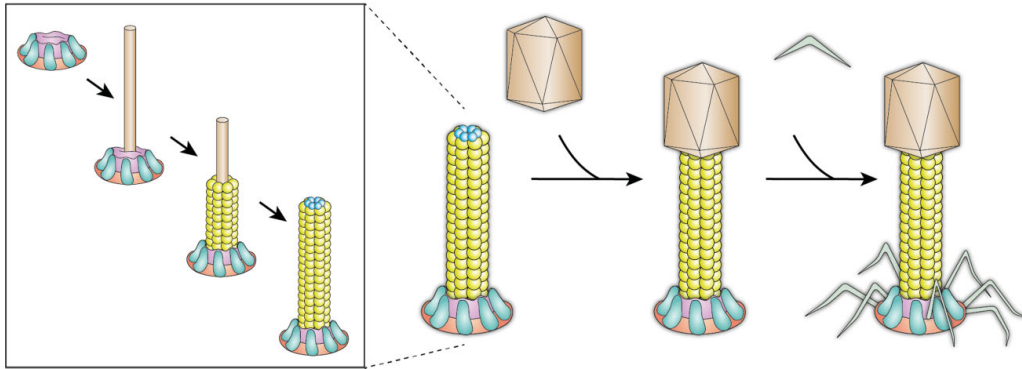


Abbildung 1.1.: Schematische Darstellung des *T4-Phagen* [39]. Der *T4-Phage* besteht grob aus einem Kopf (braun) und einem Schwanz. Der Schwanz wird eingeteilt in Schwanzstück (gelb), Grundplatte (keilförmige cyanblaue, orange Bereiche) und Schwanzfasern (grau).

Die Assemblierung zu einem Multiproteinkomplex wird in Lehrbüchern oft so dargestellt, dass sie erst nach der Proteinsynthese (post-translational) stattfindet [40]. Aufgrund der dicht gepackten Zellumgebung befinden sich die nach der Synthese frei beweglichen Proteinuntereinheiten im ständigen Kontakt mit anderen Makromolekülen, wodurch ein Wettbewerb um Bindepartner entsteht, welcher die post-translationalen Komplexbildung ineffizient erscheinen lässt. Bereits 1960 wurden biochemisch bei Enzymen in Prokaryoten erste Hinweise darauf gefunden, dass die Assemblierung von Proteinen ebenfalls während der Proteinsynthese (co-translational) stattfinden kann [36], [41], [42]. Diese Beobachtungen bezogen sich im speziellen auf Proteinkomplexe, die sich aus identischen Proteinuntereinheiten (Homomere) zusammensetzten. Neuste Erkenntnisse zeigen die Möglichkeit co-translationaler Komplexbildung zwischen unterschiedlichen Proteinuntereinheiten (Heteromere) [36], [43]–[47]. Obwohl es verschiedene Techniken gibt, die Interaktion von Proteinen zu untersuchen [48], ist die detaillierte Analyse der Komplexbildung experimentell schwierig, insbesondere in Bezug auf Effizienz und Wirksamkeit [36]. 2015 gelang es unseren Kooperationspartner Günter Kramer und seinen Mitarbeiter*innen (Universität Heidelberg) erstmals mit Hilfe einer kombinierten Methode aus *Selective Ribosome Profiling* (SeRP) und Immunopurifikation (IP) die co-translationalen Assemblierung des bakteriellen Luciferasekomplexes direkt

zu beobachten [49]. Durch die Trennung der codierenden Operone gewannen Shieh u. a. [49] erste Erkenntnisse über die Effizienz der Komplexbildung in Abhängigkeit vom Abstand der Syntheseorte. Sie konnten durch Fluoreszenzmessungen herausfinden, dass sich die Luciferaseaktivität mit der Erhöhung des Abstands um 40% verringert. Experimentelle Untersuchungen mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zeigten, dass sich die gebildeten Komplexe in der Nähe der entsprechenden Proteinsyntheseorte aufhielten. Deshalb erscheint es naheliegend zu vermuten, dass die Komplexbildung co-translational erfolgt und dadurch effizienter ist. Eine Bestimmung der Anzahl der co-translational assemblierten Komplexe in Abhängigkeit vom Abstand der Syntheseorte konnte bislang noch nicht experimentell erfolgen. Ein direkter Beweis, dass die co-translationale Komplexbildung bei dicht beieinanderliegenden Syntheseorten für eine höhere Effizienz der Komplexbildung verantwortlich ist, steht somit noch aus.

Um die Proteinkomplexbildung besser verstehen zu können, bietet es sich an, den Prozess möglichst weit zu vereinfachen und diesen außerhalb der Zelle *in vitro* (*in vitro*) zu untersuchen. Experimente mit zellfreien Proteinsynthesen in Eintopfreaktionslösungen [50]–[53] geben Aufschluss über die Assemblierungsreihenfolge und die Stöchiometrie der Proteinuntereinheiten [54]. Für stark exprimierte Proteine können zudem mögliche Assemblierungspfade aus der bekannten dreidimensionalen Struktur der Komplexe vorhergesagt werden [37], [55], [56]. Diese Methoden geben jedoch keinen Aufschluss darüber, welche Faktoren die Assemblierung effizient machen oder wo sich die meisten Komplexe in der Zelle bilden. Der Einsatz neuer experimenteller Methoden wie Hochgeschwindigkeits-Rasterkraftmikroskopie in Kombination mit maschinellem Lernen erlaubt ein tiefes Verständnis der Assemblierung von Proteinen zu einem Proteinkomplex an der Oberfläche oder in Lösung [preprint 57, 58]. Dieses Verfahren erlaubt eine dynamische Betrachtung des Systems. Es ist allerdings sehr zeitaufwendig, da nur wenige Proteinkomplexe beobachtet werden können. Zeitgleich haben unsere Kooperationspartner Roy Bar-Ziv und seine Mitarbeiter*innen vom Weizmann-Institut in Rehovot (Israel) ein *in-vitro*-Setup entwickelt, das sich durch eine lokalisierte Proteinsynthese und die anschließende Beobachtung der Verteilung der assemblierten Proteinkomplexe von anderen Experimenten unterscheidet. Zudem können zeitgleich mehrere Experimente in einem einzigen Setup stattfinden. Die Messung der Verteilung der Proteinkomplexe erfolgt hierbei jedoch nur zu einem festen Zeitpunkt. Die Dynamik und die Pfade der Assemblierung sind mit diesen Experimenten nicht beobachtbar. Hier setzt

die vorliegende Arbeit an: Die Experimente unserer Kooperationspartner werden *in silico* modelliert, um aufklären zu können, welche Assemblierungspfade die Proteinkomplexbildung *in vivo* und *in vitro* dominieren. Außerdem wird in dieser Arbeit der Einfluss verschiedener physikalischer Parameter auf die Komplexbildung untersucht.

1.1. Biologie der Proteinsynthese

Die Informationen des Bauplans für die Bildung von Proteinen in der Zelle sind auf Abschnitten (Genen) der Desoxyribonukleinsäure (DNA) gespeichert. Dabei dienen die Gene als Vorlage funktioneller Genprodukte (*gp*), wie Proteinen und Ribonukleinsäuren (RNA). Laut dem Zentralen Dogma der Biologie erfolgt die Neubildung eines Proteins mittels der sequentiellen Übertragungsprozesse Transkription und Translation: Bei der **Transkription** werden unter Verwendung der DNA als Matrize RNA-Moleküle synthetisiert. Die zelluläre DNA besteht aus vier verschiedenen Arten von Nukleotiden, deren sequentielle Abfolge die genetische Information codiert. Der erste Schritt der Transkription beginnt mit der Bindung des Enzyms RNA-Polymerase (RNAP) an die als Promotor bezeichnete Region des entsprechenden DNA-Abschnittes. Die RNA-Polymerase verbindet schrittweise einzelne Nukleotide, die zum gelesenen DNA-Strang komplementär sind, wodurch die so entstandene messenger RNA (mRNA) eine Kopie der Informationen des DNA-Stranges darstellt.

Proteine sind Molekülketten, die aus 20 verschiedenen Arten von Aminosäuren aufgebaut sind. Die Übertragung der Nukleotidsequenz einer mRNA in eine Kette von Aminosäuren wird als **Translation** bezeichnet. Hierbei codiert jedes Triplet von Nukleotiden (Codon) genau eine Aminosäure. Das Auslesen der Codons erfolgt durch Ribosomen – makromolekulare Komplexe aus ribosomaler RNA (rRNA) und ribosomalen Proteinen – und den Aminosäuretragenden transfer-RNAs (tRNA). Das Ribosom liest die mRNA Codon für Codon und katalysiert die schrittweise Bindung der entsprechenden Aminosäuren zu einer Polypeptidkette. Das Anwachsen der Polypeptidkette führt zu deren Herauswinden aus einem spezifischen Ausgangstunnel des Ribosomes (ribosomaler Exittunnel). Diese naszierende Kette wächst weiter an, bis das Ribosom das sogenannte Stopcodon (auch Terminationscodon) erreicht und das Freilassen der Polypeptidkette erfolgt. Bereits während der

Translation kann sich die Polypeptidkette beginnen zu falten, bevor sie nach ihrer Freilassung ihre definierte dreidimensionale Struktur annimmt, und als Protein ihre Funktion in der Zelle erfüllt.

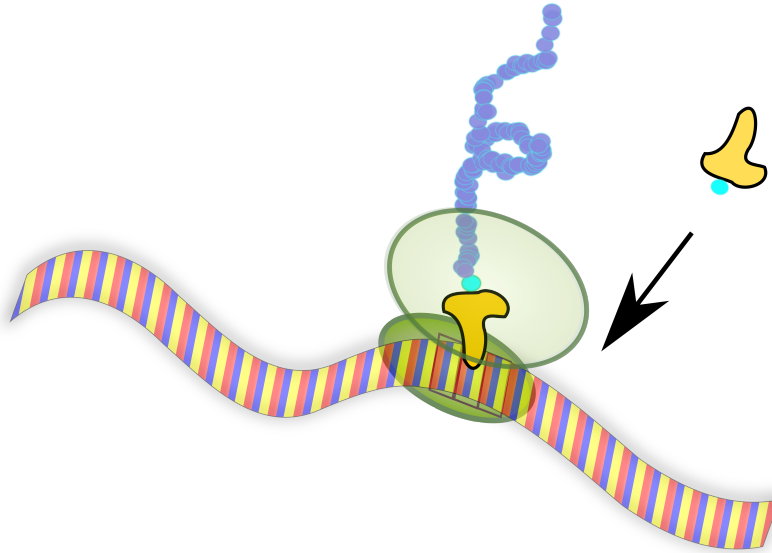


Abbildung 1.2.: Translation der mRNA durch ein Ribosom. Das Ribosom bewegt sich Codon für Codon (dreifarbig: rot, blau, gelb) entlang der mRNA (bunte Linie). Mit jedem Schritt wird eine neue Aminosäure (cyanblau) an die naszierende Polypeptidkette (blaue Kugelkette) gebunden. Der Transport der neuen Aminosäuren an das Ribosom geschieht mittels einer tRNA (orange), die ein zum Codon passendes Anticodon besitzt.

Proteinassamblierung

Das Funktionsspektrum von Proteinen kann erweitert werden durch den Zusammenschluss zweier oder mehrerer assoziierten Polypeptidketten, zu sogenannten Proteinkomplexen [10, S. 115]. Durch diesen Zusammenschluss können supramolekulare Strukturen wie z.B. Proteinfilamente oder Komponenten von Viren entstehen. Proteinkomplexe werden nicht durch ein einzelnes langes Gen codiert, sondern durch mehrere kürzere Gene [59]. Speziell bei Prokaryoten wird eine Gruppe von kurzen Genen, die molekulare Komplexe bilden oder auf einem biochemischen Weg zusammenwirken, oft zu sogenannten Operonen zusammengefasst [60]. Die daraus durch Transkription entstandene mRNA wird als polycistronische mRNA bezeichnet, wohingegen mRNA, die ein einzelnes Protein codiert als monocistronische mRNA bezeichnet wird. Die Verwendung von kurzen Genen bringt viele Vorteile mit sich:

- Die für die Proteinsynthese benötigte Zeit wird verkürzt im Vergleich zu langen Genen.
- Transkriptions- und Translationsfehler werden dadurch minimiert [10, S. 118], [61].
- Die Aufteilung der Informationen auf mehrere Gene ermöglicht eine größere Kombinationsvielfalt, was dazu führt, dass in der Zelle weniger Gene benötigt werden um unterschiedliche Proteinkomplexe zu erzeugen [10, S. 115].
- Bei einer Fehlfaltung muss nicht der gesamte Proteinkomplex neu synthetisiert werden, sondern lediglich die fehlgefaltete Proteinuntereinheit.

1.2. Reaktionsdiffusionssysteme

Reaktionsdiffusionssysteme beschreiben die lokale Reaktion von Stoffen und deren Verteilungen im Raum mittels Diffusion. Diese Systeme lassen sich auf verschiedenste Phänomene in der Biologie anwenden. Reaktions-Diffusions-Gleichungssysteme bestehen aus einem reaktiven und einem diffusiven Anteil. Im Folgenden werden beide Anteile getrennt voneinander betrachtet. Die Zusammenführung zu einem Reaktionsdiffusionssystem erfolgt durch die Addition der diffusiven und reaktiven Terme (Gleichungen (2.2) bis (2.4)). Die Erweiterung und Anwendung eines Reaktionsdiffusionssystems erfolgt in den Abschnitten 4.2, 4.3, 5.1 und 6.1.

1.2.1. Diffusion

Diffusion ist ein physikalischer Prozess, der zur vollständigen Vermischung von zwei oder mehreren Stoffen führt [62]. Der Ursprung dieses Prozesses kann beschrieben werden durch die Brownsche Molekularbewegung. In dieser mikroskopischen Betrachtungsweise des Systems werden in einer Flüssigkeit suspendierte Teilchen beschrieben, die eine Zufallsbewegung vollführen. Diese Zufallsbewegung entsteht durch Kollisionen der Flüssigkeitsmoleküle mit den suspendierten Teilchen [63], [64]. Die suspendierten Partikel können z.B. Atome, Ladungsträger oder Moleküle sein. Bei einer räumlich inhomogenen Verteilung dieser Partikel entsteht ein Konzentrationsgradient. Durch diesen entsteht eine effektive Bewegung der Teilchen aus den Bereichen mit hoher Konzentration in Bereiche geringer Konzentra-

tion. Dies wird in der makroskopischen Betrachtungsweise als Stofftransport interpretiert. Der Stofftransport wird in dieser Arbeit durch die eindimensionale Diffusionsgleichung ausgedrückt:

$$\frac{\partial C(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x, t)}{\partial x^2}, \quad (1.1)$$

wobei die Konzentration $C(x, t)$ der suspendierten Teilchen am Ort x zur Zeit t ist und D die Diffusionskonstante der Teilchen bezeichnet. Für eine stark lokalisierte Anfangskonzentration hat die Diffusionsgleichung folgende Lösung [32, S. 497]:

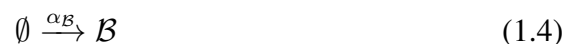
$$C(x, t) = \frac{C_0}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-x^2/(4Dt)}, \quad (1.2)$$

wobei C_0 die Konzentration zum Zeitpunkt $t = 0$ in einer infinitesimal kleinen Region um $x = 0$ darstellt. Gleichung (1.2) beschreibt, wie sich die lokalisierte Anfangskonzentration mit der Zeit und in Abhängigkeit vom Ort entwickelt, nämlich zeitabhängige Gaußverteilung.

1.2.2. Bimolekulare Elementarreaktion

Die grundlegendsten Reaktionen sind unimolekulare ($A \rightarrow P$) und bimolekulare Elementarreaktionen ($A + B \rightarrow P$) [62]. Hierbei entsteht aus einem (unimolekular) oder zwei (bimolekular) Reaktanten ein Produkt (P) in einem einzelnen Reaktionsschritt. Das Produkt kann über eine Rückreaktion in die Ausgangsstoffe zerfallen. Das System ist im chemischen Gleichgewicht, wenn die Raten für Rückreaktion und Produktbildung gleich sind.

Im Folgenden wird die zeitliche Änderung der Konzentrationen, der an einer bimolekularen Elementarreaktion mit Rückreaktion beteiligten Reaktanten und deren Erzeugung untersucht, die dem folgenden Reaktionsschema entsprechen:



1. Einleitung

Hierbei werden die Reaktanten \mathcal{A} und \mathcal{B} mit einer konstanten Rate $\alpha_{\mathcal{A}}$ bzw. $\alpha_{\mathcal{B}}$ erzeugt. Sowohl die Binderatenkonstante κ_{on} als auch die Konzentration von \mathcal{A} und \mathcal{B} bestimmen die Schnelligkeit der Bildung des Produktes \mathcal{C} . Die konstante Dissoziationsrate κ_{off} und die Konzentration von \mathcal{C} hingegen sind maßgebend für die Geschwindigkeit der Rückreaktion zu den Ausgangsstoffen. Die Konzentrationen sind nur von t abhängig und ihr Zeitentwicklung lässt sich mit folgenden Differentialgleichungen erster Ordnung

$$\frac{\partial C_{\mathcal{A}}}{\partial t} = -\kappa_{\text{on}}C_{\mathcal{A}}C_{\mathcal{B}} + \kappa_{\text{off}}C_{\mathcal{C}} + \alpha_{\mathcal{A}}, \quad (1.6)$$

$$\frac{\partial C_{\mathcal{B}}}{\partial t} = -\kappa_{\text{on}}C_{\mathcal{A}}C_{\mathcal{B}} + \kappa_{\text{off}}C_{\mathcal{C}} + \alpha_{\mathcal{B}}, \quad (1.7)$$

$$\frac{\partial C_{\mathcal{C}}}{\partial t} = \kappa_{\text{on}}C_{\mathcal{A}}C_{\mathcal{B}} - \kappa_{\text{off}}C_{\mathcal{C}}, \quad (1.8)$$

und den Anfangsbedingungen

$$C_{\mathcal{A}}(t = 0) = C_{\mathcal{A}_0} \quad (1.9)$$

$$C_{\mathcal{B}}(t = 0) = C_{\mathcal{B}_0} \quad (1.10)$$

$$C_{\mathcal{C}}(t = 0) = C_{\mathcal{C}_0} \quad (1.11)$$

beschreiben. Mit Hilfe der Anfangsbedingungen lässt sich das Differentialgleichungssystem (1.6) bis (1.8) zu einer Gleichung vereinfachen:

$$\begin{aligned} \frac{\partial C_{\mathcal{A}}}{\partial t} = & -\kappa_{\text{on}}C_{\mathcal{A}}(C_{\mathcal{B}_0} - C_{\mathcal{A}_0} + C_{\mathcal{A}} - \alpha_{\mathcal{A}} \cdot t + \alpha_{\mathcal{B}} \cdot t) \\ & + \kappa_{\text{off}}(C_{\mathcal{A}_0} + C_{\mathcal{C}_0} - C_{\mathcal{A}} + \alpha_{\mathcal{A}} \cdot t) + \alpha_{\mathcal{A}}. \end{aligned} \quad (1.12)$$

Aus Gleichung (1.12) ergibt sich die zeitliche Abhängigkeit der Konzentration von Reaktant \mathcal{A} . Die Berechnung der Konzentrationen der Population \mathcal{B} und \mathcal{C} erfolgt über folgende Gleichungen:

$$C_{\mathcal{B}} = C_{\mathcal{B}_0} - C_{\mathcal{A}_0} + C_{\mathcal{A}} - \alpha_{\mathcal{A}}t + \alpha_{\mathcal{B}}t \quad (1.13)$$

$$C_{\mathcal{C}} = C_{\mathcal{A}_0} + C_{\mathcal{C}_0} - C_{\mathcal{A}} + \alpha_{\mathcal{A}}t. \quad (1.14)$$

Das Differentialgleichungssystem wurde analytisch mittels *Mathematica*[®] gelöst. Auf Grund der Komplexität der allgemeinen Lösung werden die Lösungen für zwei Spezialfälle – mit und ohne Reaktantenerzeugung – betrachtet:

1. Ein in der Literatur bekanntes Beispiel ist der Fall, wenn keine Reaktanten erzeugt werden, d. h. $\alpha_A = \alpha_B = 0$, und von einer Anfangskonzentration der Reaktanten ausgegangen wird [65]. Mit $C_{B_0} = \frac{1}{2}C_{A_0}$, $\kappa_{\text{off}} \rightarrow 0$ ergibt sich folgende Lösung für $C_A(t)$:

$$C_A(t) = \frac{C_{A_0} e^{\frac{C_{A_0} \kappa_{\text{on}}}{2} t}}{-1 + 2e^{\frac{C_{A_0} \kappa_{\text{on}}}{2} t}}, \quad (1.15)$$

die für $C_{A_0} = 5 \mu\text{M}$, $C_{C_0} = 0 \mu\text{M}$ in Abbildung 1.3 b dargestellt ist. Zu Beginn (von 0 bis 440 s) ist eine transiente Phase zu beobachten. Für lange Zeiten entsteht ein stationärer Zustand.

2. Unter Einbezug der Reaktantenerzeugung ohne Anfangskonzentration der Reaktanten $C_{A_0} = C_{B_0} = C_{C_0} = 0$, $\kappa_{\text{off}} \rightarrow 0$ ergibt sich für das System folgende Lösung $C_A(t)$

$$C_A(t) = \alpha_A t \cdot \frac{{}_1F_1\left(1 + \frac{\alpha_A}{2\alpha_A - 2\alpha_B}; \frac{3}{2}; \frac{1}{2}(\alpha_A - \alpha_B)\kappa_{\text{on}}t^2\right)}{{}_1F_1\left(\frac{\alpha_A}{2\alpha_A - 2\alpha_B}; \frac{1}{2}; \frac{1}{2}(\alpha_A - \alpha_B)\kappa_{\text{on}}t^2\right)} \quad (1.16)$$

Die Funktion ${}_1F_1(d; g; z)$ ist die konfluente hypergeometrische Kummer Funktion [1]. Dieser Fall ist für die Werte $\alpha_A = 1 \cdot 10^{-1} \mu\text{M s}^{-1}$, $\alpha_B = \frac{1}{2}\alpha_A$, $\kappa_{\text{on}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ in Abbildung 1.3 a dargestellt. Im Bereich kurzer Zeiten (0 bis 200) s befindet sich dieses System in einer Transientenphase für längere Zeiten geht es in einen quasistationären Zustand über. Die Lösung solcher Systeme ist bereits für dieses vereinfachte System komplex.

Dieser Fall ist für das Thema dieser Arbeit interessant, weil wir uns mit der Erzeugung von Proteinen (Reaktanten) und dessen Bildung zu einem Komplex (Produkt) beschäftigen werden.

Die numerische Lösung eines solchen vereinfachten Systems wird unter Einbezug der Diffusion in Kapitel 2, Gleichungen (2.2) bis (2.4) betrachtet.

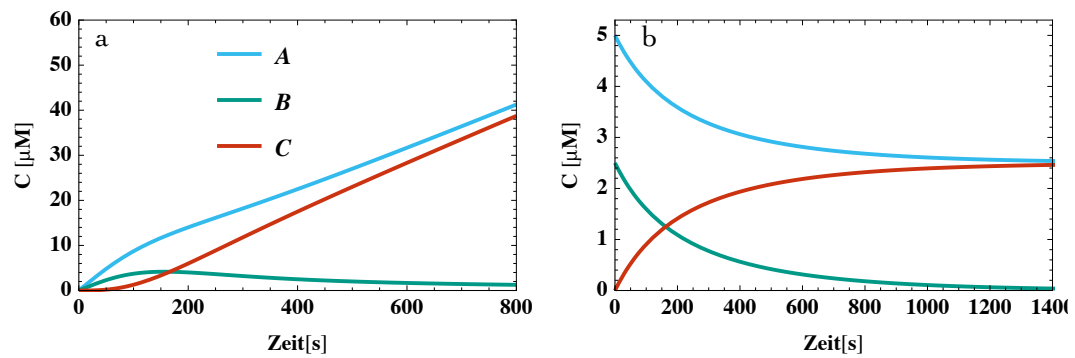


Abbildung 1.3.: Reaktion der Reaktanten \mathcal{A} und \mathcal{B} zu Produkt \mathcal{C} . (a) Konstante Produktion von Reaktanten \mathcal{A} und \mathcal{B} , wobei $\alpha_{\mathcal{A}} = 0.1 \mu\text{M s}^{-1}$, $\alpha_{\mathcal{B}} = \frac{1}{2}\alpha_{\mathcal{A}}$ und die Anfangskonzentrationen $C_{\mathcal{A}_0} = C_{\mathcal{B}_0} = C_{\mathcal{C}_0} = 0 \mu\text{M}$, (b) keine Produktion der Reaktanten ($\alpha_{\mathcal{B}} = \alpha_{\mathcal{A}} = 0 \mu\text{M s}^{-1}$) mit Anfangskonzentrationen $C_{\mathcal{A}_0} = 5 \mu\text{M}$ und $C_{\mathcal{B}_0} = 1/2 \cdot C_{\mathcal{A}_0}$. Weitere Parameter siehe Anhang Tabelle A.5.

Kapitel 2

Numerische Methoden

Zur Lösung von Differentialgleichungen existiert eine Vielzahl numerischer Verfahren. Hierbei unterscheidet man zwischen expliziten und impliziten Zeitschrittverfahren sowie Ein- bzw. Mehrschrittverfahren [66]. Zu den bekanntesten Einschrittverfahren zählen die Euler-, Heun- und Runge-Kutta-Verfahren, und zu den Mehrschrittverfahren die Adams- und BDF-Verfahren (Rückwärts-Differentiationsformeln, engl. *backward differentiation formulas*) [67]. Im Folgenden stelle ich zwei verschiedene Einschrittverfahren vor, das explizite Eulervorwärtsverfahren und die für diese Arbeit entwickelte Methode (Reaktion-verlangsamt-Diffusion (RvD)).

Zunächst werden beide Verfahren erläutert und anschließend miteinander verglichen. Für den Vergleich dient das Beispielsystem, welches in Abschnitt 1.2.2 bereits analytisch mit *Mathematica*[®] gelöst wurde, hier durch eine Diffusion der Moleküle erweitert wird und somit einen Reaktionsdiffusionsprozess beschreibt.

In einem bimolekularen Reaktionsdiffusionssystem reagieren die Moleküle \mathcal{A} und \mathcal{B} durch Bindung zu Komplexen \mathcal{C} . Im Gegensatz zu dem Reaktionssystem in Abschnitt 1.2.2 sind hier die Moleküle \mathcal{A} und \mathcal{B} nicht mehr homogen im Ort verteilt. Die Ungleichverteilung entsteht durch eine lokalisierte Erzeugung der Moleküle \mathcal{A} und \mathcal{B} mit einer konstanten Rate $\alpha_{\text{prod}_\mathcal{A}}$ und $\alpha_{\text{prod}_\mathcal{B}}$. Die erzeugten Moleküle \mathcal{A} , \mathcal{B} und \mathcal{C} diffundieren frei in der Lösung mit den Diffusionskonstante $D_\mathcal{A}$, $D_\mathcal{B}$ und $D_\mathcal{C}$. Sobald sich die Konzentrationen von \mathcal{A} und \mathcal{B} räumlich überlappen, entstehen Komplexe \mathcal{C} mit der Binderatenkonstante κ_{bin} . Die Assoziation der Reaktanten soll als sehr stark angenommen werden im Vergleich zur Dissoziation, sodass die Dissoziation hier vernachlässigt wird. Die Bindung ist somit irreversibel.



Dieses System lässt sich in einer Dimension x mit kontinuierlicher Zeit t als durch das Differentialgleichungssystem

$$\frac{\partial a(x, t)}{\partial t} = D_{\mathcal{A}} \frac{\partial^2 a(x, t)}{\partial x^2} - \kappa_{\text{bin}} a(x, t) b(x, t) + \alpha_{\mathcal{A}}(x) \quad (2.2)$$

$$\frac{\partial b(x, t)}{\partial t} = D_{\mathcal{B}} \frac{\partial^2 b(x, t)}{\partial x^2} - \kappa_{\text{bin}} a(x, t) b(x, t) + \alpha_{\mathcal{B}}(x) \quad (2.3)$$

$$\frac{\partial c(x, t)}{\partial t} = D_{\mathcal{C}} \frac{\partial^2 c(x, t)}{\partial x^2} + \kappa_{\text{bin}} a(x, t) b(x, t) \quad (2.4)$$

beschreiben, wobei die Konzentrationen $a(x, t)$, $b(x, t)$, $c(x, t)$ von \mathcal{A} , \mathcal{B} , \mathcal{C} jetzt von der Zeit und vom Ort abhängen.

2.1. Explizites Eulervorwärtsverfahren

Das Differentialgleichungssystem (2.2) bis (2.4) soll für gegebene Anfangsbedingungen mit Hilfe des expliziten Eulervorwärtsverfahrens gelöst werden. Dafür werden Ort und Zeit in Bins $j = 1, 2, \dots, N$ respektive Zeitschritte $k = 1, 2, \dots, M$ diskretisiert. Ein Zeitschritt entspricht einer zeitlichen Änderung von Δt . Der Ort wird in Ortsinkremente Δx eingeteilt. Bei einem fest vorgegebenen Ortsinkrement, muss der Zeitschritt Δt klein genug gewählt werden, damit das Verfahren numerisch stabil bleibt. Die Approximation aller Ableitungen erfolgt durch die Finite-Differenzen-Methode (FDM) und wird mittels Taylorentwicklung bis zu Termen 1. Ordnung für die Zeit und zu Termen 3. Ordnung für den Ort hergeleitet [68], [66, S. 101-106].

Der Übergang vom kontinuierlichen System (2.2) bis (2.4) zu einem orts- und zeitdiskreten System erlaubt eine effektive numerische Lösung dieses Beispielproblems. Die Konzentration der Population \mathcal{X} in Bin j zum Zeitpunkt k ist x_j^k . Die Erzeugung solcher Moleküle \mathcal{X} findet lokal begrenzt nur in den Quellen in den Bins $j = j_{\text{prod}_{\mathcal{X}}}$ ¹ statt. Nur hier kommt es zu einer Produktion der Moleküle mit einer Rate $\alpha_{\text{prod}_{\mathcal{X}}}$. Der Bereich der Quellen lässt sich symbolisch durch die Iverson-Klammer (engl. *Iverson bracket*) $[j = j_{\text{prod}_{\mathcal{X}}}]$ kennzeichnen. Befindet sich in Bin j

¹ $j_{\text{prod}_{\mathcal{X}}} = \{\text{Bins mit Erzeugung von Molekülen}\}$

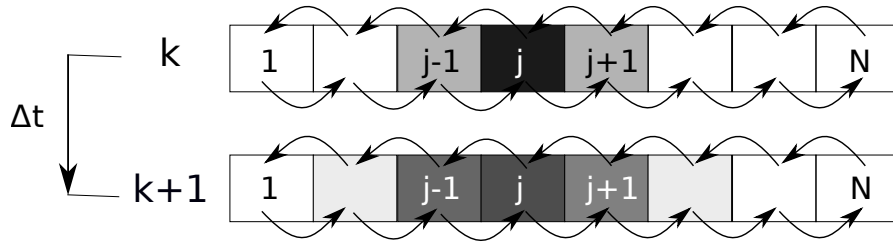


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung der Diskretisierung im Ort und in der Zeit. Änderung der Konzentration einer Population vom Zeitschritt k zum Zeitschritt $k+1$ unter der Annahme einer Ungleichverteilung der Moleküle nach k Zeitschritten. Die Graustufen beschreiben die Konzentration in den entsprechenden Bereichen, je dunkler das Grau desto höher ist die Konzentration der Moleküle. Eine Diffusion ist nur in benachbarte Bins möglich (geschwungene Pfeile). Zwischen den Zeitschritten vergeht eine kleine Zeitdifferenz Δt . Die Berechnung der neuen Konzentrationen zum Zeitpunkt $k+1$ erfolgt durch ein explizites Verfahren und somit über die bekannte Konzentration zum Zeitpunkt k (Richtung des geraden Pfeils).

eine Quelle für die Erzeugung neuer Proteine ergibt sich für $[j = j_{\text{prod}_A}] = 1$ und andernfalls 0. Somit ergibt sich für die Zeitentwicklung der Konzentration a :

$$\frac{a_j^{k+1} - a_j^k}{\Delta t} = D_A \frac{a_{j-1}^k - 2a_j^k + a_{j+1}^k}{(\Delta x)^2} - \kappa_{\text{bin}} a_j^k b_j^k + \alpha_{\text{prod}_A} [j = j_{\text{prod}_A}] \quad (2.5)$$

$$\begin{aligned} \Rightarrow a_j^{k+1} &= \Delta t D_A \frac{a_{j-1}^k - 2a_j^k + a_{j+1}^k}{(\Delta x)^2} - \Delta t \kappa_{\text{bin}} a_j^k b_j^k \\ &\quad + \Delta t \alpha_{\text{prod}_A} [j = j_{\text{prod}_A}] + a_j^k. \end{aligned} \quad (2.6)$$

Durch Zusammenfassen der konstanten Terme zu

$$\begin{aligned} s &= \frac{D_A \Delta t}{(\Delta x)^2}, \\ z &= \kappa_{\text{bin}} \Delta t, \\ p &= \alpha_{\text{prod}_A} \Delta t, \\ p [j = j_{\text{prod}_A}] &= p_{j=j_{\text{prod}_A}} \end{aligned} \quad (2.7)$$

vereinfacht sich der Zusammenhang für alle Bins $j = 2, \dots, N-1$ zu:

$$a_j^{k+1} = (1 - 2s - z b_j^k) a_j^k + s a_{j-1}^k + s a_{j+1}^k + p_{j=j_{\text{prod}_A}}. \quad (2.8)$$

Die Konzentration der Moleküle \mathcal{A} nach $k + 1$ Zeitschritten in jedem Bin kann in ihrer Gesamtheit durch eine Matrix ausgedrückt werden:

$$\begin{pmatrix} a_1^{k+1} \\ \vdots \\ a_j^{k+1} \\ \vdots \\ a_N^{k+1} \end{pmatrix} = \Lambda_{\mathbf{A}} \begin{pmatrix} a_1^k \\ \vdots \\ a_j^k \\ \vdots \\ a_N^k \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} p_{1=j_{\text{prod},\mathcal{A}}} \\ \vdots \\ p_{j=j_{\text{prod},\mathcal{A}}} \\ \vdots \\ p_{N=j_{\text{prod},\mathcal{A}}} \end{pmatrix}, \text{ wobei} \quad (2.9)$$

$$\Lambda_{\mathbf{A}} = \begin{bmatrix} 1 - s - z \cdot b_1^k & s & & & & & 0 \\ s & & & & & & \\ & & s & 1 - 2s - z \cdot b_j^k & s & & \\ & & & & & & \\ 0 & & & & & & \\ & & & & & s & \\ & & & & s & & 1 - s - z \cdot b_N^k \end{bmatrix}. \quad (2.10)$$

Analog lassen sich die Konzentrationen der Moleküle \mathcal{B} und \mathcal{C} bestimmen (im Anhang B.1). Hierbei ist zu beachten, dass sich die Werte von s und p je nach Diffusionskonstante D und Produktionsrate α_{prod} unterscheiden können.

2.2. Reaktion-verlangsam-Diffusion-Methode

Die Reaktion-verlangsam-Diffusion-Methode (RvD) löst, wie das Euler-Verfahren, ein Reaktionsdiffusionssystem mit bekannten Anfangsbedingungen numerisch mit Hilfe einer Diskretisierung in Ort und Zeit. Der Ort wird in Bins² von $j = 1, 2, \dots, N$ und die Zeit in Zeitschritte von $k = 1, 2, \dots, M$ eingeteilt. Die Konzentrationen der \mathcal{A} und \mathcal{B} Moleküle zum Zeitpunkt k und in Bin j werden mit a_j^k und b_j^k bezeichnet. Für Moleküle der Population \mathcal{A} in Bin j gibt es drei mögliche Prozesse: (1) Diffusion in die Nachbarbins $j - 1$ und $j + 1$, (2) Bindung mit den \mathcal{B} -Molekülen in Bin j und (3) in Bin j zu verweilen, ohne dass eine Reaktion passiert. Innerhalb des Zeitschritts von k nach $k + 1$ werden die in j vorhandenen \mathcal{A} -Moleküle anteilig diese drei Möglichkeiten ausführen, mit Anteilen $f_{j,\mathcal{A}}^k$.

²Ab Abschnitt 4.2 wird der Begriff Bins durch Boxen ersetzt.

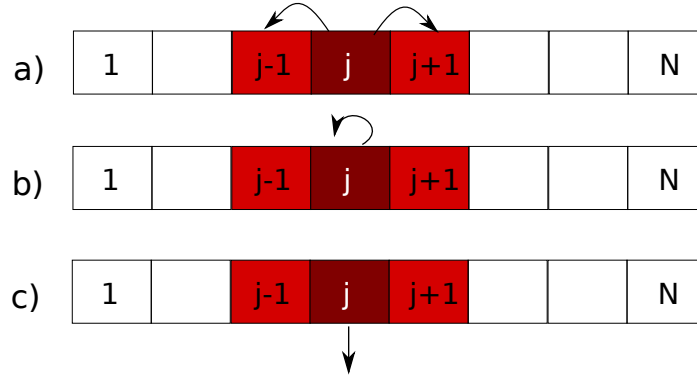


Abbildung 2.2.: Schematische Darstellung der möglichen Änderung der Konzentration der Population \mathcal{A} in Bin j . (a) Eine Diffusion ist nur aus Bin j in benachbarte Bins möglich (b) Verweilen in Bin j , ohne dass eine Aktion passiert. (c) Anteiliger Verlust $f_{j,\text{reac},\mathcal{A}}^k$ durch Reaktion mit \mathcal{B} -Molekülen.

- (1) Die Diffusion nach $j - 1$ oder $j + 1$ erzeugt einen Verlustanteil von $f_{j,\text{diff},\mathcal{A}}^k$ (Abbildung 2.2 a).
- (2) Sobald sich in Bin j auch \mathcal{B} -Moleküle befinden, können diese mit \mathcal{A} -Molekülen reagieren. Der Anteil, der dadurch von a_j^k entfällt, wird mit $f_{j,\text{reac},\mathcal{A}}^k$ beschrieben.
- (3) Der Anteil der im Bin j verbleibenden \mathcal{A} -Moleküle ergibt sich somit zu $1 - 2f_{j,\text{diff},\mathcal{A}}^k - f_{j,\text{reac},\mathcal{A}}^k$.

Auf Grund der Massenerhaltung gilt $(1 - 2f_{j,\text{diff},\mathcal{A}}^k - f_{j,\text{reac},\mathcal{A}}^k) \geq 0$. Um zudem abzubilden, dass Moleküle, die sich bereits in Bin j befunden haben, während eines Zeitschritts weiter in j verweilen ohne eine Aktion auszuführen, wird ein dimensionsloser Faktor w_{stay} eingeführt, und der Anteil verweilender \mathcal{A} -Moleküle definiert als $f_{j,\text{stay},\mathcal{A}}^k = w_{\text{stay}} f_{j,\text{diff},\mathcal{A}}^k$. Aufgrund der Massenerhaltung gilt somit:

$$1 - 2f_{j,\text{diff},\mathcal{A}}^k - f_{j,\text{reac},\mathcal{A}}^k = w_{\text{stay}} f_{j,\text{diff},\mathcal{A}}^k \quad (2.11)$$

$$\Leftrightarrow f_{j,\text{diff},\mathcal{A}}^k = \frac{1 - f_{j,\text{reac},\mathcal{A}}^k}{w_{\text{stay}} + 2} \quad (2.12)$$

für den Diffusionsanteil $f_{j,\text{diff},\mathcal{A}}^k$ in Bin j zum Zeitpunkt k . Der Unterschied zum Eulerverfahren (Abschnitt 2.1) besteht hier in der Abhängigkeit des diffusiven Anteils vom Anteil der miteinander reagierenden Moleküle. Neben den Verlusten für a_j^k müssen auch die Gewinne durch Diffusion aus den Nachbarbins $j - 1$ und $j + 1$ einbezogen werden. Diese werden durch die anteilige Diffusion von den Molekülen

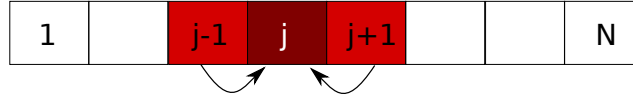


Abbildung 2.3.: Schematische Darstellung des Gewinns für die Population \mathcal{A} in Bin j . Diffusion aus den Nachbarbins $j - 1$ und $j + 1$ mit Diffusionsanteilen $f_{j-1,\text{diff},\mathcal{A}}^k$ (Pfeil nach rechts) und $f_{j+1,\text{diff},\mathcal{A}}^k$ (Pfeil nach links).

aus Bin $j - 1$ mit $f_{j-1,\text{diff},\mathcal{A}}^k a_{j-1}^k$ und aus Bin $j + 1$ mit $f_{j+1,\text{diff},\mathcal{A}}^k a_{j+1}^k$ beschrieben. Daraus ergibt sich folgende Konzentration der Moleküle \mathcal{A} zum Zeitpunkt $k + 1$:

$$a_j^{k+1} = \underbrace{\left(1 - 2f_{j,\text{diff},\mathcal{A}}^k - f_{j,\text{reac},\mathcal{A}}^k\right)}_{w_{\text{stay}} f_{j,\text{diff},\mathcal{A}}^k} a_j^k + f_{j-1,\text{diff},\mathcal{A}}^k a_{j-1}^k + f_{j+1,\text{diff},\mathcal{A}}^k a_{j+1}^k, \quad (2.13)$$

$$\text{wobei } f_{j,\text{reac},\mathcal{A}}^k = \kappa_{\text{bin}} b_j^k \cdot \Delta t \quad (2.14)$$

durch die Binderatenkonstante κ_{bin} und die Konzentration b_j^k der in Bin j vorhandenen \mathcal{B} -Moleküle definiert ist.

Für den ersten ($j = 1$) und den letzten Bin ($j = N$) müssen die Gleichungen angepasst werden, da es nur je einen benachbarten Bin gibt, in den Moleküle diffundieren können. Der Anteil, der am Ort $j = 1, N$ verbleibt, wird durch $f_{1/N,\text{stay},\mathcal{A}}^k = 1 - f_{1/N,\text{diff},\mathcal{A}}^k - f_{1/N,\text{reac},\mathcal{A}}^k$ beschrieben. Dieser soll einem dimensionslosen Faktor $w_{\text{stay}}^{\text{R}}$ mal dem diffusiven Anteil $f_{1/N,\text{diff},\mathcal{A}}^k$ entsprechen. Mit $w_{\text{stay}}^{\text{R}} := w_{\text{stay}} + 1$ ersetzt ergeben sich folgende Anteile für die Ränder.

$$\left(1 - f_{1/N,\text{diff},\mathcal{A}}^k - f_{1/N,\text{reac},\mathcal{A}}^k\right) = w_{\text{stay}}^{\text{R}} f_{1/N,\text{diff},\mathcal{A}}^k \quad (2.15)$$

$$\Leftrightarrow f_{1/N,\text{diff},\mathcal{A}}^k = \frac{1 - f_{1/N,\text{reac},\mathcal{A}}^k}{w_{\text{stay}}^{\text{R}} + 1} \quad (2.16)$$

$$= \frac{1 - f_{1/N,\text{reac},\mathcal{A}}^k}{w_{\text{stay}} + 2}. \quad (2.17)$$

Bei fehlender Reaktion ist der Diffusionsanteil $f_{j,\text{diff},\mathcal{A}}^k$ aus jedem Bin $j = 1, \dots, N$ in die Nachbarbins somit gleich. Unabhängig von der Diffusion und Reaktion erfolgt der Zuwachs der Moleküle \mathcal{A} in den Quellbereichen³ mit den Bins $j = j_{\text{prod},\mathcal{A}}$, was wie in Abschnitt 2.1 durch die Iverson-Klammer $[j = j_{\text{prod},\mathcal{A}}]$ und durch den

³ $j_{\text{prod},\mathcal{A}} = \{\text{Bins mit Erzeugung von Molekülen } \mathcal{A}\}$

Δt muss dementsprechend hinreichend klein gewählt werden, damit $w_{\text{stay}} \geq 0$ und somit die Massenerhaltung erfüllt werden kann.

2.3. Die RvD-Methode im Vergleich zum expliziten Eulerverfahren

Das explizite Eulerverfahren ist eines der einfachsten Verfahren zur numerischen Lösung von Differentialgleichungen und dient hier auf Grund seiner Ähnlichkeit als Vergleich zur RvD-Methode. Hierbei wird für beide Verfahren die gleiche Diskretisierung in der Zeit $\Delta t = 10^{-2}$ s und im Ort $\Delta x = 10 \mu\text{m}$ verwendet. Als Referenz für die Genauigkeit der Verfahren wird das explizite Eulerverfahren, mit einem sehr viel kleineren Zeitschritt von $\Delta t = 10^{-6}$ s herangezogen. Analysiert wird das in Gleichungen 2.2 bis 2.4 definierte Beispielsystem nach $t = 10$ s zeigt die Verteilungen der Konzentrationen der Moleküle \mathcal{A} , \mathcal{B} und \mathcal{C} entlang des Ortes. Die Lösung mit dem expliziten Eulerverfahren für $\Delta t = 10^{-2}$ s führt für die gewählten Parameter zu unphysikalische Werten, da der Term $(1 - 2s - zb_j^k)$ stellenweise negativ werden kann⁴. Hingegen stimmt die durch die RvD-Methode berechnete Lösung gut mit der Referenzkurve überein. Der Grund hierfür liegt an der im vorherigen Abschnitt erläuterten impliziten Regulierung der effektiven Diffusionskonstante (Gleichung (2.19)). Diese Regulierung hat zur Folge, dass die RvD-Methode größere Zeitschritte Δt erlaubt als das explizite Eulerverfahren.

⁴Stabilität des expliziten Eulerverfahrens bei der Lösung der Diffusionsgleichung - $D_{\mathcal{A}}^{\max} = \frac{\Delta x^2}{\Delta t \cdot 4}$ [69, Kapitel 4.1, S. 273]

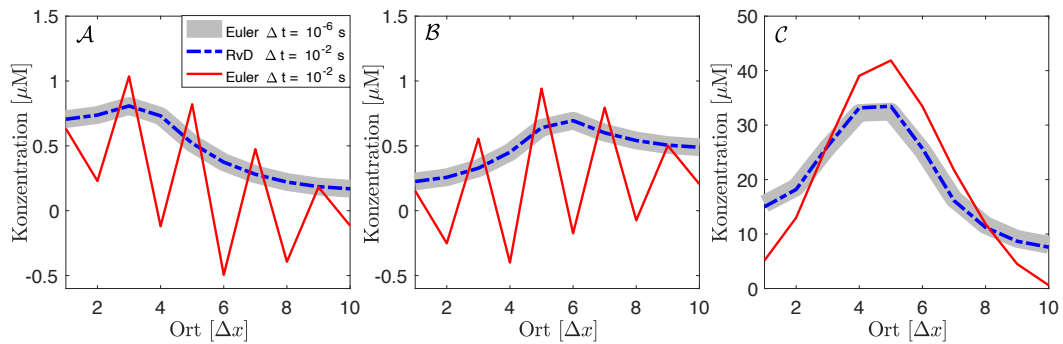


Abbildung 2.4.: Die RvD-Methode liefert für große Zeitschritte Δt eine präzisere Lösung als das explizite Euler-Verfahren. Verteilungen der \mathcal{A} -, \mathcal{B} - und \mathcal{C} -Moleküle nach $t = 10$ s. Anfangskonzentration $a(x, 0) = b(x, 0) = c(x, 0) = 0$, Diffusionskonstanten $D_{\mathcal{A}} = D_{\mathcal{B}} = 5000 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, $D_{\mathcal{C}} = 0 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$; $\Delta x = 10 \mu\text{m}$; Produktion der \mathcal{A} -Moleküle in Bin 3 und 4 mit der Produktionsrate $\alpha_{\mathcal{A}} = 10 \mu\text{M s}^{-1}$ und Produktion der \mathcal{B} -Moleküle in Bin 5 und 6 mit $\alpha_{\mathcal{B}} = 10 \mu\text{M s}^{-1}$. Referenzverteilungen wurden mit dem expliziten Eulerverfahren mit Zeitschritten von $\Delta t = 10^{-6} \text{s}$ berechnet und sind als graue Linien dargestellt. Weitere Parameter siehe Anhang Tabelle A.6.

Kapitel 3

Experimentelle Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten *in-vitro* Daten sind von unseren Kooperationspartnern¹ der Arbeitsgruppe von Roy Bar-Ziv erhoben worden [54].

Die Arbeitsgruppe von Roy Bar-Ziv vom Weizmann Institut in Israel hat eine Methode entwickelt, die es ermöglicht die Bildung von Proteinkomplexen *in-vitro* zu untersuchen [70]. Trotz dessen vereinfachten experimentellen Aufbaus sind die experimentellen Daten ohne ein theoretisches Modell schwer zu interpretieren. In dieser Arbeit wird ein theoretisches Modell entwickelt, was die Experimente unserer Kooperationspartner nachbildet. Für das Aufstellen eines geeigneten Modells, muss nicht nur das Experiment verstanden werden, sondern auch dessen Einschränkungen. Daher wird in diesem Abschnitt das Experiment und das Messverfahren grob beschrieben.

Die Besonderheit des Experiments ist, dass Proteine, ähnlich wie in der Zelle, lokalisiert erzeugt werden. Durch das Einbringen zweier DNA-Typen, die jeweils einen anderen Proteintyp codieren, und aller für die Proteinsynthese notwendigen molekularen Maschinen, erfolgt die Proteinkomplexbildung autonom in einer zellfreien, künstlichen Umgebung. Im Gegensatz zur Synthese in der Zelle hat das den Vorteil, dass nur die wichtigsten Komponenten für die Erzeugung der Proteine ins System eingebracht werden. Dadurch bleibt die Anzahl der zu berücksichtigenden Reaktionen überschaubar. Zudem lässt sich das System besser steuern, da keine Hintergrundreaktionen stattfinden. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Experimente auf einem Siliziumwafer (Si-Wafer) in einem Multi-Well-Array (Lochgitter) stattfinden [54]. Dadurch lässt sich eine Vielzahl von Experimenten zeitgleich durchführen.

¹Die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente sind durch die Gruppe von Roy Bar-Ziv, im speziellen von Ohad Vonshak, geplant und durchgeführt worden.

3.1. Chip-Design

Von unseren Kooperationspartnern wurde ein Biochip entworfen, in dem sich sowohl die Proteinsynthese als auch die Proteinerfassung sowie deren Komplexbildung realisieren lässt [70]. Hierfür wurde ein Si-Wafer verwendet, auf dem ein 200 nm dickes Siliziumnitrid-Netz aufgespannt wurde. Das Netz wird mit einer lichtempfindlichen Monoschicht auf der Basis von Polyethylenglycol (PEG) beschichtet, um eine unspezifische Adsorption von Biomolekülen zu verhindern. Durch UV-Lithografie, d.h. lokale Belichtung der Monoschicht, mit einer Wellenlänge von 365 nm, kommt es zur Musterbildung. Die Belichtung mit UV-Licht bewirkt ein Aufbrechen der kovalenten Bindung und somit eine Aktivierung der belichteten Bereiche. In den aktivierten Bereichen kann Biotin binden [71]. Aus der Biologie ist bekannt, dass Streptavidin eine sehr starke Bindung mit Biotin eingeht. Durch die Verbindung von Biomolekülen, z. B. Antikörper mit Streptavidin lassen sich diese gezielt an dem Oberflächenmuster immobilisieren.

Die in diesem Versuchsaufbau immobilisierten Biomoleküle sind DNA-Moleküle und Antikörper. Die synthetisch hergestellte DNA codiert alle Informationen, die für die Herstellung eines Proteins nötig sind. Die DNA wird mittels *Spotting* lokalisiert auf den Chip aufgebracht [54]. Die mit der Oberfläche verbundenen DNA-Moleküle werden als DNA-Bürsten (engl. *brushes*) bezeichnet. Danach werden die Antikörper homogen auf dem Chip verteilt und binden in den Bereichen, wo noch keine DNA gebunden hat. Mit Hilfe eines Zellextraktes vom Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) werden anschliessend alle wichtigen molekularen Maschinen eingebracht, die für die Genexpression notwendig sind (Polymerase, tRNA, EF-Tu, Ribosomen, Aminosäuren).

Mit dem Einbringen des Zellextraktes beginnt die Proteinbiosynthese (Abschnitt 1.1). Die so entstandenen Proteine können an die Oberfläche binden. In dem Experiment werden zwei unterschiedliche Verfahren für die Bindung der Proteine an die Oberfläche verwendet. Das erste Verfahren nutzt die direkte Bindung der synthetisierten Proteine an die an der Oberfläche gebundenen Antikörper mittels HA-Tag². Das zweite Verfahren kommt ohne HA-Tag an den zu synthetisierenden Proteinen aus. Dies gelingt durch die Verwendung eines zweiten Proteintyps, der vor der Synthese des eigentlich interessierenden Proteins an die Antikörper mittels eines HA-Tag

²HA-Tag ist ein Protein-Tag, der aus einem Teilbereich des Hämagglutinins besteht und die Aminosäuresequenz YPYDVPDYA hat [54], [72].

gebunden wird. Hierbei ist wichtig, dass beide Proteintypen aneinander binden können.

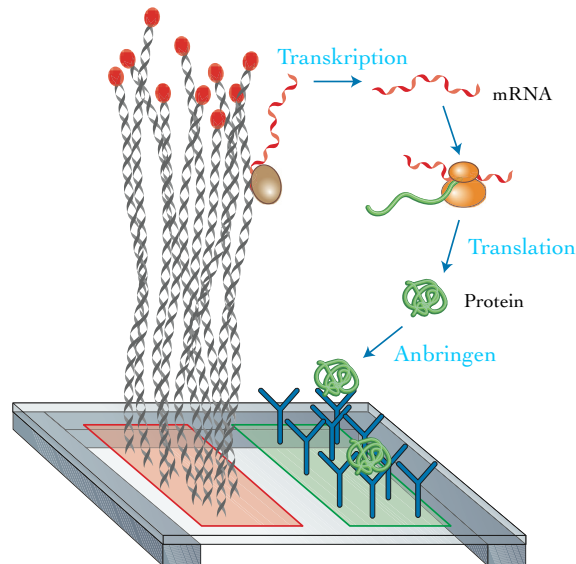


Abbildung 3.1.: Schematische Darstellung eines Biochips entnommen aus Heyman u. a. [70]. Lange DNA-Stränge, die das zu untersuchende Protein codieren, werden an der Oberfläche befestigt. Antikörper (blaue Y-Formen), die nur spezielle Proteine binden können, sind neben der DNA immobilisiert. Die DNA wird durch eine RNA-Polymerase (braunes Ellipsoid) in mRNA (rote Spirale) transkribiert und durch ein *E. coli* Ribosom (doppelte orange Ellipsoide) in naszierende Polypeptide (grüne Kette) übersetzt. Das gefaltete Protein (grüne gefaltete Kette) diffundiert und bindet an die Antikörperperle. [39]

3.2. Messung der Verteilung der an der Oberfläche gebundenen Proteine

Die Messung der Verteilung der an der Oberfläche gebundenen Moleküle erfolgt mittels eines Fluoreszenzmikroskops. Je nach Proteintyp werden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet: Das erste Verfahren wird bei der Beobachtung der Proteine des T4-Phagen (z.B. *gp10*, *gp7*, *gp8*) verwendet. Diese Proteine enthalten kein fluoreszierendes Label. Erst durch eine Nachfärbung (engl. *post-staining*) mittels eines gelabelten Proteins kann eine Beobachtung der gebundenen Proteine erfolgen. Im zweiten Verfahren wird an das zu untersuchende Protein ein fluoreszierendes Label angebracht oder es werden Proteine mit starker Autofluoreszenz, wie z.B. das *grün fluoreszierende Protein* (GFP), synthetisiert.

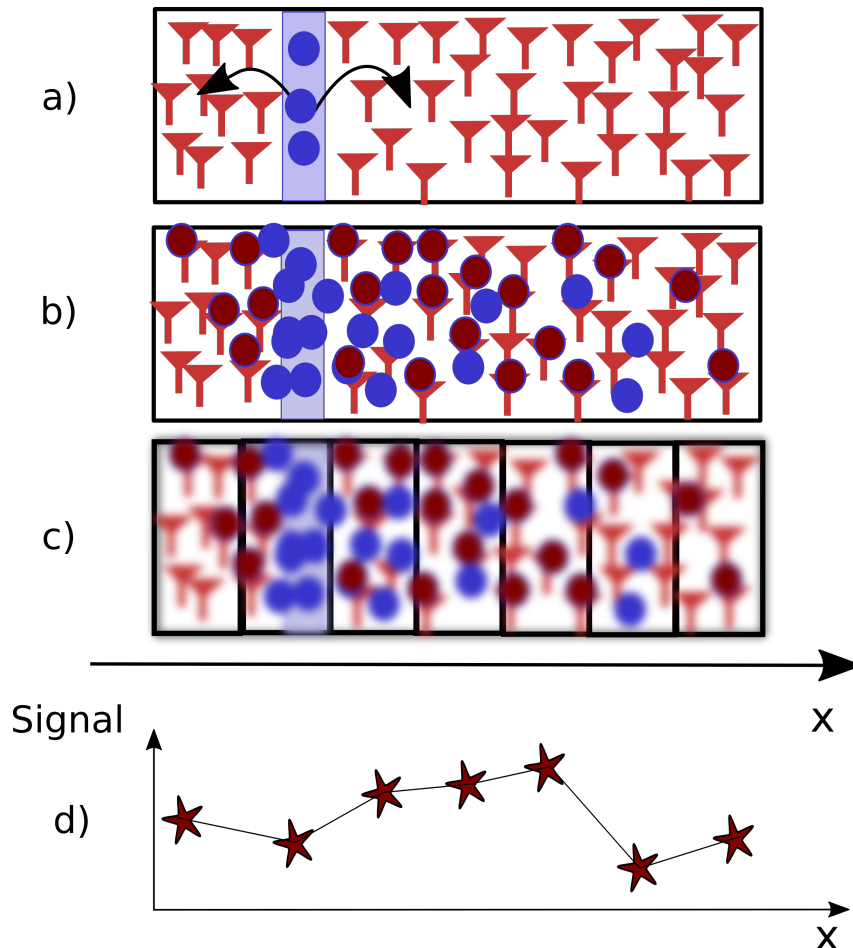


Abbildung 3.2.: Messung der gebundenen Moleküle. Schematische Darstellung des Designs eines Biochips. Die an der Oberfläche befestigten Antikörper (altrosa Trichter) binden freie Moleküle (blaue Kugeln) an die Oberfläche. Die an die Oberfläche gebundenen Partikel (dunkelrote Kugeln mit blauem Rand) erzeugen ein Fluoreszenzsignal. Das mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops und einer Kamera aufgenommene Bild wird mittels Binning (c) des Chips in x-Richtung in eine Verteilung von gebundenen Molekülen (d) entlang der x-Richtung umgewandelt.

Mit der ersten Untersuchungsmethode lässt sich die Ausbeute an gebundenen Molekülen nach einer bestimmten Zeit t ermitteln. Hier wird die Proteinexpression gestoppt und der Chip anschließend gewaschen. Es bleiben somit nur noch die an der Oberfläche gebundenen Moleküle übrig. Für eine starke Bindung an der Oberfläche werden bereits per HA-Tag an Antikörper gebundene *gp11* Proteine verwendet. Zur Untersuchung der Komplexbildung dienen die Proteine *gp10* und *gp7*. Die Assemblierungsreihenfolge der Proteine des T4-Phagen ist gut bekannt und in der Literatur beschrieben [73]. Hier kann *gp10* oder der Proteinkomplex *gp10-7* an *gp11* binden. Eine Bindung von *gp7* an *gp11* findet nicht statt. Die Komplexbildung von *gp10-7* und *gp11* lässt sich über die Bindung von *gp10-7* an der Oberfläche untersuchen. Mittels einer Nachfärbung der an der Oberfläche gebundenen Proteine wird die Ausbeute der gebundenen Moleküle bestimmt. Hierfür werden Proteine gelabelt, die nur mit bestimmten Proteinen an der Oberfläche reagieren [54]. Durch die Assemblierung der gelabelten Proteinen (hier *gp8*, *gp10*) kann herausgefunden werden, welche Proteine an der Oberfläche gebunden sind. Die gelabelten Proteine müssen in einer bestimmten Reihenfolge aufgebracht werden (umgedrehte Assemblierungsreihenfolge) um sicherzustellen, dass gelabelte Proteine nicht an bereits gelabelte Proteinkomplexe binden. Durch das Aufbringen von *gp8* wird herausgefunden, welche Verteilung der gebundenen Komplexe *gp10-7* an der Oberfläche zu finden ist. Die noch freien Plätze an der Oberfläche (unbesetzte *gp11*) werden mit Hilfe von gelabelten *gp10* erkannt. Durch Invertieren dieser *gp10*-Verteilung ergibt sich die Verteilung aller besetzten Stellen an der Oberfläche. Somit können mit einem Experiment sowohl die Verteilungen gebundenen Komplexe als auch die besetzten Stellen an der Oberfläche ermittelt werden.

Bei der zweiten Untersuchungsmethode kann die Verteilung eines Proteintyps in Abhängigkeit von der Zeit untersucht werden. Hierfür erhält das zu untersuchende Protein einen HA-Tag für die Bindung an der Oberfläche und ein fluoreszierendes Label für die Beobachtung mittels Fluoreszenzmikroskopie. Im Fall von GFP wird kein fluoreszierendes Label benötigt. Weil bei der Aufnahme der zeitlichen Entwicklung kein Stoppen der Proteinsynthese erfolgt und kein Waschen, tragen sowohl gebundene als auch ungebundene Proteine zum aufgenommenen Signal bei.

Zusammenfassend kann man sagen, dass beide experimentellen Verfahren Vor- und Nachteile mit sich bringen. Während bei dem ersten Verfahren mittels Nachfärbung die gebundenen Komplexe beobachtet werden und die Gesamtheit aller an der Oberfläche gebundenen Proteine, ist bei dem zweiten Verfahren des autofluo-

3. Experimentelle Methoden

reszierenden Proteins nur ein Proteintyp beobachtbar und somit keine Komplexbildung. Die Untersuchung der Komplexbildung kann nur zu einem festen Zeitpunkt erfolgen, wohingegen die Untersuchung eines Proteintyps dynamisch³ möglich ist. Unser Modell soll die fehlende dynamische Beobachtung bei der Komplexbildung ersetzen.

³Dynamik des Systems kann über die Summe aus gebundenen und ungebundenen Proteinen beobachtet werden. Eine Trennung der Daten der gebundenen und ungebundenen Proteine im Experiment ist nicht möglich.

Kapitel 4

Fallen-Effizienz in Systemen mit einer Proteinuntereinheit

Das vorliegende Kapitel untersucht den Einfluss der Limitierung der Bindestellen an der Oberfläche auf die zu bindenden Moleküle. Ausgehend vom einfachsten Fall, dem Ein-Boxmodell, wird ein quasi-realistisches System mit N Boxen vorgestellt. Hierbei werden die für die Systeme entsprechenden Parameter eingeführt, die von der Produktionsrate und Bindeaffinität der Moleküle im Ein-Boxmodell, über die heterogenen Erzeugungsorte der Reaktanten im Zwei-Boxenmodell bis hin zur Variation der Fallendichte und inhomogener Fallenverteilungen reichen. Zuletzt erfolgt eine Validierung des quasi-realistischen Systems mit *in vitro* Daten der Gruppe von Prof. Dr. Roy Bar-Ziv (Weizmann-Institut, Israel).

4.1. Ein-Boxmodell – homogene Erzeugung der Reaktanten

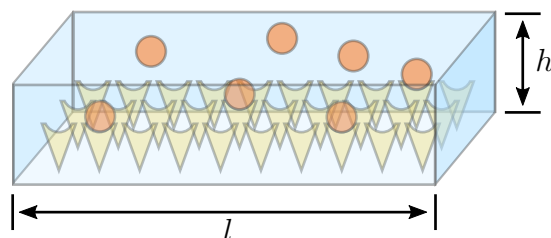


Abbildung 4.1.: Schema eines Synthesenchips mit Höhe h und einer Länge l [i.V. 74]. Der Chip ist mit einer Lösung gefüllt, die Moleküle (orange Kugeln) enthält. Diese können an molekulare Fallen (gelbe Kegel) binden, um Molekül-Fallen-Komplexe zu bilden. Die Fallen sind der Unterseite des Chips befestigt, der Prozess der Komplexbildung findet daher an der Oberfläche statt.

Betrachtet wird ein System (Abbildung 4.1) mit der Länge l (x -Richtung) und der Höhe h (z -Richtung). Die Box ist gefüllt mit einer Lösung von Molekülen mit einer zeitabhängigen Konzentration $C_{\text{ges}}(t)$. Die Moleküle werden als Punktteilchen betrachtet und die Box wird durch die Projektion der y - z -Achse auf die x -Achse auf ein ein-dimensionales System reduziert. Neue Moleküle werden mit einer konstanten Rate α_{prod} in der Box erzeugt. Der Boden ist homogen mit Fallen beschichtet, die freie Moleküle mit einer Binde rate κ_{bin} an die Oberfläche irreversibel binden. Die so limitierte Bindekapazität beeinflusst die Konzentration der gebundenen Moleküle $C_{\text{b}}(t)$. Die Konzentration der gebundenen Moleküle $C_{\text{b}}(t)$ kann den maximalen Wert $C_{\text{b}}^{\text{max}}$ nicht überschreiten, welche der Konzentration der Fallen entspricht. Unter der Annahme einer verdünnten und zu jedem Zeitpunkt gut durchmischten Lösung (homogene Verteilung im Ort) lässt sich die Zeitabhängigkeit des Systems als Differentialgleichungssystem

$$\frac{d}{dt}C_{\text{u}}(t) = -\kappa_{\text{bin}} C_{\text{u}}(t) (C_{\text{b}}^{\text{max}} - C_{\text{b}}(t)) + \alpha_{\text{prod}}, \quad (4.1)$$

$$\frac{d}{dt}C_{\text{b}}(t) = \kappa_{\text{bin}} C_{\text{u}}(t) (C_{\text{b}}^{\text{max}} - C_{\text{b}}(t)) \quad (4.2)$$

schreiben. Hiermit wird die Dynamik der Konzentrationen der ungebundenen Moleküle $C_{\text{u}}(t)$ und der gebundenen Moleküle beschrieben, unter Einbezug der Massenerhaltung $C_{\text{ges}}(t) = C_{\text{b}}(t) + C_{\text{u}}(t) = \alpha_{\text{prod}}t + C_{\text{b}}(0) + C_{\text{u}}(0)$ und den Anfangsbedingungen $C_{\text{b}}(0)$, $C_{\text{u}}(0)$. Durch das Einsetzen der Massenerhaltung in das Differentialgleichungssystem lässt sich das System von zwei auf eine Gleichung reduzieren. Diese kann analytisch gelöst werden und ergibt für die Konzentration der gebundenen Moleküle $C_{\text{b}}(t)$ in Einheiten von $C_{\text{b}}^{\text{max}}$:

$$\frac{C_{\text{b}}(t)}{C_{\text{b}}^{\text{max}}} = 1 - \eta \frac{e^{-\lambda^2 C_{\zeta}(t)^2}}{e^{-\lambda^2 C_{\zeta}(0)^2} + C_{\text{b}}^{\text{max}} \eta \lambda \sqrt{\pi} (\text{Erf} [\lambda C_{\zeta}(t)] - \text{Erf} [\lambda C_{\zeta}(0)])} \quad (4.3)$$

$$\text{mit } \lambda = \sqrt{\frac{\kappa_{\text{bin}}}{2\alpha_{\text{prod}}}},$$

$$C_{\zeta}(t) = -C_{\text{b}}^{\text{max}} + C_{\text{b}}(0) + C_{\text{u}}(0) + \alpha_{\text{prod}}t \quad \text{und}$$

$$\eta = \left(1 - \frac{C_{\text{b}}(0)}{C_{\text{b}}^{\text{max}}}\right).$$

Im Folgenden betrachten wir nur die Lösung mit der Bedingung $C_b^{\max} = 1 \mu\text{M}$. Für die Lösung von $C_b(t)$ in Einheiten von C_b^{\max} ergibt sich:

$$C_b(t) = 1 - \eta_1 \frac{e^{-\lambda_1^2 C_{\zeta,1}(t)^2}}{e^{-\lambda_1^2 C_{\zeta,1}(0)^2} + \eta_1 \lambda_1 \sqrt{\pi} (\text{Erf} [\lambda_1 C_{\zeta,1}(t)] - \text{Erf} [\lambda_1 C_{\zeta,1}(0)])} \quad (4.4)$$

mit $\lambda_1 = \sqrt{\frac{\kappa_{\text{bin}}}{2\alpha_{\text{prod}}}}$,

$$C_{\zeta,1}(t) = -1 + C_b(0) + C_u(0) + \alpha_{\text{prod}} t \quad \text{und}$$

$$\eta_1 = 1 - C_b(0).$$

Die Fallen-Effizienz $f_b(t)$ des Systems beschreibt die zeitliche Entwicklung des Anteils der gebundenen $C_b(t)$ Moleküle zur Gesamtkonzentration $C_{\text{ges}}(t)$ der Moleküle

$$f_b(t) \equiv C_b(t)/C_{\text{ges}}(t). \quad (4.5)$$

Je nach Parameterkombination kann eine bestimmte maximale Fallen-Effizienz erreicht werden. Die maximale Fallen-Effizienz wird durch die Systemparameter bestimmt und ist ≤ 1 .

Der Übergang vom binde- zum produktionsdominierten Regime

Die Bindung an die Fallen ist besonders effizient, wenn die Fallen-Effizienz maximal ist, was die Frage aufwirft, wie eine möglichst hohe und stabile maximale Fallen-Effizienzen erreicht werden kann. Im Folgenden wird daher der Einfluss verschiedener Parameter auf die Fallen-Effizienz $f_b(t)$ untersucht.

Zum Zeitpunkt $t = 0$ finden sich keine Moleküle im System. Diese werden mit konstanter Produktionsrate α_{prod} erzeugt. Somit sind zu Beginn alle Bindestellen an der Oberfläche frei. Mit der Zeit füllen sich diese mit Molekülen und sind nach einer bestimmten Zeit alle Fallen besetzt, ist keine weitere Bindung mehr möglich.

Die zeitliche Entwicklung der Konzentration $C_b(t)$ der gebundenen Moleküle am Beispiel der Produktionsrate α_{prod} und Bindeaffinität κ_{bin} ist in Abbildung 4.2 a zu sehen. Erwartungsgemäß nimmt die Konzentration der gebundenen Moleküle zu und nähert sich einem Plateau, was der Sättigung der Fallen entspricht. Reguliert

wird der Eintritt der Sättigung über die Produktionsrate α_{prod} und die Bindeaffinität κ_{bin} . Umso höher die Produktionsrate und Bindeaffinität, desto schneller wächst die Anzahl gebundener Moleküle und desto eher ist eine Sättigung erreicht.

Abbildung 4.2 b zeigt die zeitliche Entwicklung der Fallen-Effizienz $f_b(t)$. Nach Beginn der Molekülproduktion steigt die Fallen-Effizienz an, erreicht zum Zeitpunkt t^* ihr Maximum, $f_b(t^*) = f_b^{\text{max}}$, und fällt im Anschluss wieder auf Null. Abbildung 4.2 a zeigt, dass zum Zeitpunkt t^* bereits ein großer Anteil an Fallen gesättigt ist. Wie aus der analytischen Lösung des Systems Gleichung (4.3) und dem Ausdruck für die Fallen-Effizienz Gleichung (4.5) folgt, nimmt für große t die Fallen-Effizienz mit

$$\lim_{t \rightarrow \infty} f_b(t) = \frac{C_b^{\text{max}}}{\alpha_{\text{prod}}} \frac{1}{t} \quad (4.6)$$

ab. Dies veranschaulicht Abbildung 4.2 b, da sich bei festgehaltener Produktionsrate α_{prod} gleiche Abfälle der Fallen-Effizienz nach Erreichen des Maximums ergeben. Somit ist der Abfall nur noch von der Produktionsrate abhängig und dieser Zeitraum wird als produktionsdominiert bezeichnet. Analog dazu gilt für den Bereich vor dem Maximum, dass sich bei festgehaltener Binderate κ_{bin} und variabler Produktionsrate α_{prod} gleiche Anstiege der Fallen-Effizienz ergeben (Abbildung 4.2 c und d). Somit lässt sich für jede beliebige Kombination aus κ_{bin} und α_{prod} ein bindedominiertes und produktionsdominiertes Regime für $f_b(t)$ erkennen, wobei t^* dessen Übergang markiert. Das Maximum und die jeweiligen Regime sind in Abbildung 4.2 b, am Beispiel von $\kappa_{\text{bin}} = 0.1 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ und $\alpha_{\text{prod}} = 0.001 \mu\text{M s}^{-1}$ dargestellt.

Ist die Binderate κ_{bin} groß, so ergibt sich bereits nach kurzer Zeit ein Maximum der Fallen-Effizienz f_b^{max} (Abbildung 4.2 d). Dessen Höhe und zeitliche Lage ist zusätzlich abhängig von der Produktionsrate α_{prod} und bei ausreichend hohen Produktionsraten α_{prod} entsteht ein Plateau. Dagegen verringert eine niedrige Binderate κ_{bin} die Höhe des Maximums und verzögert dessen Auftreten (Abbildung 4.2 c).

Der genaue Wert der maximalen Fallen-Effizienz f_b^{max} für $C_b^{\text{max}} = 1 \mu\text{M}$ und dessen Zeitpunkt t^* hängt von der Bindeaffinität und der Produktionsrate ab und kann durch das Lösen von $\left. \frac{d}{dt} f_b(t) \right|_{t=t^*} = 0$ bestimmt werden. In Abbildung C.1 im Anhang ist das Fallen-Effizienz-Maximum in Abhängigkeit von der Produktionsrate und Bindeaffinität dargestellt. Sowohl die farbige Codierung als auch die „z-Achse“ geben die Werte für die Fallen-Effizienz f_b^{max} zur Zeit t^* an, wobei t^* von der Parameterwahl bestimmt wird und stets $0 \leq f_b^{\text{max}} \leq 1$ gilt. Für gleiche Verhältnisse aus κ_{bin} und α_{prod} ergeben sich gleiche maximale Fallen-Effizienzen. Somit befindet sich

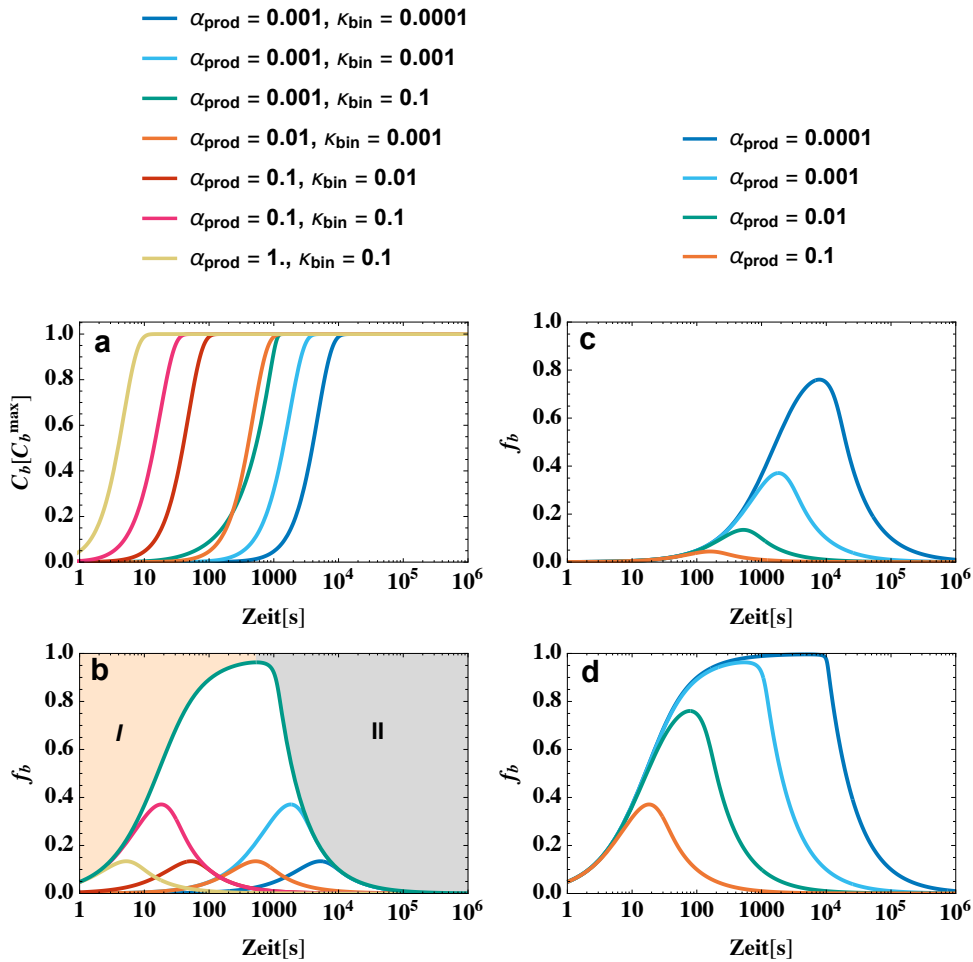


Abbildung 4.2.: Zeitabhängigkeit der Konzentration gebundener Moleküle $C_b(t)$ und deren Fallen-Effizienz $f_b(t)$. Die erste Spalte (a-b) zeigt die Konzentration gebundener Moleküle und die Fallen-Effizienz gebundener Moleküle in Abhängigkeit von der Zeit für gleiche Parametersätze (Legende links). Einteilung der Fallen-Effizienz in Binderegime (I) und Produktionsregime (II). Die zweite Spalte (c-d) vergleicht die Fallen-Effizienz in Abhängigkeit von der Zeit für gleiche Produktionsraten α_{prod} (Legende rechts) und unterschiedliche Bindeaffinitäten: (c) schwache Bindung $\kappa_{\text{bin}} = 0.001 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, (d) starke Bindung $\kappa_{\text{bin}} = 0.1 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$.

4. Fallen-Effizienz in Systemen mit einer Proteinuntereinheit

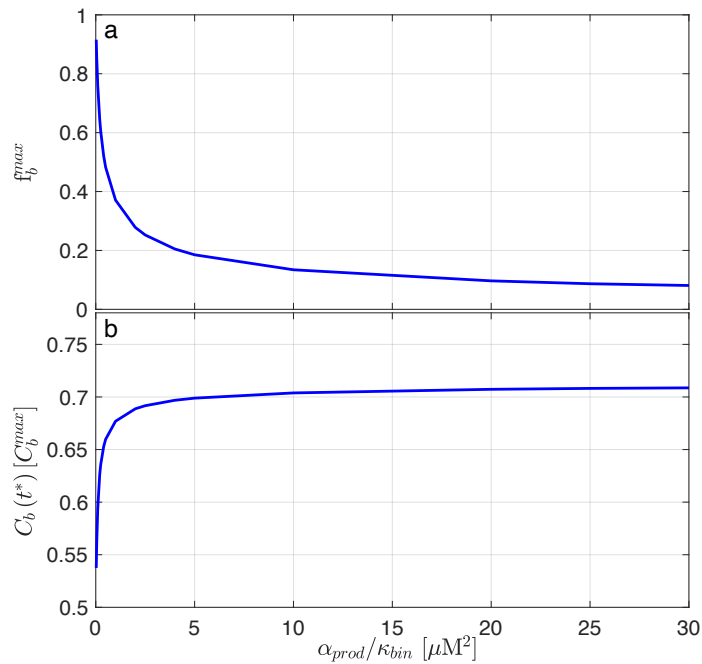


Abbildung 4.3.: Maximal erreichbare Fallen-Effizienz (a) Maximum der Fallen-Effizienz f_b^{max} sowie zeitgleich, d.h. zum Zeitpunkt t^* , auftretende (b) Konzentration der gebundenen Moleküle $C_b(t^*)$ als Funktion des Verhältnisses aus Produktionsrate und Binderate $\frac{\alpha_{\text{prod}}}{\kappa_{\text{bin}}}$.

entlang jeder Geraden auf der Ebene, die ihren Ursprung in $(\kappa_{\text{bin}} = 0 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}, \alpha_{\text{prod}} = 0 \mu\text{M s}^{-1})$ hat, immer die gleiche maximale Fallen-Effizienz. Abbildung 4.3 a verdeutlicht, bei welchem Verhältnis $\kappa_{\text{bin}}/\alpha_{\text{prod}}$ welche maximale Fallen-Effizienz erreicht wird. Zum Zeitpunkt t^* sind, je nach Parameterkombination, grob zwischen 50% und 70% aller Moleküle im System gebunden (Abbildung C.2). Somit ist zum Zeitpunkt der maximalen Fallen-Effizienz noch nicht die maximale Konzentration an gebundenen Molekülen erreicht. Abbildung 4.3 zeigt, dass ein höheres Maximum der Fallen-Effizienz mit einer niedrigeren Konzentration $C_b(t^*)$ zum Zeitpunkt t^* einhergeht.

4.2. Zwei-Boxenmodell – inhomogene Erzeugung der Reaktanten

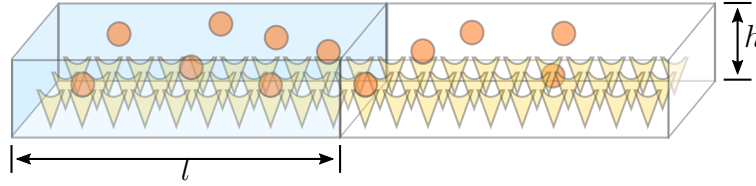


Abbildung 4.4.: Schema eines Zwei-Boxensystems mit Boxhöhe h , Boxlänge l [i.V. 74]. Die Moleküle (orange Kugeln) können zwischen beiden Boxen frei diffundieren und an Fallen (gelbe Kegel) binden. Neue Moleküle werden nur in der linken (blauen) Box produziert.

Im folgenden Abschnitt wird das bereits oben eingeführte Ein-Boxsystem um eine zweite identische Box¹ (Abbildung 4.4), die mit der ersten Box verbunden ist, erweitert. Hierbei sind die Boxen 1 und 2 mit einer Lösung gefüllt, die Moleküle mit den Konzentrationen $C_1(t)$ bzw. $C_2(t)$ enthält. Der Boden jeder Box ist mit Fallen beschichtet, an die Moleküle binden können. Diese können nur in der Box binden, in der sie sich befinden. Die Moleküle diffundieren mit der Diffusionskonstanten D frei zwischen den Boxen. Des Weiteren ist die Produktion nicht mehr homogen: nur in Box 1 werden Moleküle mit der Rate α_{prod} produziert. Die Dynamik der Konzentration von ungebundenen $C_{i,u}(t)$ und gebundenen $C_{i,b}(t)$ Molekülen in Box $i = 1, 2$ wird beschrieben durch:

$$\frac{dC_{1,u}(t)}{dt} = \tilde{D} (C_{2,u}(t) - C_{1,u}(t)) - \kappa_{\text{bin}} C_{1,u}(t) (C_{1,b}^{\text{max}} - C_{1,b}(t)) + \alpha_{\text{prod}}, \quad (4.7)$$

$$\frac{dC_{1,b}(t)}{dt} = \kappa_{\text{bin}} C_{1,u}(t) (C_{1,b}^{\text{max}} - C_{1,b}(t)), \quad (4.8)$$

$$\frac{dC_{2,u}(t)}{dt} = \tilde{D} (C_{1,u}(t) - C_{2,u}(t)) - \kappa_{\text{bin}} C_{2,u}(t) (C_{2,b}^{\text{max}} - C_{2,b}(t)), \quad (4.9)$$

$$\frac{dC_{2,b}(t)}{dt} = \kappa_{\text{bin}} C_{2,u}(t) (C_{2,b}^{\text{max}} - C_{2,b}(t)), \quad (4.10)$$

wobei zur Vereinfachung des Systems die mit der Boxlänge skalierte Diffusionskonstante $\tilde{D} = D/l^2$, auch Diffusionsrate \tilde{D} genannt, verwendet wird. Dabei gilt die Massenerhaltung:

$$C_{1,u}(t) + C_{2,u}(t) + C_{1,b}(t) + C_{2,b}(t) = \alpha_{\text{prod}} t + C_{1,u}(0) + C_{1,b}(0) + C_{2,u}(0) + C_{2,b}(0). \quad (4.11)$$

¹Im Folgenden wird der Begriff Box verwendet, wobei der Begriff Bin aus Kapitel 2 synonym verwendet werden kann.

Zunächst wird die zeitliche Entwicklung der gebundenen Moleküle in Box 1 und Box 2 betrachtet und im Anschluss die Fallen-Effizienz des Gesamtsystems mit der Gesamtanzahl von $N = 2$ Boxen. Die Fallen-Effizienz $f_b(t)$ des Gesamtsystems ist definiert durch die Konzentration an gebundenen Molekülen in Box 1 und Box 2 im Verhältnis zur Gesamtkonzentration der Moleküle im System

$$f_b(t) = \frac{C_b(t)}{C_{\text{ges}}(t)} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N=2} \frac{C_{i,b}(t)}{C_{\text{ges}}(t)}. \quad (4.12)$$

Sie soll ebenfalls als Summe über die Fallen-Effizienzen $f_{i,b}(t)$ in jeder einzelnen Box i , aufgefasst werden. Im Zwei-Boxenmodell wird hierbei über beide Boxen $i = 1, 2$ summiert. Somit ist die Fallen-Effizienz in der Box i definiert durch:

$$f_{i,b}(t) = \frac{1}{N} \frac{C_{i,b}(t)}{C_{\text{ges}}(t)}. \quad (4.13)$$

Die zeitliche Entwicklung der Konzentration gebundener Moleküle in den jeweiligen Boxen $C_{1,b}(t)$ und $C_{2,b}(t)$ ist in Abbildung 4.5 a, d dargestellt. Die räumlich getrennte Produktion der Moleküle führt zu einer Ungleichverteilung der freien Moleküle im System und zu einer unterschiedlichen Fallenbesetzung. Somit sind für kurze Zeiten in Box 1 bereits Fallen besetzt, wohingegen in Box 2 noch alle Fallen frei sind. Je nach Parameterkombination führt dies zu einer früheren Sättigung von Box 1 im Vergleich zu Box 2. Bei festgehaltener Produktionsrate α_{prod} und Binderate κ_{bin} hängt diese Verzögerung von der Diffusionsrate \tilde{D} ab. Bei einer sehr schnellen Diffusionsrate \tilde{D} im Vergleich zur Produktionsrate α_{prod} und Binderate κ_{bin} (Abbildung 4.5 d), erhält man ein gut durchmischtes System, was zu einer ungefähr gleichen Konzentration an gebundenen Molekülen in beiden Boxen zu jedem Zeitpunkt t führt. Bei der Verlangsamung der Diffusion \tilde{D} (Abbildung 4.5 a) wird hingegen ein Konzentrationsunterschied der gebundenen Moleküle in Box 1 und 2 deutlich.

Durch die Einführung der Diffusion ist die Betrachtung der Fallen-Effizienz verglichen mit dem Ein-Boxmodell nicht mehr trivial. Im Ein-Boxmodell unterscheidet man bei der Fallen-Effizienz zwischen einem produktionsdominierten und einem bindedominierten Regime. Diese Unterteilung trifft ebenfalls im Zwei-Boxenmodell zu. Jedoch muss dessen Betrachtung auf Grund der inhomogenen Verteilung der Erzeugung von Proteinen mit Hilfe der Fallen-Effizienz in der jeweiligen Box (Box 1 und Box 2) erfolgen (Abbildung 4.5 c, f). Daher soll im Folgenden sowohl

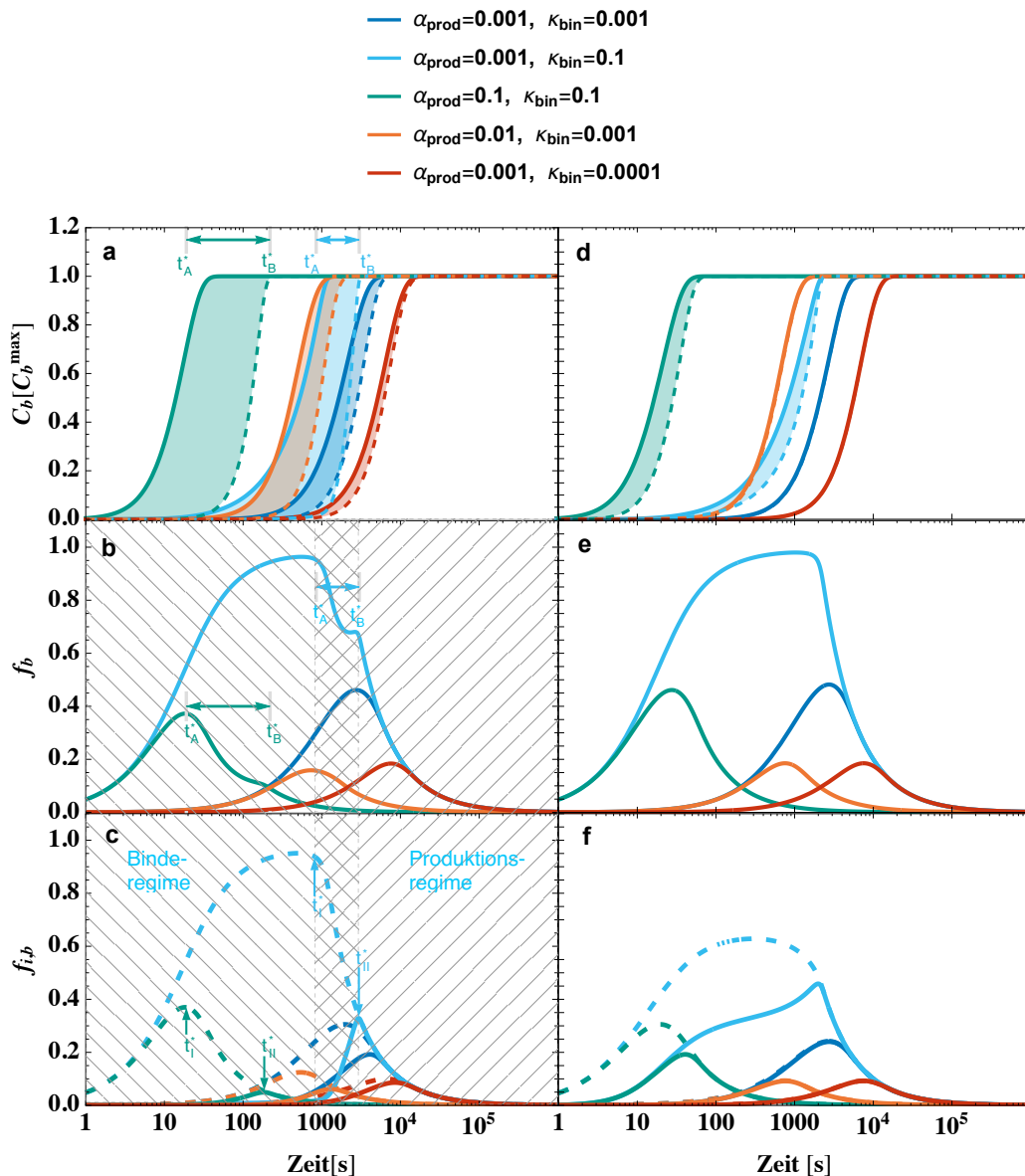


Abbildung 4.5.: Bindedynamik des Zwei-Boxensystems. (a, d) Konzentrationen $C_{1,b}(t)$ und $C_{2,b}(t)$ der gebundenen Moleküle in Box 1 (durchgezogene Linie) und Box 2 (gestrichelte Linie). (b, e) Fallen-Effizienz des Gesamtsystems $f_b(t)$. (c, f) Fallen-Effizienz $f_{1,b}(t)$ und $f_{2,b}(t)$ in Box 1 (gestrichelte Linie) und Box 2 (durchgezogene Linie). Der Vergleich unterschiedlicher Diffusionsraten der Moleküle erfolgt mittels der Spalten, wobei die linke Spalte (a-c) eine langsame Diffusionsrate mit $\bar{D} = 0.001 \text{ s}^{-1}$ und die rechte Spalte (d-f) eine schnell Diffusionsrate mit $\bar{D} = 0.1 \text{ s}^{-1}$ zeigt. Die mit Doppelpfeilen hervorgehobenen Bereiche in Abbildung (a,b) kennzeichnen die Zeitspanne (t_A bis t_B) vom Zeitpunkt der maximalen Fallen-Effizienz bis zum reinen produktionsdominierten Regime. Die Unterscheidung der Regime erfolgt durch die Betrachtung der Fallen-Effizienzen in den einzelnen Boxen. Die maximale Fallen-Effizienz in Box 1 findet zum Zeitpunkt t_I statt und kennzeichnet das Ende des reinen bindedominierten Regimes. Die maximale Fallen-Effizienz in Box 2 zum Zeitpunkt t_{II} beschreibt den Beginn des reinen produktionsdominierten Regimes. Die entsprechenden Regime sind am Beispiel des Datensatzes $\alpha_{\text{prod}} = 0.001 \mu\text{M} \Delta t^{-1}$, $\kappa_{\text{bin}} = 0.1 \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ (cyan blau) eingezeichnet. Die sich somit ergebenen unterschiedlichen Regime ist durch die unterschiedlichen Schraffuren gekennzeichnet, dessen Schnittmenge das Mischregime kennzeichnet. Die entsprechenden Parameterkombinationen sind farblich codiert und befinden sich in der Legende.

die Fallen-Effizienz $f_b(t)$ des Gesamtsystems (Abbildung 4.5 b, e), als auch die Fallen-Effizienz $f_{1,b}(t)$ von Box 1 und $f_{2,b}(t)$ von Box 2 (Abbildung 4.5 c, f) betrachtet werden. Für die zeitliche Entwicklung der Fallen-Effizienz $f_b(t)$ des Gesamtsystems (Gleichung (4.12)) lassen sich drei charakteristische Bereiche (Abbildung 4.5 b, e) erkennen:

1. Zunächst erhöht sich die Fallen-Effizienz $f_b(t)$ bis zu ihrem Maximum f_b^{\max} bei $t = t_A^*$.
2. Anschließend erfolgt eine Abnahme der Fallen-Effizienz $f_b(t)$.
3. Die Abnahme der Fallen-Effizienz beschleunigt sich bei $t = t_B^*$.

Wie die Zunahme der Fallen-Effizienz erfolgt, hängt von der Anzahl der Moleküle in der jeweiligen Box ab, die zur Bindung zur Verfügung stehen. Hierbei unterscheidet man zwischen freien Molekülen, die durch Produktion oder Diffusion gewonnen werden oder freien Molekülen, die in die Nachbarboxen verloren gehen – was bildlich als Fluss von Molekülen von einer Box zu anderen betrachtet werden kann. Im Zwei-Boxensystem gibt es nur in Box 1 eine Produktion. Anfänglich werden Moleküle in Box 1 gebunden, bevor diese Box 2 erreichen können (Abbildung 4.5 a, d). Zum Zeitpunkt $t = t_A^*$ ist ein Großteil aller Fallen in Box 1 besetzt.

Um die Unterscheidung dieser drei Bereiche zu charakterisieren und eine Einteilung in Regime vorzunehmen, äquivalent zum Ein-Boxmodell, erfolgt eine Betrachtung der Fallen-Effizienz in Box 1 und Box 2 (Abbildung 4.5 c, f). Die Einteilung der Fallen-Effizienzen $f_{i,b}(t)$ innerhalb einer Box i kann wie im Ein-Boxmodell über zwei Regime erfolgen. Im Ein-Boxmodell wird hierbei zwischen einem binde- und einem produktionsdominierten Regime unterschieden. Diese Einteilung trifft ebenso im Zwei-Boxenmodell zu auf die Fallen-Effizienzen $f_{i,b}(t)$ in den Boxen 1 und 2. Hier liegen das bindedominierte zeitlich vor und das produktionsdominierte Regime nach dem Erreichen des Maximum $f_{i,b}^{\max}$ der Fallen-Effizienz. Bei der Betrachtung (Abbildung 4.5 c, f) des Bereiches vor dem Maximum ist deutlich zu erkennen, dass sich der Kurvenverlauf in Box 1 von dem Kurvenverlauf in Box 2 unterscheidet. Durch die Summation der Fallen-Effizienzen $f_{1,b}(t)$, $f_{2,b}(t)$ der Boxen 1 und 2 ergeben sich somit drei Bereiche für die Fallen-Effizienz des Gesamtsystems:

1. Das bindedominierte Regime tritt auf bis zu einem Maximum $f_{1,b}^{\max}$ der Fallen-Effizienz der ersten Box. In diesem Fall befinden sich sowohl Box 1 als auch Box 2 im bindedominierten Regime. Erst mit der Abnahme der Fallen-

Effizienz $f_{1,b}(t)$ in Box 1 erfolgt ein Regimewechsel der durch den Zeitpunkt des Maximums $t = t_1^*$ bestimmt ist.

2. Das Mischregime tritt nach dem Maximum $f_{1,b}^{\max}$ der Fallen-Effizienz in der ersten Box auf. In diesem Fall befindet sich Box 1 bereits im produktionsdominierten Regime, wohingegen Box 2 sich noch im bindedominierten Regime befindet.
3. Das reine produktionsdominierte Regime entsteht, wenn sich alle Boxen im produktionsdominierten Regime befinden, was nach dem Erreichen des Maximums $f_{2,b}^{\max}$ der Fallen-Effizienz in der zweiten Box zum Zeitpunkt $t = t_{II}^*$ erfolgt.

Der Bereich vor dem Erreichen des Maximums der Gesamt-Fallen-Effizienz $f_b(t)$ wird somit nicht mehr wie im Ein-Boxmodell betrachtet, sondern besteht aus einem bindedominierten Regime und einem Mischregime, da sowohl die Binderate in der jeweiligen Box als auch der Fluss der Moleküle in die Nachbarboxen die Komplexbildung beeinflussen. Dieser Fluss wird durch die Binderate, die Diffusionsrate und die Produktionsrate bestimmt.

Bei einem gut durchmischten System (Abbildung 4.5 f für die rote, orange, dunkelblaue Kurve), erhält man ein reines bindedominiertes Regime vor dem Erreichen des Maximums für $f_{1,b}(t)$ und $f_{2,b}(t)$, was zu einer gleichen maximalen Fallen-Effizienz $f_{i,b}^{\max}$ in beiden Boxen führt. Folglich geht unter der Annahme eines gut durchmischten Systems das Zwei-Boxenmodell in das Ein-Boxmodell über.

Bei eher heterogenen Systemen² (z.B. Abbildung 4.5 f hellblau, dunkelgrün; $\tilde{D} = 0.1 \text{ s}^{-1}$, $\kappa_{\text{bin}} = 0.1 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) unterscheiden sich die Maxima der Fallen-Effizienzen $f_{i,b}^{\max}$ im Zeitpunkt und der Intensität. Der Abfall nach dem Maximum ist für alle Parameterkombinationen abhängig von der Produktionsrate und wird somit als produktionsdominiertes Regime bezeichnet. Bei einer Sättigung der Box i folgt der Abfall wie im Ein-Boxmodell (Gleichung (4.6)) mit

$$\lim_{t \rightarrow \infty} f_{i,b}(t) = \frac{C_{i,b}^{\max}}{\alpha_{\text{prod}}} \frac{1}{t}. \quad (4.14)$$

Sind die Fallen-Effizienzen in den einzelnen Boxen nicht bekannt, kann eine ungefähre Abschätzung der Regime durch die charakteristischen Zeitpunkte t_A^* , t_B^* der gesamten Fallen-Effizienz $f_b(t)$ erfolgen. Hierbei gilt $t_1^* \leq t_A^*$ und $t_B^* \leq t_{II}^*$.

²d.h. es liegt eine Ungleichverteilung der freien Moleküle in Box eins und zwei vor

Der Zeitpunkt t_A^* des Maximums der gesamten Fallen-Effizienz kennzeichnet den Bereich, der sich bereits im Mischregime befindet oder bei einem gut durchmischten System das Ende des bindedominierten Regimes. Der Zeitpunkt t_B^* bei dem eine Beschleunigung des Abfalls der Fallen-Effizienz erfolgt, kennzeichnet sich bei schlecht durchmischten Systemen deutlich durch ein Plateau (Abbildung 4.5 c hellblau, dunkelgrün). Die Gesamt-Fallen-Effizienz und die Ausprägung aller drei Regime hängt von der Durchmischung des Systems ab, die sich durch den Vergleich der Fallen-Effizienzen in jeder einzelnen Box i zeigt. Da die Moleküle nur in Box 1 erzeugt werden, wird die Gesamt-Fallen-Effizienz $f_b(t)$ durch Box 1 dominiert. Das lang anhaltende bindedominierte Regime in Box 2 führt zu einem verlangsamten Abfall der Gesamt-Fallen-Effizienz im Mischregime (Plateau Abbildung 4.5 hellblau, dunkelgrün). Erst nach dem Plateau befinden sich beide Boxen im produktionsdominierten Bereich. Die Gesamt-Fallen-Effizienz für lange Zeiten – wenn alle Fallen besetzt sind – geht somit mit

$$\lim_{t \rightarrow \infty} f_b(t) = \lim_{t \rightarrow \infty} f_{1,b}(t) + f_{2,b}(t) = \frac{C_{1,b}^{\max} + C_{2,b}^{\max}}{\alpha_{\text{prod}}} \frac{1}{t} = N \frac{C_b^{\max}}{\alpha_{\text{prod}}} \frac{1}{t} \quad (4.15)$$

einher, vergleiche Gleichungen (4.12) bis (4.14), wobei für eine homogene Fallenverteilung $C_b^{\max} = C_{1,b}^{\max} = C_{2,b}^{\max}$ gilt.

4.3. Bindung und Diffusion in quasi-realistischen Systemen

Die Diffusion und Bindung von Molekülen soll in einem realistischen System mit begrenzten Fallen-Kapazitäten untersucht werden, dass aus $N \gg 1$ Boxen besteht. Die Konzentration $C_i(t)$ der Moleküle ändert sich in den Boxen $i = 1, \dots, N$ aufgrund der Produktion neuer Moleküle und der Diffusion in benachbarte Boxen. Die Moleküle bewegen sich in der Lösung frei mit einer Diffusionsrate \tilde{D} , bis sie mit einer Bindeaffinität κ_{bin} an Fallen binden, die am Boden der Boxen verteilt sind. Auf Grund der begrenzten Anzahl an Fallen kann es nur zu einer Bindung kommen, solange freie Fallen verfügbar sind. Dadurch kann die Konzentration $C_{i,b}(t)$ der gebundenen Moleküle in Box i ihr Maximum $C_{i,b}^{\max}$ nicht überschreiten. Die Produktion neuer Moleküle soll, wie im Zwei-Boxmodell, auf einen bestimmten Boxenbereich beschränkt werden.

Im Folgenden wird ein System mit der Länge $L = 1$ mm untersucht. Das System wird in $N = 100$ Boxen diskretisiert, was einer Boxgröße von $\Delta x = 10 \mu\text{m}$ entspricht. Die Boxen $i_{\text{prod}} = 12, \dots, 19$ (Abschnitte 4.3, 4.4 und 4.6, Abb. 4.12) bzw. $i_{\text{prod}} = 7, \dots, 14$ (Abschnitt 4.5 und Kapitel 5, Abb. 4.11) dienen hierbei als Quellen für neue Moleküle, von denen jede Box mit einer Rate α_{prod} neue Moleküle erzeugt. Der Boxindex i beschreibt die diskretisierte Position relativ zum System, die Länge des Systems L ist somit $L = \Delta x \cdot N$. Die Zeitentwicklung der Konzentration von gebundenen $C_{i,b}(t)$ und freien $C_{i,u}(t)$ Molekülen in Box i wird durch

$$\frac{dC_{i,b}(t)}{dt} = \kappa_{\text{bin}} C_{i,u}(t) (C_{i,b}^{\text{max}} - C_{i,b}(t)) \quad \text{für } i = 1, \dots, N, \quad (4.16)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{i,u}(t)}{dt} &= \tilde{D} (C_{i+1,u}(t) + C_{i-1,u}(t) - 2C_{i,u}(t)) \\ &\quad - \kappa_{\text{bin}} C_{i,u}(t) (C_{i,b}^{\text{max}} - C_{i,b}(t)) \\ &\quad + \alpha_{\text{prod}} [i = i_{\text{prod}}] \quad \text{für } i = 2, \dots, N - 1, \text{ und} \end{aligned} \quad (4.17)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{1,u}(t)}{dt} &= \tilde{D} (C_{2,u}(t) - C_{1,u}(t)) \\ &\quad - \kappa_{\text{bin}} C_{1,u}(t) (C_{1,b}^{\text{max}} - C_{1,b}(t)) \\ &\quad + \alpha_{\text{prod}} [1 = i_{\text{prod}}], \end{aligned} \quad (4.18)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{N,u}(t)}{dt} &= \tilde{D} (C_{N-1,u}(t) - C_{N,u}(t)) \\ &\quad - \kappa_{\text{bin}} C_{N,u}(t) (C_{N,b}^{\text{max}} - C_{N,b}(t)) \\ &\quad + \alpha_{\text{prod}} [N = i_{\text{prod}}] \end{aligned} \quad (4.19)$$

beschrieben, wobei die Iverson-Klammer $[i = i_{\text{prod}}] = 1$, wenn Box i eine Quelle für neue Moleküle ist und 0 andernfalls. Darüber hinaus muss die Massenerhaltung gelten:

$$\sum_{i=1}^N (C_{i,u}(t) + C_{i,b}(t)) = \sum_{i=1}^N (C_{i,u}(0) + C_{i,b}(0) + \alpha_{\text{prod}} t [i = i_{\text{prod}}]). \quad (4.20)$$

Das Gleichungssystem wird mit dem in RvD Modell, in Abschnitt 2.2 beschrieben, gelöst. Hierbei wird der Ort in Δx und die Zeit in Zeitschritte Δt diskretisiert.

Durch die Lösung des Systems können sowohl die zeitliche Entwicklung als auch die räumliche Verteilung der Moleküle in betrachtet werden. Im folgenden Abschnitt werden die Fallen-Effizienz und die Anzahl gebundener Moleküle für verschiedene Parameterkombinationen untersucht.

Drei Regime der Fallen-Effizienz

Die Fallen-Effizienz $f_b(t)$ in einem 100-Boxensystem, mit einer Gesamtanzahl von $N = 100$ Boxen, ist analog zu Gleichung (4.12) über das Verhältnis aus der Konzentration $C_b(t) \equiv 1/N \sum_{i=1}^{N=100} C_{i,b}(t)$ gebundener Moleküle zur Gesamtkonzentration $C_{\text{ges}}(t) \equiv 1/N \sum_{i=1}^{N=100} (C_{i,b}(t) + C_{i,u}(t))$ gegeben. Die zeitliche Entwicklung der Fallen-Effizienz $f_b(t)$ kann äquivalent über die Summe der Fallen-Effizienzen $f_{i,b}(t)$ jeder einzelnen Box i beschrieben werden, wobei $f_{i,b}(t) = 1/N \frac{C_{i,b}(t)}{C_{\text{ges}}(t)}$ analog zu Gleichung (4.13).

$$f_b(t) = \sum_{i=1}^{N=100} f_{i,b}(t) \quad (4.21)$$

Eine genauere Betrachtung der Fallen-Effizienz $f_b(t)$ im Gesamtsystem kann ebenfalls über die Schar der Fallen-Effizienzen $f_{i,b}(t)$ jeder einzelnen Box i erfolgen. Die Fallen-Effizienz $f_{i,b}(t)$ jeder einzelnen Box i lässt sich wie im Ein-Boxmodell durch zwei Regime charakterisieren, ein bindedominiertes und ein produktionsdominiertes Regime (Abbildung 4.6 c und d). Das bindedominierte Regime geht zum Zeitpunkt t_i^* in Box i in ein produktionsdominiertes Regime über; als Beispiel dient die Fallen-Effizienz in Box N in Abbildung 4.6 d. Erst durch die Überlagerung der einzelnen Fallen-Effizienzen $f_{i,b}(t)$ (Abbildung 4.6 c) entstehen drei Regime für die Fallen-Effizienz $f_b(t)$ des Gesamtsystems (Abbildung 4.6 a), analog zum Zwei-Boxmodell in Abschnitt 4.2.

Für eine genaue Unterteilung in diese drei Regime erfolgt zunächst eine Betrachtung der Schar (Boxen $i = 1 \dots 100$) der bindedominierten Regime (Abbildung 4.6 c). Zu Beginn sind im System noch keine Moleküle $C_{i,u}(0) = C_{i,b}(0) = 0$ vorhanden. Erst durch die Produktion von Molekülen in den Boxen i_{prod} gelangen Moleküle ins System. Die erzeugten Moleküle können entweder in den Quellboxen an die Fallen binden oder in Nachbarboxen diffundieren, um dort zu binden. Der Verlauf der Fallen-Effizienz in jeder einzelnen Box hängt hierbei von den für die Bindung zur Verfügung stehenden Molekülen in Box i ab, die durch die Binderate κ_{bin} , Produktionsrate α_{prod} und Diffusionsrate \tilde{D} bestimmt wird. Jede Box i befindet sich bis zum Erreichen der maximalen Fallen-Effizienz $f_{i,b}(t)$ in ihrem bindedominierten Regime. Auf Grund der inhomogenen Produktion und somit inhomogenen Verteilung der Moleküle über die Boxen ist die Fallen-Effizienz zu unterschiedlichen Zeitpunkten maximal. Somit erreichen die Quellboxen $i = i_{\text{prod}}$, in denen Moleküle entstehen, eher die maximale Fallen-Effizienz, als Boxen in die nur durch Diffusion neue Moleküle gelangen (Abbildung 4.6 c). Eine Vergrößerung der Entfernung

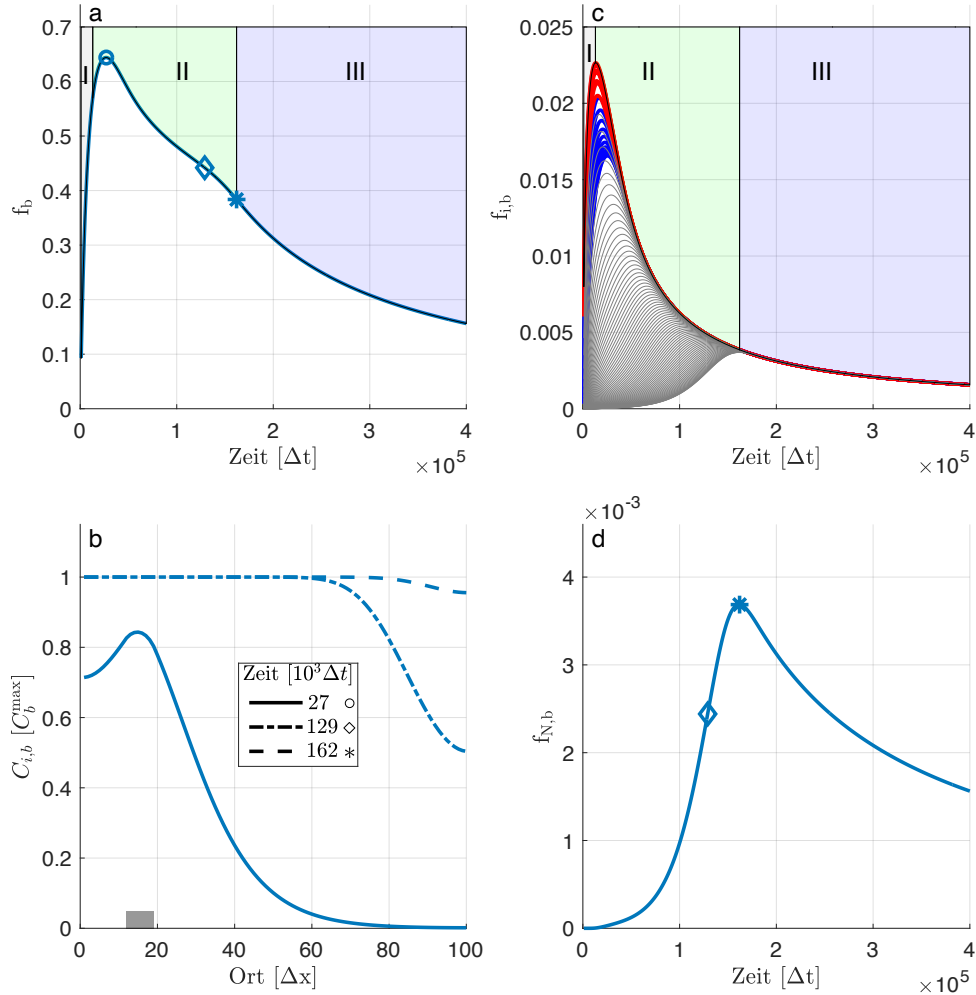


Abbildung 4.6.: Charakteristika und Regimeaufteilung der Fallen-Effizienz (a) Gesamt-Fallen-Effizienz in Abhängigkeit von der Zeit. Die charakteristischen Punkte entsprechen folgende Zeitpunkten: (\circ) Zeit der maximalen Gesamt-Fallen-Effizienz, (\diamond) der Wendepunkt Fallen-Effizienz in der N -ten Box und ($*$) dem Maximum der Fallen-Effizienz in der N -ten Box (d). (b) Ortsabhängigkeit der gebundenen Moleküle zu den charakteristischen Zeitpunkten (vgl. (a)). Das graue Rechteck kennzeichnet den Ort der Quelle. (c) Fallen-Effizienz in der jeweiligen Box i als Funktion der Zeit. Unterscheidung der Fallen-Effizienz in den Boxen im Quellbereich (rot), links vom Quellbereich (blau) und rechts vom Quellbereich (grau). Die Einteilung der Summe der Fallen-Effizienz in Box i erfolgt in drei Regime (Schattierung). Regime I ist das bindedominierte Regime, das endet, sobald die Fallen-Effizienz der ersten Box maximal ist. In Regime II finden sich sowohl steigende als auch sinkende Fallen-Effizienzen. Regime III ist der Bereich, in dem alle Boxen ihre maximale Fallen-Effizienz überschritten haben und somit die Produktion dominiert. (d) Dargestellt ist die Fallen-Effizienz in der N -ten Box in Abhängigkeit von der Zeit, wobei Wendepunkt \diamond und Maximum $*$ markiert sind.

einer Box i zur Quelle führt zur Verringerung und zeitlichen Verzögerung seiner maximalen Fallen-Effizienz $f_{i,b}^{\max}$. Durch die asymmetrische Position der Quellboxen (dicht am linken Rand) ergeben sich Unterschiede in den Fallen-Effizienzen in den Boxen, die sich links (blau) der Quelle befinden, im Vergleich zu Boxen, die sich rechts (grau) der Quelle befinden.

Die Unterteilung der Regime der Gesamt-Fallen-Effizienz erfolgt nun auf der Grundlage der obigen Beobachtung. (1) Das erste Regime ist der Bereich, in dem sich jede einzelne Box i in einem bindedominierten Regime befindet. Es wird als reines bindedominiertes Regime bezeichnet. Erst mit dem Zeitpunkt t_1^* , zu dem die erste Box $i = 1$ ins produktionsdominierte Regime übergeht, findet ein Regimewechsel zum Mischregime statt. (2) Im Mischregime erreichen immer mehr Boxen i ihre maximale Fallen-Effizienz $f_{i,b}^{\max}$, bis die letzte Box zum Zeitpunkt t_{II}^* ihre Maximal-Fallen-Effizienz $f_{N,b}^{\max}$ erreicht hat (Abbildung 4.6 c, d). (3) Nach diesem Zeitpunkt t_{II}^* befinden sich alle Boxen im produktionsdominierten Regime, was zu einem reinen produktionsdominierten Regime für die Gesamt-Fallen-Effizienz $f_b(t)$ führt. Für lange Zeiten nimmt $f_{i,b}(t)$ mit $\frac{1}{t}$ ab, analog zu Gleichung (4.6) im Ein-Boxmodell. Durch die Diskretisierung in N Boxen und die begrenzten Quellbereiche ergibt sich für lange Zeiten eine Gesamt-Fallen-Effizienz von

$$\lim_{t \rightarrow \infty} f_b(t) = \frac{N}{Q} \frac{C_b^{\max}}{\alpha_{\text{prod}} t}, \quad (4.22)$$

mit der Anzahl an Quellboxen $Q = 8$ und einer homogenen Fallenverteilung $C_b^{\max} = C_{i,b}^{\max}$.

Abbildung 4.6 a zeigt einige Besonderheiten der Gesamt-Fallen-Effizienz $f_b(t)$: ein Maximum sowie mehrere Anstiegswechsel. Diese Beobachtung soll mit Hilfe von charakteristischen Punkten untersucht werden. Der erste charakteristische Punkt, das Maximum der Fallen-Effizienz f_b^{\max} , befindet sich bereits im Mischregime und kennzeichnet den Zeitpunkt kurz nach dem bindedominierten Regime. Zu diesem Zeitpunkt $t = 27 \cdot 10^3 \Delta t$ sind noch in keiner der Boxen alle Fallen gesättigt (Abbildung 4.6 b). Der Quellbereich ist mit einer Sättigung bis etwa 84% am stärksten besetzt. Der zweite charakteristische Punkt kennzeichnet den Bereich kurz vor dem Übergang ins produktionsdominierte Regime: Hier sind besonders im Bereich der Quellen alle Fallen gesättigt, je nach Parameterkombination sind die Fallen in den Boxen i , die weit von den Quellen entfernt sind, noch nicht all vollständig besetzt. Der dritte charakteristische Punkt befindet sich kurz hinter einem „Knick“ und

kennzeichnet den Übergang ins reine produktionsdominierte Regime. Somit können die charakteristischen Punkte der Gesamt-Fallen-Effizienz $f_b(t)$ als ungefähre Abschätzung für die oben beschriebenen Regime verwendet werden. Im Folgenden werden der Verlauf der Fallen-Effizienz $f_b(t)$ und die Verteilung der gebundenen Moleküle mit Hilfe dieser charakteristischen Zeitpunkte untersucht, was einen zeitunabhängigen Vergleich des Einflusses der unterschiedlichen Parameter erlaubt.

Charakteristika der Fallen-Effizienz

In Abbildung 4.7 sind die charakteristischen Zeitpunkte der Fallen-Effizienz $f_b(t)$ unter Variation verschiedener Parameter dargestellt. Hierfür wurde eine hohe Bindeaffinität von $\kappa_{\text{bin}} = 2 \cdot 10^{-2} \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, eine Diffusionsrate von $\tilde{D} = 8.3 \cdot 10^{-2} \Delta t^{-1}$ und eine Produktionsrate von $\alpha_{\text{prod}} = 2 \cdot 10^{-4} \mu\text{M} \Delta t^{-1}$ gewählt. In jeder Spalte dieser Abbildung wird einer dieser Parameter variiert, wobei jeweils alle anderen oben angegebenen Parameterwerte festgehalten werden.

In der ersten Spalte (Abbildung 4.7 a-d) erfolgt eine Variation der Bindeaffinität, wobei $\kappa_{\text{bin}} = 2 \cdot 10^{-2} \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, $2 \cdot 10^{-3} \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, $2 \cdot 10^{-4} \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$. Eine Verringerung der Bindeaffinität führt zu einem Abfall der maximalen Fallen-Effizienz f_b^{max} . Bei einer kleineren Bindeaffinität können auf Grund der wenigen Bindungen in den einzelnen Boxen mehr Moleküle in die Nachbarboxen diffundieren. So entsteht eine gute Durchmischung des Systems und ein geringerer Anstieg im bindedominierten Regime der Fallen-Effizienz $f_{i,b}(t)$ in den einzelnen Boxen i , wodurch der Regimewechsel bei der Betrachtung der Fallen-Effizienz $f_b(t)$ des Gesamtsystems weniger deutlich ist. Auch die Konzentration der gebundenen Moleküle (Abbildung 4.7 b) zum Zeitpunkt der maximalen Fallen-Effizienz zeigt, dass mit abnehmender Bindeaffinität die Verteilung der Moleküle breiter wird, was zu einem länger anhaltenden bindedominierten Regime führt. Hingegen führt eine Erhöhung der Bindeaffinität zu einer stärkeren Lokalisierung der Moleküle im Bereich der Quellen. Dies bedingt ein schnelleres Auffüllen der Fallen im Quellbereich.

Zum Zeitpunkt kurz vor dem Wechsel vom misch- zum produktionsdominierten Regime (Abbildung 4.7 c), sind bei einer hohen Bindeaffinität $\kappa_{\text{bin}} = 2 \cdot 10^{-2} \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ fast alle Bindestellen vollständig besetzt, außer in den letzten fünf Boxen³. Wohingegen bei einer geringen Bindeaffinität von $2 \cdot 10^{-4} \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ oder $2 \cdot 10^{-2} \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$

³96 Boxen sind mehr als 90% gesättigt

4. Fallen-Effizienz in Systemen mit einer Proteinuntereinheit

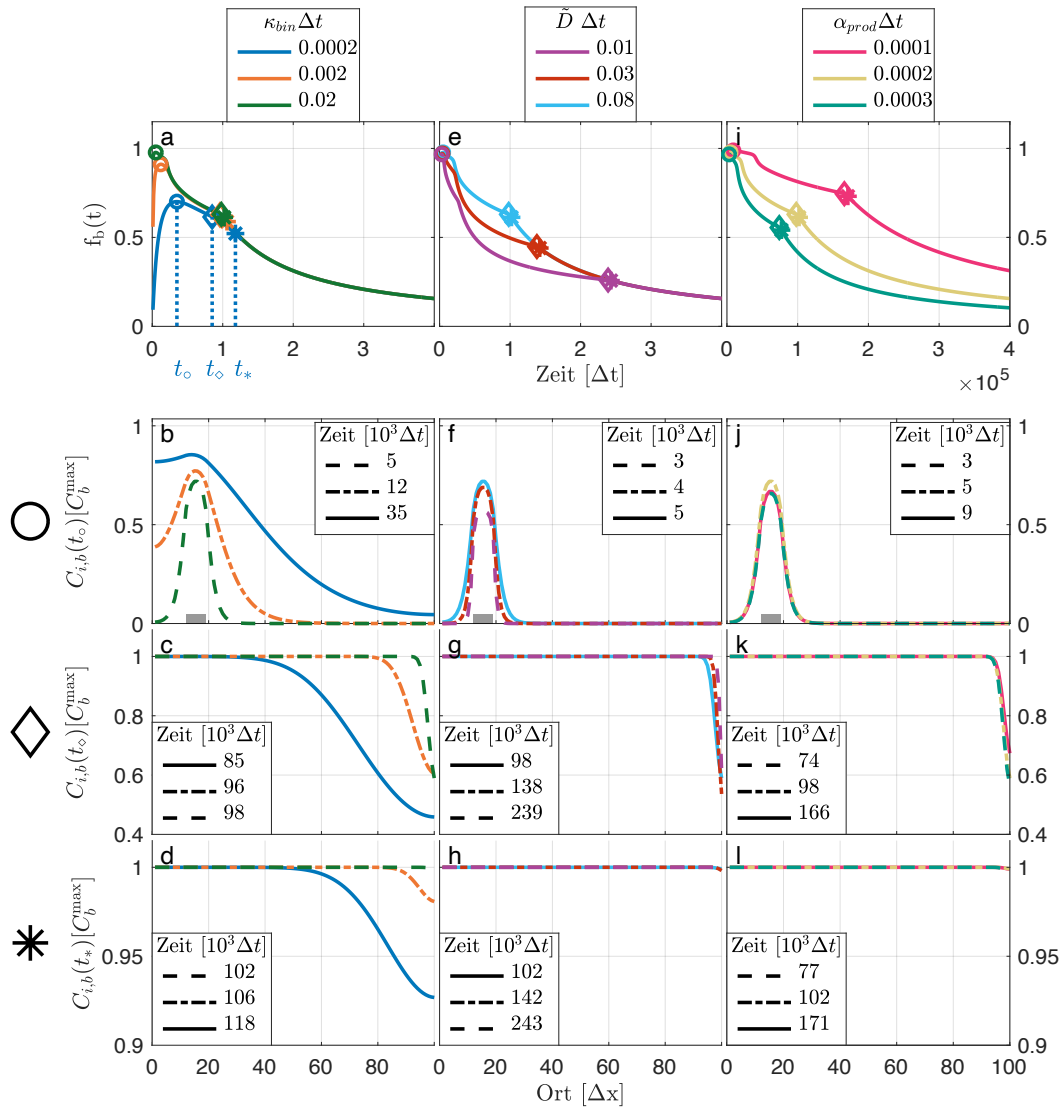


Abbildung 4.7.: Bindedynamik im 100-Boxensystem. Erste Zeile (a, e, i) zeigt die Fallen-Effizienz unter Variation der Parameter entsprechend der jeweiligen Legende. Sofern nicht explizit in der Legende erwähnt, gelten folgende Parameter: Produktionsrate $\alpha_{prod} = 2 \cdot 10^{-4} \mu\text{M} \Delta t^{-1}$, Bindeaffinität $\kappa_{bin} = 2 \cdot 10^{-2} \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ und Diffusionsrate $\tilde{D} = 8.3 \cdot 10^{-2} \Delta t^{-1}$. Zeilen zwei bis vier (b-d, f-h, j-l) zeigen die Ortsabhängigkeit der gebundenen Moleküle zu charakteristischen Zeiten, durch die Symbole \circ , \diamond und $*$ gekennzeichnet. Charakteristische Zeiten werden bestimmt aus dem Maximum der Gesamt-Fallen-Effizienz $f_b(t_0)$, dem Wendepunkt der Fallen-Effizienz $f_{N,b}(t_0)$ in Box N und dem Maximum der Fallen-Effizienz $f_{N,b}(t_*)$ in Box N . In Spalte eins (a-d) wird die Bindeaffinität κ_{bin} , in Spalte zwei (e-h) die Diffusionsrate \tilde{D} und in Spalte drei (j-l) die Produktionsrate α_{prod} variiert. Das graue Rechteck kennzeichnet den Ort der Quelle.

die ersten 57 bzw. 88 Boxen mehr als 90% der Sättigung erreicht haben. D.h. eine geringere Bindeaffinität bedingt eine breitere Verteilung des Sättigungsbereiches. Bei dem Wechsel ins produktionsdominierte Regime (Abbildung 4.7 d) sind alle Boxen mehr als 90% gefüllt. Bei einer hohen Bindeaffinität sind alle Boxen gefüllt, während bei geringer Bindeaffinitäten noch ein Auffüllen in den hinteren Boxen erfolgt.

Eine Verringerung der Diffusionsrate (Abbildung 4.7 e-h) \tilde{D} von $8.3 \cdot 10^{-2} \Delta t^{-1}$ auf $3 \cdot 10^{-2} \Delta t^{-1}$ und $9.8 \cdot 10^{-3} \Delta t^{-1}$ führt zu einer Verschiebung der maximalen Fallen-Effizienz $f_b(t)$ hin zu früheren Zeitpunkten und einer Verlängerung des Mischregimes (Abbildung 4.7 e). Der Einfluss auf die Verteilung der gebundenen Moleküle zu den charakteristischen Zeitpunkten ist jedoch gering (Abbildung 4.7 f-h). Es ist trotzdem zu erkennen, dass bei einer höheren Diffusion die Verteilung der gebundenen Moleküle breiter wird.

Auch eine Änderung der Produktionsrate α_{prod} führt zu einer zeitlichen Verschiebung der charakteristischen Punkte der Fallen-Effizienz $f_b(t)$ (Abbildung 4.7 j). Einer der deutlichsten Unterschiede im Vergleich zu der Veränderung der Binderate κ_{bin} und der Diffusionsrate \tilde{D} ist die Änderung des Abfalls im produktionsdominierten Regime, da $f_b(t)$ für große Zeiten mit $\frac{1}{\alpha_{\text{prod}} t}$ abfällt, siehe Gleichung (4.22).

4.4. Variation der Fallenverteilung

Inhomogenitäten in der Fallenkapazität können durch eine unvollständige Beschichtung der Oberfläche, eine beabsichtigte Fallenstrukturierung oder durch Verunreinigungen der Reaktionslösung, die die Fallen unspezifisch blockieren, entstehen. Die Genauigkeit der Fallenstrukturierung ist stark abhängig von der zum Auftragen der Fallen verwendeten experimentellen Methode. So können zum Beispiel bei der Photolithographie durch Streustrahlung der Quecksilberdampfampe mehr Bereiche des Biofilms aktiviert werden als gewollt, was zu einer unspezifischen Bindung der Fallen an die Systemoberfläche führt (Abschnitt 3.1).

Die bisherigen Analysen beziehen sich auf eine homogene Fallenverteilung mit einer unabhängigen maximalen Fallenkonzentration $C_{i,b}^{\text{max}} = 1 \mu\text{M}$ der gebundenen Moleküle in Box i . Die Modellierung einer inhomogenen Fallenkapazität erfolgt nun über eine lokal variierte $C_{i,b}^{\text{max}}$.

4. Fallen-Effizienz in Systemen mit einer Proteinuntereinheit

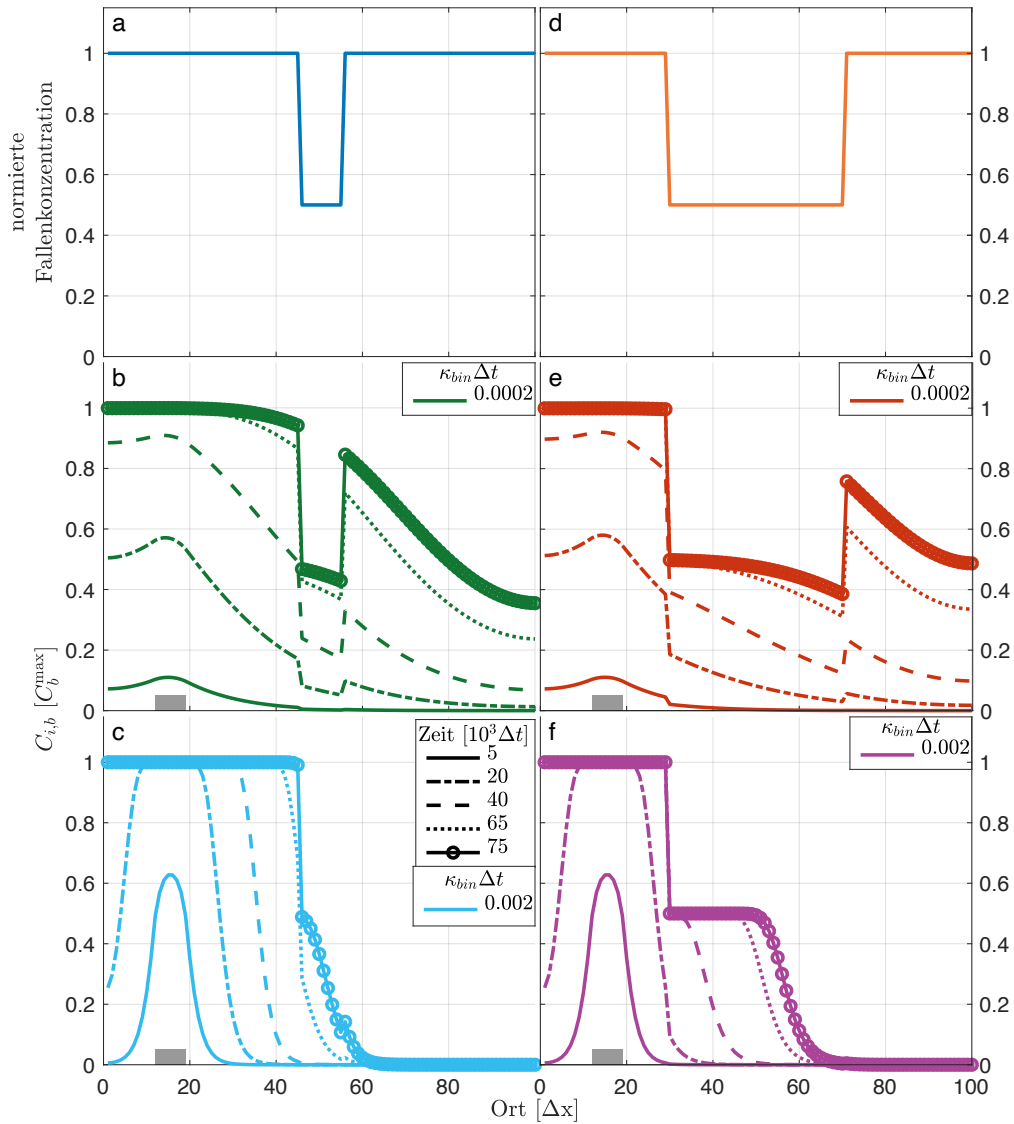


Abbildung 4.8.: 100-Boxensystem mit inhomogener Fallenverteilung. Betrachtung zweier unterschiedlicher Fallenverteilungen (a; d) und deren Einfluss auf die Entwicklung der Anzahl der gebundenen Moleküle (b-c; e-f). Die beiden Spalten (b-c; e-f) zeigen die Entwicklung bei einer bestimmten Fallen-Effizienz (a; d) und verschiedene Bindeaffinitäten κ_{bin} (farbig gekennzeichnet in der Legende). Die zeitliche Entwicklung (siehe Legende der Zeitpunkte in c) wird durch die Linien dargestellt. Der Quellbereich ist grau gekennzeichnet. Weitere Parameter siehe Anhang Tabelle A.8.

Am Beispiel von zwei inhomogenen Fallenverteilungen soll deren Einfluss auf die Verteilung der gebundenen Moleküle an der Oberfläche untersucht werden. Hier wird unterschieden zwischen einer schmalen Fehlstelle (Abbildung 4.8 a) von Box $i = 46$ bis 55 und einer breiten Fehlstelle (Abbildung 4.8 b) im Bereich $i = 30$ bis 70. Beide Fehlstellen besitzen nur die Hälfte der ursprünglichen Konzentration an Fallen C_b^{\max} in Box i . Mit einer Produktionsrate $\alpha_{\text{prod}} = 2 \cdot 10^{-4} \mu\text{M} \Delta t^{-1}$, einer Binderate $\kappa_{\text{bin}} = 2 \cdot 10^{-4} \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ und einer Diffusionsrate $\tilde{D} = 8.3 \cdot 10^{-2} \Delta t^{-1}$ ergibt sich im Vergleich zur Binderate starken Diffusion eine recht homogene Verteilung der gebundenen Moleküle $C_{i,b}(t)$ an der Oberfläche. Dies führt dazu, dass bereits zu frühen Zeiten die Strukturierung der Fallen sichtbar werden (Abbildung 4.8 c, d). Mit zunehmender Anzahl der Moleküle im System wird der Fallendefekt deutlicher. Somit werden Fallendefekte, die sich dicht an der Quelle befinden, früher sichtbar (Abbildung 4.8). Dieser Effekt lässt sich beim Vergleich der unterschiedlichen Fallendefekte in Abbildung 4.8 b, e zum Zeitpunkt $20 \cdot 10^3 \Delta t$ deutlich erkennen. Breite Fallendefekte, die sich dicht an den Quellbereichen befinden, erlauben somit eine frühzeitigere und bessere Sichtbarkeit des Defektes als schmale Bereiche, die sich weit entfernt davon befinden.

In Abbildung 4.8 c, f ist die Binderate⁴ vergleichsweise groß. Dadurch wird eine sehr lokalisierte Verteilung der gebundenen Moleküle erreicht. Durch den steilen Anstieg der Verteilung der gebundenen Moleküle, bedingt durch die geringe Anzahl an freien Molekülen im Bereich des Fallendefekts, wird der Defekt erst sichtbar, wenn die Fallen vor der Fehlstelle fast vollständig gesättigt sind.

Der Vergleich der unterschiedlichen Verhältnisse aus Binderate und Diffusionsrate der zweiten (Abbildung 4.8 b, e) und dritten Zeile (Abbildung 4.8 c, f) zeigt somit, dass eine höhere Diffusionsrate im Vergleich zu Binderate eine frühzeitigere Identifizierung der Fallendefekte erlaubt. Für eine quantitative Analyse des Einflusses des Abstands zwischen Quellen und Fallendefekt werden im nächsten Abschnitt die Fallenbereiche gleich groß gewählt und lediglich der Abstand zwischen den Fallen verändert.

⁴Die Binderate beträgt $\kappa_{\text{bin}} = 2 \cdot 10^{-3} \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ und die Diffusionsrate $\tilde{D} = 9.8 \cdot 10^{-3} \Delta t^{-1}$.

4.5. Variation des Abstandes von Translationsort und Fallen

Der Abstand zwischen Translationsort (Quelle) und örtlich begrenzten Fallenbereich mit fester Breite wird variiert. Der Fallenbereich ist 8 Boxen breit und hat einen Abstand von 0, 4, 7, 12 und 32 Boxen zum Rand des Translationsbereichs. Mit diesem Aufbau kann im speziellen der Einfluss der Änderung des Abstandes zwischen Quell- und Fallenbereich auf die Gesamtkonzentration $C_b(t)$ gebundener Moleküle untersucht werden (Abbildung 4.9, erste Zeile: a, d, g). Zusätzlich wird die Verteilung der gebundenen Moleküle entlang des Systems zu unterschiedlichen Zeitpunkten gezeigt (Abbildung 4.9 zweite und dritte Zeile: b, e, h; c, f, i). Hierbei wird in den Spalten von links nach rechts das Verhältnis aus Bindeaffinität zu Diffusionsrate verringert. Eine geringe Diffusionsrate und eine hohe Bindeaffinität (Abbildung 4.9 a-c) führt zu einer hohen Anzahl an gebundenen Molekülen im dicht benachbarten Quellbereich, im Gegensatz zu davon weit entfernten Fallenbereichen. Eine Erhöhung der Diffusion (Abbildung 4.9 d-f) der freien Moleküle führt erwartungsgemäß zu einer breiteren Verteilung der gebundenen Moleküle bis in die hinteren Fallenbereiche hinein. Eine deutliche Erhöhung der Diffusionsrate und eine Verringerung der Bindeaffinität (Abbildung 4.9 g-e) führen zu einer noch gleichmäßigeren Verteilung der gebundenen Moleküle entlang des Systems. Mit der Erhöhung des Abstandes zwischen der Quelle und Fallenbereich verringert sich die Anzahl an gebundenen Molekülen (Abbildung 4.9). Bei einer hohen Bindeaffinität im Vergleich zur Diffusion erhält man eine inhomogene Verteilung der gebundenen Moleküle innerhalb der Fallenbereiche (Abbildung 4.9 b-c), wohingegen eine geringe Bindeaffinität im Vergleich zur Diffusionsrate eher eine gleichmäßigere Verteilung der gebundenen Moleküle bewirkt (Abbildung 4.9 i).

Im Allgemeinen lässt sich feststellen, dass allein die Gesamtanzahl der gebundenen Moleküle im System – die sich im Experiment z.B. über die Intensität des Fluoreszenzsignals ausdrückt – eine Aussage liefert über das Verhältnis aus der Bindeaffinität und der Diffusionsrate. Die Einbeziehung der zeitlichen Abhängigkeit in Abbildung 4.9 a, d, g (farblich dargestellt) zeigt, dass auf Grund der Limitierung der Fallen ein zeitabhängiger Wechsel des Vorzeichens der Kurvenkrümmung erfolgen kann. So lässt sich zum Beispiel in Abbildung 4.9 a ein Wechsel von einem konkaven (rot) zu einem konvexen (blau) Kurvenverlauf erkennen. Mit der Verringerung des Verhältnisses aus Bindeaffinität zu Diffusionsrate wird dieser Wechsel immer weniger deutlich (Abbildung 4.9 d, g).

4.5. Variation des Abstandes von Translationsort und Fallen

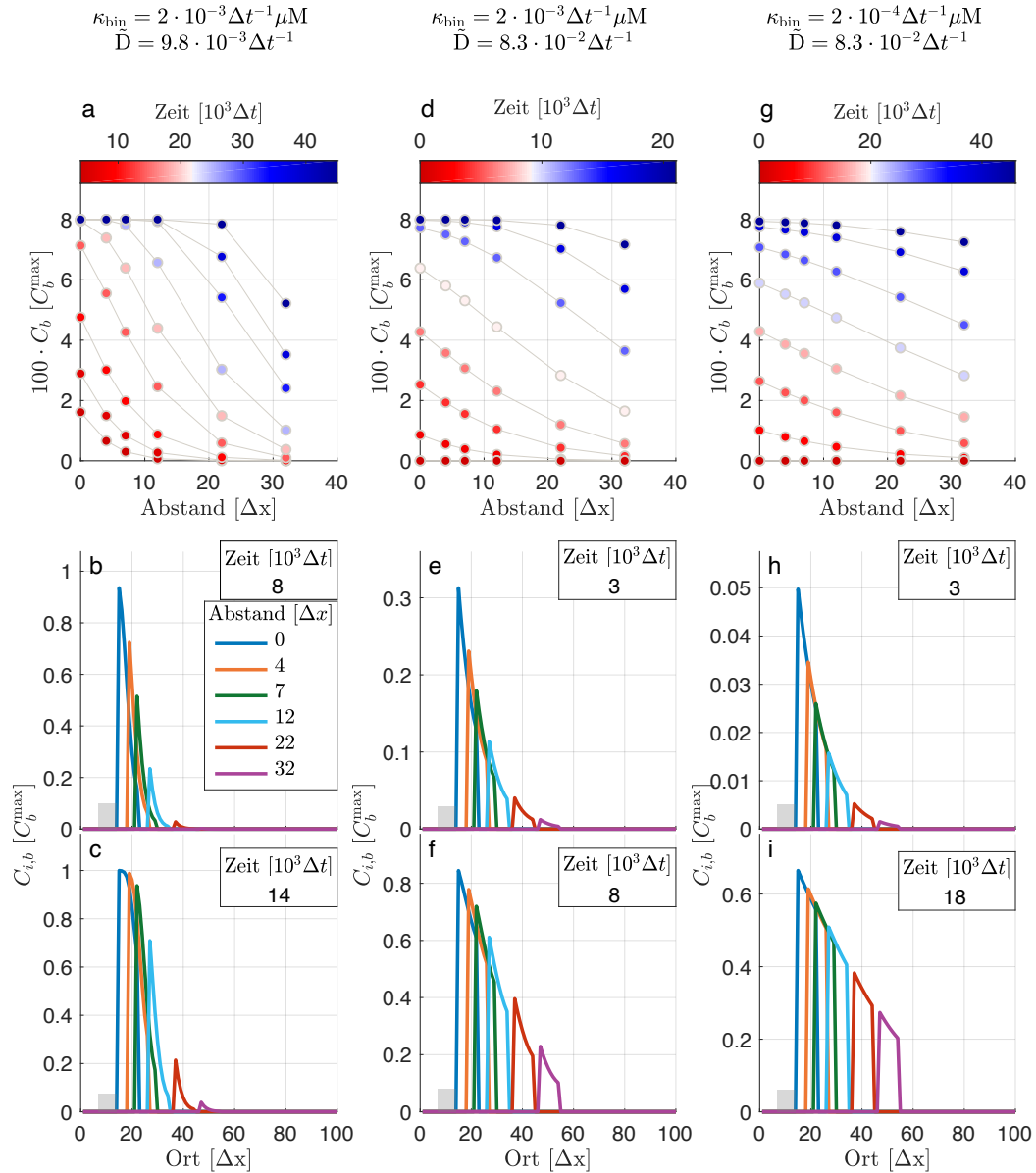


Abbildung 4.9.: Einfluss von Diffusionsrate und Bindeaffinität bei inhomogener Fallenverteilung.

Zeile eins (a, d, g) zeigt die Gesamtkonzentration C_b der gebundenen Moleküle in Abhängigkeit vom Abstand zwischen Fallenbereich und Quelle (graues Rechteck). Die Zeitpunkte sind durch die Schattierung der Marker gekennzeichnet, wobei der Farbwechsel von rot nach blau den Übergang der Kurvenkrümmung von konkav zu konvex kennzeichnet. Zeilen zwei und drei (b, c, e; f, h, i) zeigen die räumliche Verteilung der gebundenen Moleküle $C_{i,b}$ für Zeitpunkte entsprechend der jeweiligen Legende. Dabei werden folgende Fälle unterschieden: langsame Diffusion bei starker Bindung (a-c; $\kappa_{\text{bin}} = 2 \cdot 10^{-3} \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, $\tilde{D} = 9.8 \cdot 10^{-3} \Delta t^{-1}$), schnelle Diffusion bei starker Bindung (d-f; $\kappa_{\text{bin}} = 2 \cdot 10^{-3} \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, $\tilde{D} = 8.3 \cdot 10^{-2} \Delta t^{-1}$), schnelle Diffusion bei geringer Bindung (g-i; $\kappa_{\text{bin}} = 2 \cdot 10^{-4} \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, $\tilde{D} = 8.3 \cdot 10^{-2} \Delta t^{-1}$). Für weitere Parameterwerte siehe im Anhang Tabelle A.9.

4.6. Erhöhung der Fallenkapazität

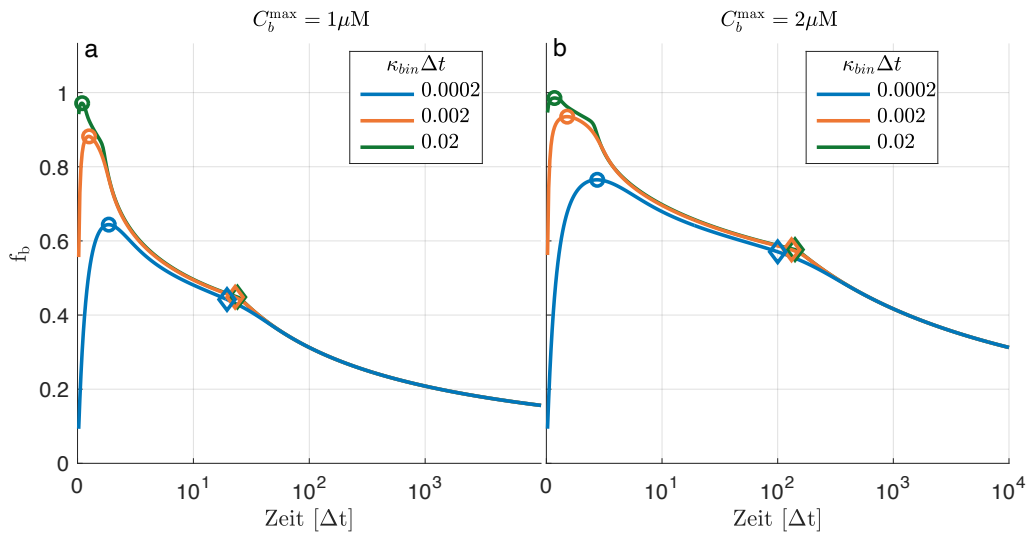


Abbildung 4.10.: Eine Erhöhung der Fallen-Kapazität bewirkt eine Erhöhung der Fallen-Effizienz und eine Ausdehnung des bindedominierten Regimes und Mischregime. Darstellung der Gesamt-Fallen-Effizienz $f_b(t)$ mit einer Fallen-Kapazität von (a) $C_b^{\max} = 1 \mu\text{M}$ und (b) $C_b^{\max} = 2 \mu\text{M}$. Charakteristische Punkte beschreiben den Zeitpunkt: (o) des Maximums der Fallen-Effizienz, (\diamond) Wendepunkt der Fallen-Effizienz in Box N . Die Darstellung der Verteilung der gebundenen Moleküle zu den für die Fallen-Effizienz charakteristischen Zeitpunkt befindet sich im Anhang Abbildung C.3

Im Folgenden wird der Einfluss der Erhöhung der Fallenkapazität, bei einer homogenen Fallenverteilung und einer Fallenkapazität von $C_b^{\max} = 1 \mu\text{M}$ zu $C_b^{\max} = 2 \mu\text{M}$ für $i = 1, \dots, 100$, genauer betrachtet (Abbildung 4.10). Durch die, wie bereits oben beschriebene, konstante Produktionsrate α_{prod} wächst die Gesamtkonzentration $C_{\text{ges}}(t)$ der Moleküle im System linear mit der Zeit an (im Anhang Abbildung C.3 b, e). Die Anzahl der im Gesamtsystem gebundenen Moleküle $C_b(t)$ hängt hingegen von mehreren Parametern (Binderate κ_{bin} , Diffusionsrate \tilde{D} , Produktionsrate α_{prod}) und insbesondere von der Fallenkapazität $C_{i,b}^{\max}$ ab (im Anhang Abbildung C.3 b, e). Mit einer Erhöhung der Fallenkapazität geht eine erhöhte Effizienz der Bindungen an die Oberfläche einher (siehe Abbildung 4.10) und die Sättigung der Fallen tritt später auf. Außerdem bewirkt eine Erhöhung der Fallenkapazität eine zeitliche Ausdehnung der Regime der Fallen-Effizienz (Abbildung 4.10). Die Verteilung der gebundenen Moleküle zu den charakteristischen Zeitpunkten hat hingegen den gleichen Verlauf und unterscheidet sich lediglich um den Skalenfaktor C_b^{\max} (im Anhang Abbildung C.3 c, f). Die charakteristischen Zeitpunkte zeigen, obwohl unterschiedliche Fallenkapazitäten angenommen werden, ähnliche Verteilung

lungen der gebundenen Moleküle (im Anhang Abbildung C.3). Somit ermöglichen die charakteristischen Zeitpunkte das System zeitunabhängig zu betrachten.

4.7. Modellvalidierung

Für die Validierung des Modells wurde das in Kapitel 3 beschriebene Experiment⁵ durchgeführt [54], unter Einbezug zweier Messverfahren, bei denen jeweils unterschiedliche Proteintypen verwendet wurden. Bei dem ersten Messverfahren wurde die Konzentration der DNA-Bürsten von gp10 verändert und die Intensität des Fluoreszenzsignals (entspricht der relativen Anzahl an gebundenen Molekülen) nach 2 h aufgenommen (Abbildung 4.11). Die Variation der Konzentration der DNA-Bürsten im Experiment von 25% und 100% entspricht im Modell (Abschnitt 4.3) einer veränderlichen Produktionsrate α_{prod} . Das Fitting der experimentellen Daten mit dem Modell erfolgt durch eine sequentielle Minimierung der Summe der Residuenquadrate (SSE). Zunächst wird die Produktionsrate α_{prod} in einem bestimmten Bereich eingeschränkt, in dem nach einer Zeit von ungefähr 2 h die Ausdehnung des Plateaus betrachtet wird. Eine ungefähre Abschätzung der Diffusionsrate \tilde{D} aus der Literatur schränkt dessen Bereich für das Fitting ein. Die anschließende Variation des Verhältnisses aus Bindeaffinität κ_{bin} und Diffusionsrate \tilde{D} bestimmt die Steigung der Verteilung der gebundenen Moleküle nach dem Plateau. Der Vergleich von Theorie und Experiment zeigt, dass das Modell eine gute Vorhersage über die Verteilung der an der Oberfläche gebundenen Moleküle liefert (Abbildung 4.11). Beide experimentellen Verteilungen konnten mit einem einzigen Parametersatz unter Variation der Produktionsrate gefittet werden. Die so gefundene Parameterkombination wird später bei der Betrachtung der Proteinkomplexbildung in Abschnitt 5.4 Verwendung finden ($\alpha_{\text{prod}}\Delta t = 2 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$, $\kappa_{\text{bin}}\Delta t = 2 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}$, $\tilde{D}\Delta t = 0.045$; Anhang Tabelle A.12).

Eine Anpassung der experimentellen Technik (Abschnitt 3.2) erlaubt unseren Kooperationspartnern die summierte Verteilung von gebundenen und ungebundenen Molekülen zu betrachten. Im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen Experiment wird hierbei das Protein GFP synthetisiert, da diese Versuchsanordnung autofluoreszierende Proteine benötigt ([54], [i. V. 74]). Es wurden Fallen in unterschiedlichen

⁵Die *in vitro* Experimente sind durch die Gruppe von Roy Bar-Ziv geplant und durchgeführt worden. Alle theoretischen Betrachtungen wie z. B. Modellbildung, Validierung des Modells sind Bestandteil dieser Arbeit.

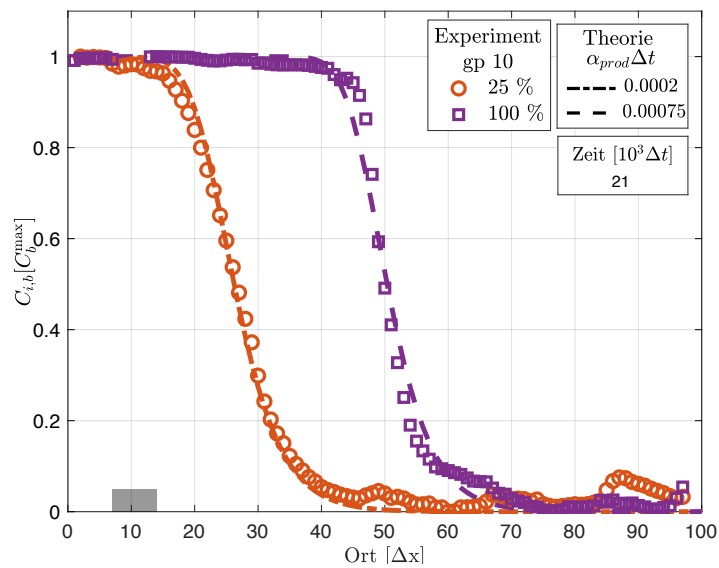


Abbildung 4.11.: Verteilung der gebundenen gp10 Proteine. Fitting der experimentellen Daten mittels Simulationen vom Modell in Abschnitt 4.3; gebundene gp 10 Proteine an der Oberfläche für zwei unterschiedliche Konzentrationen an DNA-Bürsten 25% und 100 %; experimentelle Daten (\circ und \square). Simulationsdaten Fitting mit einem Datensatz Änderung der Produktionsrate α_{prod} der Moleküle zur Simulation der unterschiedlichen DNA-Bürsten Konzentration. Das graue Rechteck kennzeichnet den Ort der Quelle. Die Parameter sind im Anhang Tabelle A.12 zu finden.

Konzentrationen auf den Biochip aufgebracht. Wir unterscheiden dabei zwischen Fallenverteilungen⁶:

- I bei der sich im Quellbereich eine geringe Anzahl an Fallen befindet,
- II einer einfachen Fallenkonzentration und
- III einer doppelten Fallenkonzentration.

Das Modell ermöglicht sowohl eine Betrachtung der Verteilung der gebundenen als auch der ungebundenen Moleküle. Eine separate Betrachtung der gebundenen und ungebundenen Moleküle ist mit dem experimentellen Messverfahren allein nicht möglich. Die Betrachtung der zeitlichen Entwicklung der summierten Verteilung gebundenen und ungebundenen Moleküle erfolgt in den Simulationen unter Verwendung eines einzigen Parametersatzes, aber unter Variation der Fallenverteilung (in Abbildung 4.12). Die experimentellen Daten sind auf das Maximum der Kurvenverteilung nach 2 h normiert (Abbildung 4.13). Der Vergleich zwischen Theorie und Experiment zeigt, dass insbesondere zu den frühen Zeiten (Abbildung 4.12 a, b, c, Abbildung 4.13 a, b, c) das Modell das Experiment gut abbilden kann. Sowohl Theo-

⁶Die unterschiedlichen Fallenverteilungen werden im Experiment durch die Aktivierung des Biochips an unterschiedlichen Stellen erzeugt siehe Anhang Abbildung C.4 und Abschnitt 3.1.

rie als auch Experiment zeigen bei einer geringen Fallenkapazität eine „rechteckige“ Verteilung der Proteine. Eine hohe Fallenkapazität (Abbildung 4.12 c, Abbildung 4.13 c) liefert eine eher glockenförmige Verteilung. In Abbildung 4.12 a zeigt das Modell eine etwas ungenauere Abschätzung, da auf Grund des experimentellen Setups die Fallenverteilung⁷ und -kapazität nicht genau bekannt ist. Die erste experimentelle Messmethode, bei der nur die gebundenen Moleküle gemessen werden, kann verwendet werden, um eine bessere Abschätzung für die tatsächliche Fallenverteilung zu erhalten.

Für die Verteilung der Proteine zu späteren Zeitpunkten liefert das Modell eine ungenauere Abschätzung (Abbildung 4.12 b, d, f; Abbildung 4.13 b, d, f). Ein Grund kann hierbei die im Modell angenommene lineare Erzeugung der Proteine sein. Eine Beobachtung der Anzahl an freien Proteinen und gebundenen Proteinen im Experiment zeigt jedoch eine nichtlineare Abhängigkeit der Syntheserate von der Zeit (im Anhang Abbildung F.2). Im Experiment gibt es zunächst einen langsamen Anstieg der Proteinkonzentration, da die für die Synthese eines Proteins benötigten molekularen Maschinen erst in den Bereich der DNA-Bürsten diffundieren müssen. Anschließend wächst die Gesamtkonzentration der Moleküle zunächst exponentiell an und verläuft zwischen 30 und 90 min annähernd linear. Für längere Zeiten führt das Aufbrauchen der Substrate zu einer verlangsamten Proteinsynthese (im Anhang Abbildung F.2). Ein weiterer Grund für Abweichungen zwischen Theorie und Experiment zu späteren Zeitpunkten liegt in der Beobachtung mittels eines inversen Lichtmikroskops. So ist die Intensität des Fluoreszenzsignals der freien Moleküle scheinbar schwächer als die des Fluoreszenzsignals der an der Oberfläche gebundenen Moleküle. Diese Vermutung wird gestützt durch die Beobachtung, dass sich im Experiment scheinbar die Gesamtanzahl der Proteine im System mit der Fallenkapazität ändert (im Anhang Abbildung F.2). Die Fallenkapazität sollte jedoch keinen Einfluss auf die Gesamtanzahl der Proteine im System haben.

⁷Eine Vorstellung von der Fallenverteilung lässt sich mit der Betrachtung des experimentellen Setups im Anhang in Abbildung C.4 gewinnen.

4. Fallen-Effizienz in Systemen mit einer Proteinuntereinheit

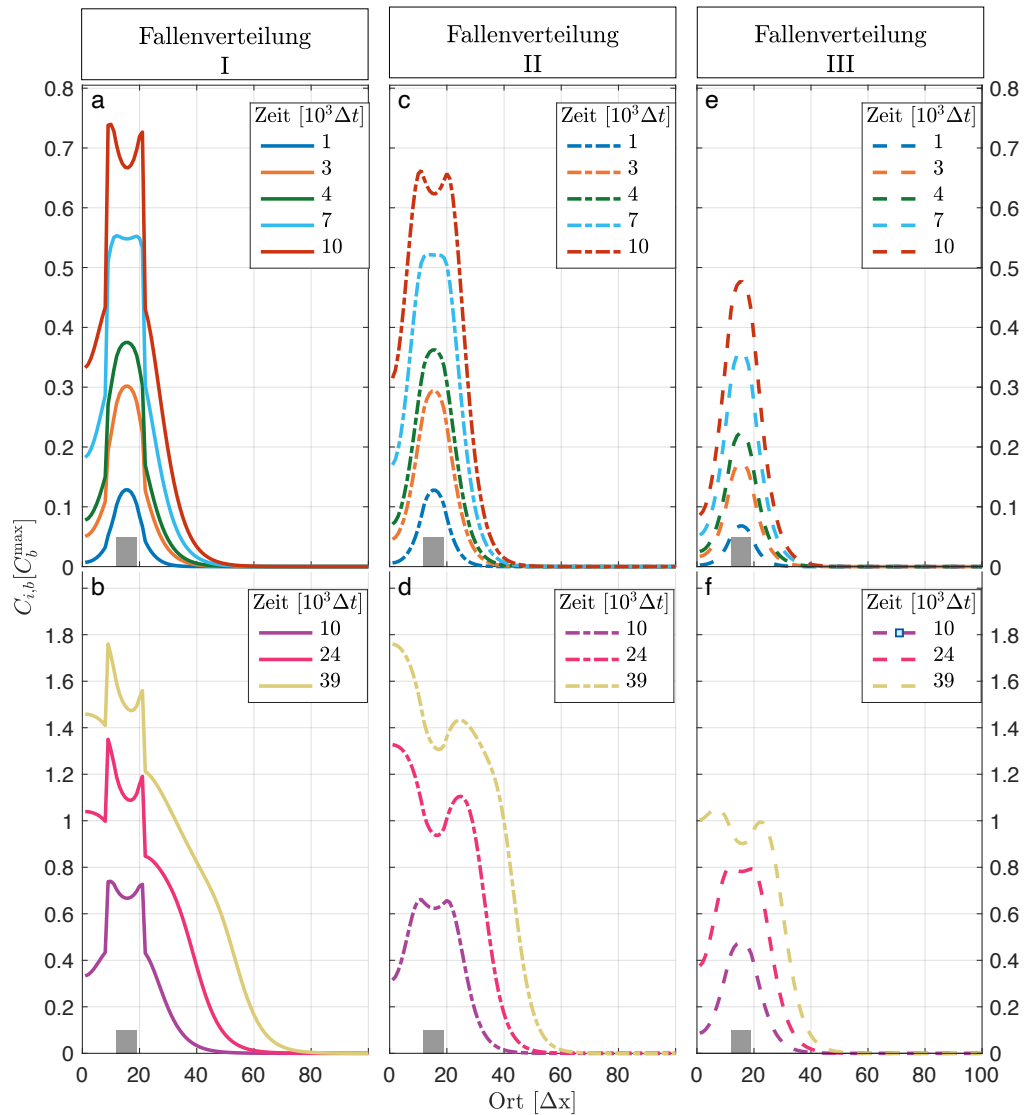


Abbildung 4.12.: Theoretische Betrachtung des Einflusses der Fallenkapazität auf die Verteilung der freien und der an der Oberfläche gebundenen Proteine in Abhängigkeit vom Ort. Die Spalten zeigen die unterschiedliche Fallenverteilungen (I): inhomogene Fallenverteilung, (II) mit einer Fallenkapazität von $C_{i,b}^{\max} = 1 \mu\text{M}$. (III) $C_{i,b}^{\max} = 2 \mu\text{M}$. Das graue Rechteck kennzeichnet den Ort der Quelle. Weitere Parameter siehe Anhang Tabelle A.11.

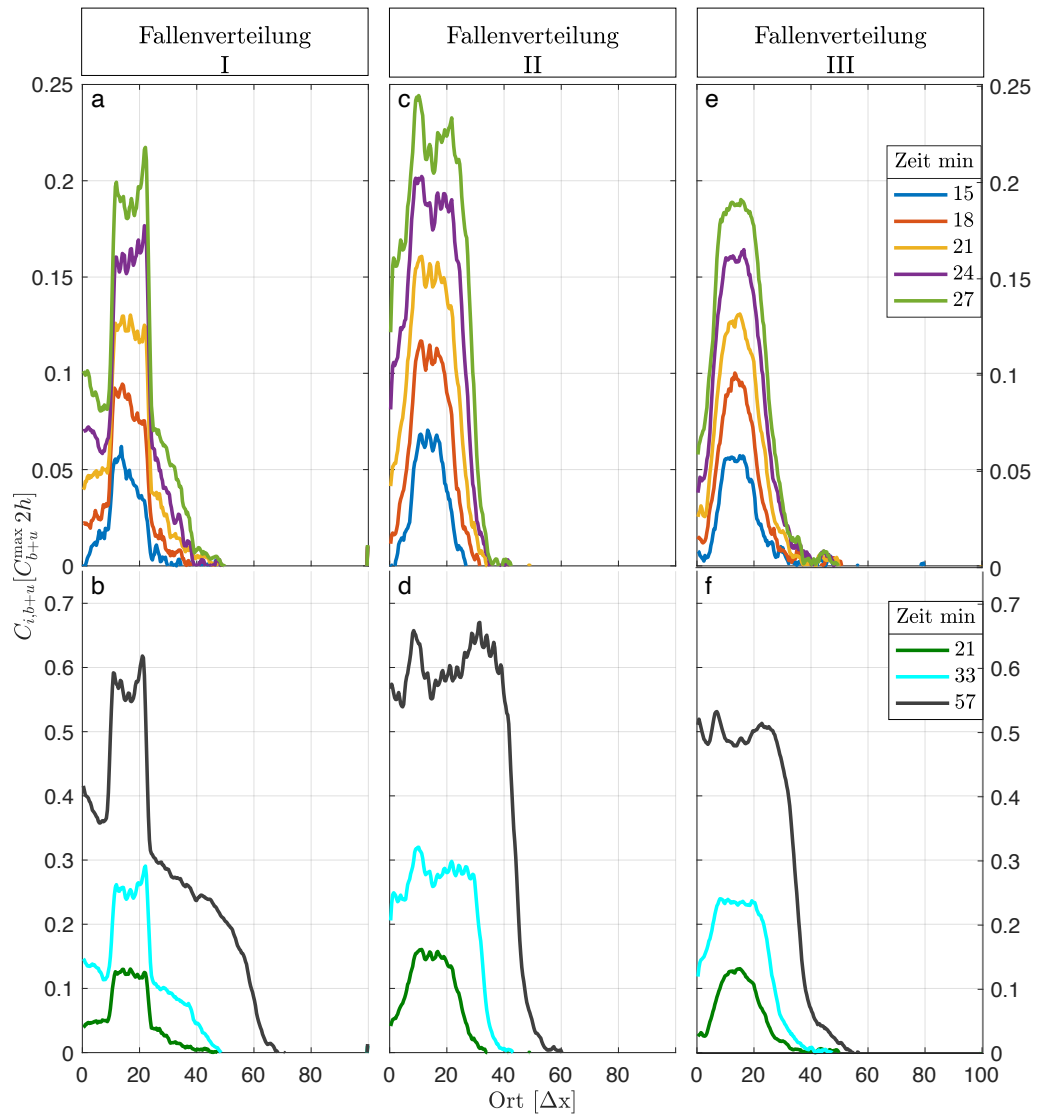


Abbildung 4.13.: Experimentelle Betrachtung des Einflusses der Fallenkapazität auf die Verteilung der freien und der an der Oberfläche gebundenen Proteine in Abhängigkeit vom Ort. Die Spalten zeigen die unterschiedlichen Fallenkapazitäten $C_{i,b}^{\max}$ (a-b): $C_{i,b}^{\max} \leq 1 \mu\text{M}$, (c-d) $C_{i,b}^{\max} = 1 \mu\text{M}$. (e-f) $C_{i,b}^{\max} = 2 \mu\text{M}$. Unterschiedlichen Zeitpunkte sind in der Legende dargestellt. C_{b+u}^{\max} , $C_{i,b+u}$

Kapitel 5

Oberflächen- vs. Lösungsassemblierung in Systemen mit zwei Proteinuntereinheiten

Das folgende Kapitel betrachtet die Dynamik der Proteinkomplexbildung, wobei zwei Assemblierungspfade unterschieden werden. Dafür wird das in Abschnitt 4.3 beschriebene System durch eine zweite Proteinuntereinheit erweitert, was die Betrachtung der Assemblierung von Proteinkomplexen erlaubt. In den Experimenten unseres Kooperationspartners, der Gruppe von Roy Bar-Ziv¹, werden hierfür zwei verschiedene DNA-Bürsten lokalisiert auf die Oberfläche des Biochips aufgebracht, die die unterschiedlichen Proteintypen (gp10, gp7) codieren. Um ein besseres Verständnis des Einflusses verschiedener physikalischer Parameter auf den Assemblierungsprozess zweier Proteintypen zu einem Komplex zu erhalten, wird der in Kapitel 3 beschriebene experimentelle Aufbau *in silico* nachgebildet. Die Lösung dieses numerischen Systems nutzt das in Abschnitt 2.2 beschriebene Verfahren (RvD Modell). In Verbindung mit den Experimenten wird der Einfluss des Abstands zwischen den Translationsorten auf die Verteilung der an der Oberfläche gebundenen Proteinkomplexe auf die Dominanz der Assemblierungspfade sowie auf die Effizienz der Komplexbindung diskutiert.

Teile der in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse wurden in Referenz [54] veröffentlicht.

¹Abteilung für Materialien und Grenzflächen, Helen & Martin Kimmel Zentrum für Nanowissenschaft, Weizmann Institut Rehovot

5.1. Modellierung der Proteinkomplexbildung

Es wird die Bildung von Komplexen aus den Proteinpopulationen \mathcal{A} (*gp10*) und \mathcal{B} (*gp7*) und deren Bindung an Fallen (*gp11*) untersucht. Die Quellen für Proteine \mathcal{A} und \mathcal{B} befinden sich in den Bereichen, in denen die Proteintypen *gp10* und *gp7* synthetisiert werden. Zu Beginn sind alle Fallen frei und es befinden sich keine Proteine \mathcal{A} und \mathcal{B} im System. Die Synthese der Proteine \mathcal{A} und \mathcal{B} erfolgt durch die jeweilige Quelle mit den Produktionsraten $\alpha_{\mathcal{A}}$ und $\alpha_{\mathcal{B}}$. Die Proteine \mathcal{A} und \mathcal{B} diffundieren entweder frei in der Lösung mit Diffusionsrate $\tilde{D}_{\mathcal{A}}$, $\tilde{D}_{\mathcal{B}}$ oder binden in der Lösung zu einem Komplex \mathcal{AB} . Der Komplex \mathcal{AB} diffundiert mit einer Diffusionsrate von $\tilde{D}_{\mathcal{AB}}$ oder bindet mit einer Bindeaffinität von $\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{AB}}$ an die Fallen. Der soeben beschriebenen Assemblierungspfad für die in Lösung assemblierten Komplexe wird als *lösungsassembliert* bezeichnet. Ein weiterer Assemblierungspfad der Komplexbildung ist die *Oberflächenassemblierung*. Hier bindet das Protein \mathcal{A} mit einer Binderate $\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}}$ an eine freie Falle \mathcal{F} . Dadurch ist Protein \mathcal{A} an der Oberfläche immobilisiert und kann nur noch durch Bindung eines frei diffundierenden Proteins \mathcal{B} , mit Binderate κ_{\circ} , zur Komplexbildung beitragen. Auf diesem Weg entsteht ein neuer *oberflächenassemblierter* Proteinkomplex ($(\mathcal{FA})\mathcal{B}$). Durch die Verfolgung der Assemblierungspfade und die Berücksichtigung aller genannten Spezies und ihrer Kombinationen kann im Modell im Gegensatz zum Experiment zwischen *oberflächen-* und *lösungsassemblierten* Komplexen unterschieden werden. Zur Veranschaulichung sind die im Modell betrachteten Reaktionen im Folgenden in einem Reaktionsschema dargestellt:

- Erzeugung von Proteinen \mathcal{A} und \mathcal{B}

$$\emptyset \xrightarrow{\alpha_{\mathcal{A}}} \mathcal{A} \qquad \emptyset \xrightarrow{\alpha_{\mathcal{B}}} \mathcal{B}$$
- Assemblierung von Proteinen \mathcal{A} und \mathcal{B} zu gebundenen Komplexen $\mathcal{F}(\mathcal{AB})$ und $(\mathcal{FA})\mathcal{B}$

<i>oberflächenassembliert:</i> $\mathcal{F} + \mathcal{A} \xrightarrow{\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}}} \mathcal{FA}$ $\mathcal{FA} + \mathcal{B} \xrightarrow{\kappa_{\circ}} (\mathcal{FA})\mathcal{B}$	<i>lösungsassembliert:</i> $\mathcal{A} + \mathcal{B} \xrightarrow{\kappa_1} \mathcal{AB}$ $\mathcal{F} + \mathcal{AB} \xrightarrow{\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{AB}}} \mathcal{F}(\mathcal{AB})$
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Das oben beschriebene System ist im Experiment auf einem Biochip mit gleicher Geometrie wie im 100-Boxenmodell (Abschnitt 4.3) realisiert. Die schematische

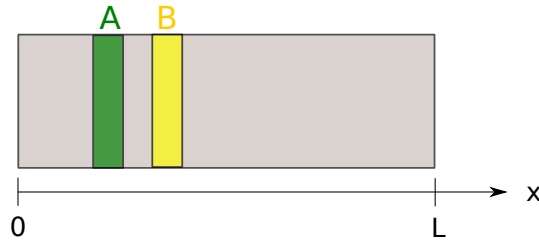


Abbildung 5.1.: Schematische Darstellung der 2D Geometrie (x-y Ebene) des Biochips. Farblich eingezeichnet sind die Quellbereiche der Proteine \mathcal{A} (grün) und des Proteine \mathcal{B} (gelb). Der Chip hat in x-Richtung die Länge L .

Darstellung in Abbildung 5.1 zeigt die Ausdehnung eines Chips Länge L in x -Richtung und die Positionen der Quellbereiche für Protein \mathcal{A} und Protein \mathcal{B} . Die dargestellte 2D Geometrie kann nochmals vereinfacht werden durch die Vernachlässigung der wechselseitigen sterischen Hinderung der Proteine. Dies erlaubt eine Reduzierung des Modells durch eine Projektion der kurzen Achse ("y") auf die lange Achse ("x"). Die zeitliche Entwicklung der sieben verschiedenen Spezies, die oben eingeführt wurden, lassen sich somit durch ein System aus sieben Differentialgleichungen erster Ordnung beschreiben. Die Lösung des Systems erfolgt mittels des RvD Modells (siehe Abschnitt 2.2). Hierfür werden der Ort in Boxen mit Größe Δx und die Zeit in Zeitschritte Δt diskretisiert. Die Positionen und Dimensionen der Quellen der Proteine \mathcal{A} , \mathcal{B} werden wie im 100-Boxenmodell (Abschnitt 4.3) über die Iverson-Klammer beschrieben.

$$\frac{dC_{i,\mathcal{F}}(t)}{dt} = -\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}}C_{i,\mathcal{A}}(t) \cdot C_{i,\mathcal{F}}(t) - \kappa_{\mathcal{F},\mathcal{AB}}C_{i,\mathcal{F}}(t) \cdot C_{i,\mathcal{AB}}(t), \quad (5.1a)$$

$$\frac{dC_{i,\mathcal{FA}}(t)}{dt} = \kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}}C_{i,\mathcal{A}}(t) \cdot C_{i,\mathcal{F}}(t) - \kappa_o C_{i,\mathcal{FA}}(t) \cdot C_{i,\mathcal{B}}(t), \quad (5.1b)$$

$$\frac{dC_{i,(\mathcal{FA})\mathcal{B}}(t)}{dt} = \kappa_o C_{i,\mathcal{FA}}(t) \cdot C_{i,\mathcal{B}}(t), \quad (5.1c)$$

$$\frac{dC_{i,\mathcal{F}(\mathcal{AB})}(t)}{dt} = \kappa_{\mathcal{F},\mathcal{AB}}C_{i,\mathcal{F}}(t) \cdot C_{i,\mathcal{AB}}(t) \quad (5.1d)$$

für $i = 1, \dots, N$

$$\frac{dC_{i,\mathcal{A}}(t)}{dt} = \tilde{D}_{\mathcal{A}} (C_{i+1,\mathcal{A}}(t) + C_{i-1,\mathcal{A}}(t) - 2C_{i,\mathcal{A}}(t)) - \kappa_1 C_{i,\mathcal{A}}(t) \cdot C_{i,\mathcal{B}}(t) - \kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}} C_{i,\mathcal{A}}(t) \cdot C_{i,\mathcal{F}}(t) + \alpha_{\mathcal{A}} [\dot{i} = \dot{i}_{\text{prod}\mathcal{A}}], \quad (5.2a)$$

$$\frac{dC_{i,\mathcal{B}}(t)}{dt} = \tilde{D}_{\mathcal{B}} (C_{i+1,\mathcal{B}}(t) + C_{i-1,\mathcal{B}}(t) - 2C_{i,\mathcal{B}}(t)) - \kappa_1 C_{i,\mathcal{A}}(t) \cdot C_{i,\mathcal{B}}(t) - \kappa_0 C_{i,\mathcal{F},\mathcal{A}}(t) \cdot C_{i,\mathcal{B}}(t) + \alpha_{\mathcal{B}} [\dot{i} = \dot{i}_{\text{prod}\mathcal{B}}], \quad (5.2b)$$

$$\frac{dC_{i,\mathcal{AB}}(t)}{dt} = \tilde{D}_{\mathcal{AB}} (C_{i+1,\mathcal{AB}}(t) + C_{i-1,\mathcal{AB}}(t) - 2C_{i,\mathcal{AB}}(t)) + \kappa_1 C_{i,\mathcal{A}}(t) \cdot C_{i,\mathcal{B}}(t) - \kappa_{\mathcal{F},\mathcal{AB}} C_{i,\mathcal{F}}(t) \cdot C_{i,\mathcal{AB}}(t) \quad (5.2c)$$

für $i = 2, \dots, N - 1$, und

$$\frac{dC_{1,\mathcal{A}}(t)}{dt} = \tilde{D}_{\mathcal{A}} (C_{2,\mathcal{A}}(t) - C_{1,\mathcal{A}}(t)) - \kappa_1 C_{1,\mathcal{A}}(t) \cdot C_{1,\mathcal{B}}(t) - \kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}} C_{1,\mathcal{A}}(t) \cdot C_{1,\mathcal{F}}(t) + \alpha_{\mathcal{A}} [\dot{1} = \dot{i}_{\text{prod}\mathcal{A}}], \quad (5.2d)$$

$$\frac{dC_{N,\mathcal{A}}(t)}{dt} = \tilde{D}_{\mathcal{A}} (C_{N-1,\mathcal{A}}(t) - C_{N,\mathcal{A}}(t)) - \kappa_1 C_{N,\mathcal{A}}(t) \cdot C_{N,\mathcal{B}}(t) - \kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}} C_{N,\mathcal{A}}(t) \cdot C_{N,\mathcal{F}}(t) + \alpha_{\mathcal{A}} [N = \dot{i}_{\text{prod}\mathcal{A}}], \quad (5.2e)$$

$$\frac{dC_{1,\mathcal{B}}(t)}{dt} = \tilde{D}_{\mathcal{B}} (C_{2,\mathcal{B}}(t) - C_{1,\mathcal{B}}(t)) - \kappa_1 C_{1,\mathcal{A}}(t) \cdot C_{1,\mathcal{B}}(t) - \kappa_0 C_{1,\mathcal{F},\mathcal{A}}(t) \cdot C_{1,\mathcal{B}}(t) + \alpha_{\mathcal{B}} [\dot{1} = \dot{i}_{\text{prod}\mathcal{B}}], \quad (5.2f)$$

$$\frac{dC_{N,\mathcal{B}}(t)}{dt} = \tilde{D}_{\mathcal{B}} (C_{N-1,\mathcal{B}}(t) - C_{N,\mathcal{B}}(t)) - \kappa_1 C_{N,\mathcal{A}}(t) \cdot C_{N,\mathcal{B}}(t) - \kappa_0 C_{N,\mathcal{F},\mathcal{A}}(t) \cdot C_{N,\mathcal{B}}(t) + \alpha_{\mathcal{B}} [N = \dot{i}_{\text{prod}\mathcal{B}}], \quad (5.2g)$$

$$\frac{dC_{1,\mathcal{AB}}(t)}{dt} = \tilde{D}_{\mathcal{AB}} (C_{2,\mathcal{AB}}(t) - C_{1,\mathcal{AB}}(t)) + \kappa_1 C_{1,\mathcal{A}}(t) \cdot C_{1,\mathcal{B}}(t) - \kappa_{\mathcal{F},\mathcal{AB}} C_{1,\mathcal{F}}(t) \cdot C_{1,\mathcal{AB}}(t), \quad (5.2h)$$

$$\frac{dC_{N,\mathcal{AB}}(t)}{dt} = \tilde{D}_{\mathcal{AB}} (C_{N-1,\mathcal{AB}}(t) - C_{N,\mathcal{AB}}(t)) + \kappa_1 C_{N,\mathcal{A}}(t) \cdot C_{N,\mathcal{B}}(t) - \kappa_{\mathcal{F},\mathcal{AB}} C_{N,\mathcal{F}}(t) \cdot C_{N,\mathcal{AB}}(t) \quad (5.2i)$$

Ohne \mathcal{B} -Proteine reduziert sich das System von sieben auf drei Populationen (\mathcal{F} , \mathcal{A} , $\mathcal{F}\mathcal{A}$) und entspricht dem in Kapitel 4.3. diskutierten Fall. Für ein besseres Verständnis des Systems ist eine Betrachtung des Abschnitt 4.3 daher sinnvoll. Durch den zweiten Proteintyp (\mathcal{B}) treten Konkurrenzreaktionen auf, die wiederum die Komplexbildung beeinflussen.

5.2. Dynamik der Komplexbildung und Verteilung der Komplexe

Die Komplexbildung soll zunächst am Beispiel eines Zeitpunktes betrachtet und zwar anhand von zwei Grenzfällen: Im ersten Beispiel (Abbildung 5.2 a) werden die Parameter so gewählt, dass eine *Oberflächenassemblierung* begünstigt wird. Durch die Wahl einer sehr kleinen Assemblierungsrate κ_1 in der Lösung im Vergleich zur Bindung $\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}}$ der \mathcal{A} -Moleküle an die Oberfläche ($\kappa_1 \ll \kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}}$) und einer schnellen Diffusionsrate der freien \mathcal{B} -Proteine, wird eine Assemblierung der freien \mathcal{A} -Proteine an der Oberfläche begünstigt. Die Komplexbildung erfolgt somit im Bereich der Quelle der \mathcal{A} -Proteine und die Konzentrationsverteilung der Komplexe folgt der Verteilung der freien \mathcal{A} -Moleküle. Das zweite Beispiel (Abbildung 5.2 b) kombiniert eine schnelle Diffusionsrate der \mathcal{A} - und eine langsame Diffusionsrate der \mathcal{B} -Proteine mit einer im Vergleich zur Assemblierung in Lösung geringen Wahrscheinlichkeit der \mathcal{A} -Proteine an der Oberfläche zu assemblieren ($\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}} \ll \kappa_1$). Die freien \mathcal{B} -Moleküle sind dadurch lokalisiert. Die Verteilung der gebundenen Komplexe folgt nicht der Verteilung der freien Proteinuntereinheiten \mathcal{B} , befindet sich jedoch wie erwartet eher in der Nähe der Quelle der \mathcal{B} -Moleküle.

Abseits dieser beiden Grenzfälle ist die Verteilung der Proteinkomplexe weniger gut intuitiv erfassbar. Jedoch erlauben numerische Berechnungen dieser Verteilung, die experimentellen Ergebnisse nachzubilden (Abschnitt 5.3), und ein Verständnis für die Dynamik der Komplexbildung zu generieren. Im folgenden Abschnitt wird eine vereinfachte Parameterwahl getroffen und die zeitliche Entwicklung der Komplexbildung untersucht, wobei zwischen *lösungsassemblierten* und *oberflächenassemblierten* Komplexen unterschieden wird.

Das Maximum der Komplexverteilung verschiebt sich mit der Zeit. Für eine genauere Betrachtung der Dynamik des Systems wird von einem vereinfach-

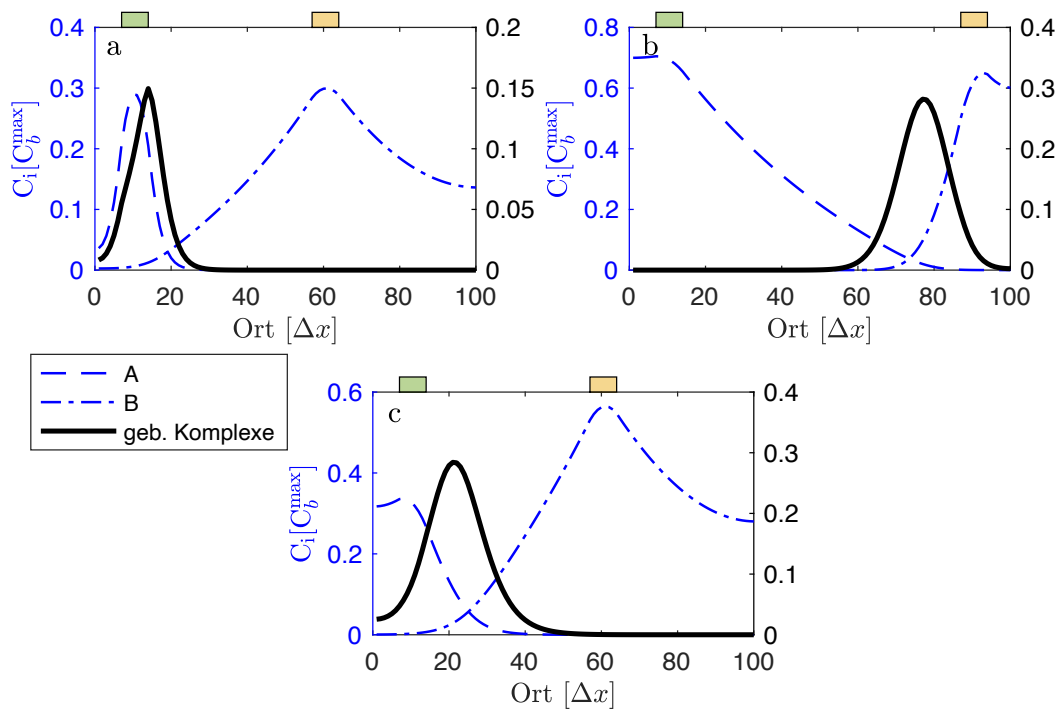


Abbildung 5.2.: Verteilung der an der Oberfläche gebundenen Komplexe (schwarz) und der in Lösung befindlichen freien \mathcal{A} - und \mathcal{B} -Proteine (blau). Die Rechtecke zeigen die Quellbereiche der Proteine \mathcal{A} (grün) und \mathcal{B} (gelb). Betrachtet werden verschiedene Parameterkombinationen: a) Die Diffusion der \mathcal{B} -Moleküle ist schneller als die der \mathcal{A} -Moleküle und die Bindung von \mathcal{A} an die Oberfläche ist im Vergleich zur Komplexbildung in Lösung begünstigt $\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}} \gg \kappa_1$. b) \mathcal{B} -Proteine diffundieren langsamer als \mathcal{A} -Proteine und die Bindeaffinität der Proteinuntereinheiten zu einem Komplex in Lösung ist stärker als die Bindung von \mathcal{A} an die Oberfläche $\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}} \ll \kappa_1$. c) Die Diffusion ist gleich und die Bindeaffinitäten von \mathcal{A} und \mathcal{B} sind gleich $\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}} = \kappa_1$.

ten Parametersatz ausgegangen, in dem die gewählten Parameter aller Spezies, wie Produktionsraten, Bindeaffinitäten und Diffusionsraten, gleich sind. Im Anfangszustand befinden sich keine Proteine im System und alle Fallen sind homogen über die Oberfläche mit einer Fallenkapazität $C_{i,b}^{\max}$ verteilt, wobei $C_{i,b}^{\max} = C_b^{\max}$ gilt. Sobald die Proteinsynthese beginnt füllen sich zunächst die Fallen im Bereich der Quelle \mathcal{A} bis es zu einer Sättigung im Quellbereich kommt (Abbildung 5.3 a, d). Der Sättigungsbereich dehnt sich mit der Zeit immer weiter in Richtung der Quelle der \mathcal{B} -Proteine aus (Abbildung 5.3 g).

Zu frühen Zeitpunkten ($t = 5 \cdot 10^3 \Delta t$, Abbildung 5.3 a-c) werden die Proteinuntereinheiten \mathcal{A} bevorzugt im Bereich der Quelle gebunden, was zu einer Reduzierung der freien Proteinuntereinheiten \mathcal{A} im Quellbereich führt (Abbildung 5.3 b). Die Proteinuntereinheiten \mathcal{B} können hingegen nur im Komplex mit Protein \mathcal{A} an Fallen binden, wodurch zunächst mehr freie \mathcal{B} -Proteine im System diffundieren. Die Komplexbildung wird durch die Bindung der Proteine \mathcal{A} an die Oberfläche gesteuert (Abbildung 5.3 c). Somit sind die *oberflächenassemblierten* Komplexe im Bereich der Quelle der \mathcal{A} -Proteine lokalisiert. Die Beschränkung der Proteine \mathcal{B} , nicht an die Oberfläche binden zu können, begünstigt eine Diffusion der \mathcal{B} in Bereiche der Quelle \mathcal{A} , was zu einer Bildung von *lösungsassemblierten* Komplexen in der Region der \mathcal{A} -Quelle führt.

Mit der Sättigung der Fallen ($t = 21 \cdot 10^3 \Delta t$, Abbildung 5.3 d-f) im Bereich der Quelle \mathcal{A} und der damit verbundenen fehlenden Bindemöglichkeit der freien Proteinuntereinheiten \mathcal{A} , verbleiben mehr von diesen im Bereich der \mathcal{A} -Quelle. Die maximale Konzentration der in Lösung assemblierten Komplexe entsteht am Schnittpunkt der Verteilung der freien Proteinuntereinheiten \mathcal{A} und \mathcal{B} .

Mit zunehmender Sättigung ($t = 50 \cdot 10^3 \Delta t$, Abbildung 5.3 g-i) der Fallen entlang des Chips gelangen mehr Proteinuntereinheiten \mathcal{A} bis zur Quelle \mathcal{B} . Dies bedingt eine Verschiebung des Maximums der Verteilung der in Lösung assemblierten Komplexe in Richtung zur Quelle \mathcal{B} . Die an der Oberfläche assemblierten Komplexe befinden sich im Mittel im Vergleich weiterhin näher an der \mathcal{A} Quelle.

Die oberflächenassemblierten Komplexe dominieren das System. Die Betrachtung der zeitlichen Entwicklung erfolgt durch die Summation der Konzentra-

5. Oberflächen- vs. Lösungsassemblierung

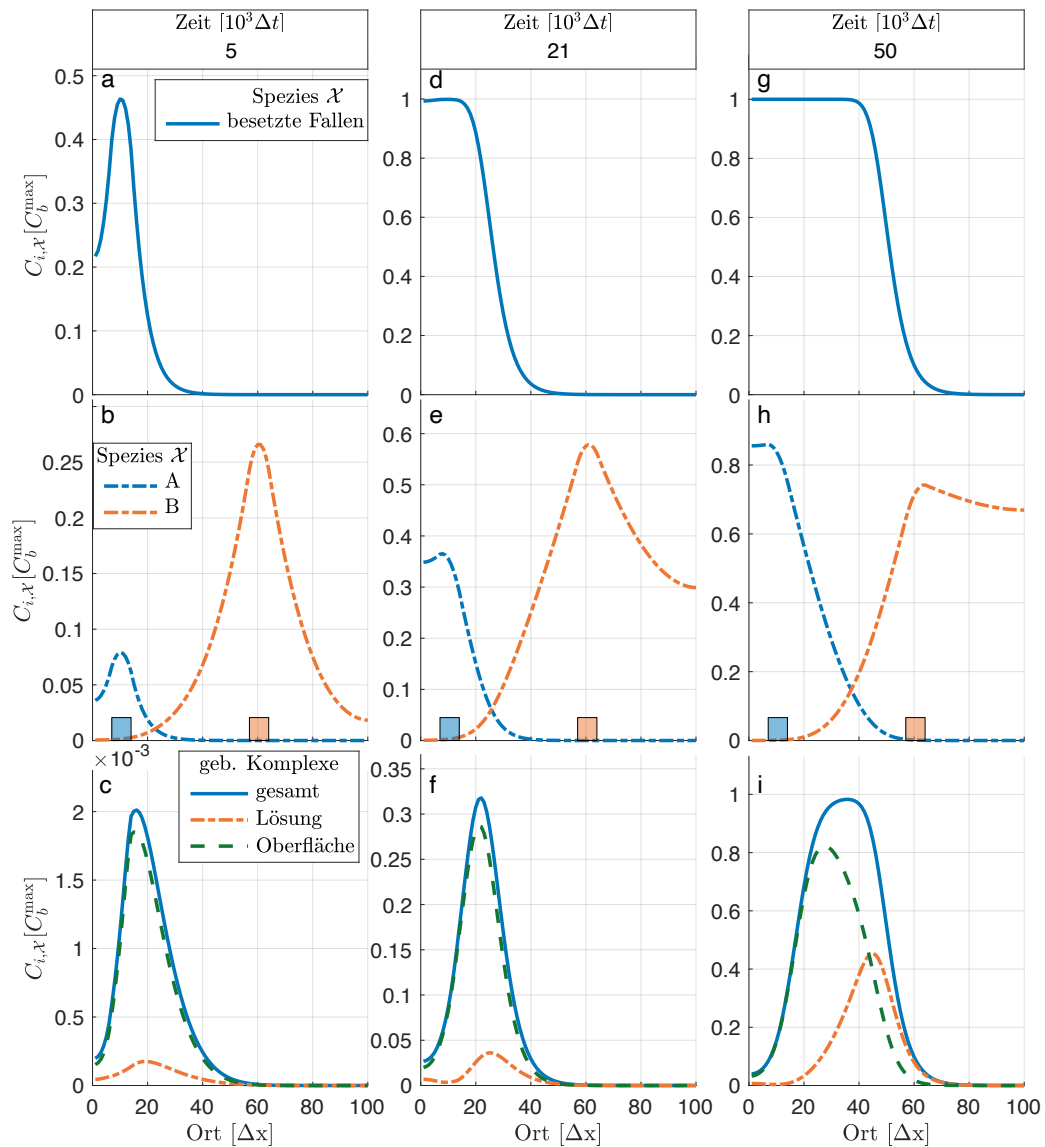


Abbildung 5.3.: Die Limitierung der Fallen führt zu einem Wechsel von einem *oberflächenassemblierten* zu einem *lösungsassemblierten* Regime. Dargestellt ist die Konzentrationsverteilung verschiedener Spezies \mathcal{X} zu den Zeitpunkten t : Spalten (a-c) $t = 5 \cdot 10^3 \Delta t$, (d-f) $t = 21 \cdot 10^3 \Delta t$, (g-i) $t = 50 \cdot 10^3 \Delta t$. Unterschieden wird in den Zeilen zwischen den Spezies: (a, d, g) der besetzten Fallen, die der Gesamtheit aller gebundener Proteine im System entspricht, (b, e, h) der freien Proteinuntereinheiten \mathcal{A} (blau, ---) und \mathcal{B} (orange, ---), (c, f, i) der Gesamtkonzentration an gebundenen Komplexen (blau, —) die aus der Summe der *oberflächenassemblierten* Komplexe die an der Oberfläche gebunden (orange, ---) sind und der *lösungsassemblierten* Komplexe (grün, ---) bestehen. Die Quellbereiche der Proteinuntereinheiten \mathcal{A} (blau) und \mathcal{B} (orange) sind als farbige Rechtecke gekennzeichnet.

tion der Population \mathcal{X} über alle Boxen $C_{\mathcal{X}}(t) = 1/N \sum_{i=1}^N C_{i,\mathcal{X}}(t)$. Die Dominanz der Assemblierungspfade wird beschrieben durch das Verhältnis²

$$\frac{C_{\text{surf}}(t)}{C_{\text{surf}}(t) + C_{\text{sol}}(t)} \quad (5.3)$$

der Konzentration von $C_{\text{surf}}(t)$ *oberflächenassemblierten* Komplexen zur Summe der Konzentrationen $C_{\text{surf}}(t)$ und $C_{\text{sol}}(t)$ von *oberflächen-* und *lösungsassemblierten* Komplexen. Die Werte der Dominanz der *Oberflächenassemblierung* liegen im Bereich $(0.5, 1]$ und für die Dominanz der *Lösungsassemblierung* zwischen $[0, 0.5)$.

Die zeitliche Entwicklung in Abbildung 5.4 b (gleicher Parametersatz wie in Abbildung 5.3) zeigt, dass die an der Oberfläche gebundenen Komplexe hauptsächlich aus *oberflächenassemblierten* Komplexen bestehen. Mit der Zeit nehmen die an der Oberfläche gebundenen \mathcal{A} -Proteine³ ab, die noch für eine Bindung mit \mathcal{B} -Proteinen zur Verfügung stehen (Abbildung 5.4 b). Dies ist auf die Ausdehnung des Sättigungsbereiches der Fallen in die Quellbereiche der \mathcal{B} -Proteine zurückzuführen (Abbildung 5.3 f, i). Die Ausdehnung des Sättigungsbereiches steigert die Bildung von *lösungsassemblierten* im Verhältnis zu *oberflächenassemblierten* Komplexen (Abbildung 5.4 b Gradient von dunkelrot zu hellrot; Abbildung 5.3 f, i).

Bis zur Sättigung der Fallen wird der gesamte Prozess durch die *oberflächenassemblierten* Komplexe dominiert (Abbildung 5.4 b). Die Dominanz der *oberflächenassemblierten* Komplexe ist bedingt durch die Eigenschaft der \mathcal{A} -Proteine, allein an der Oberfläche binden zu können. Reduziert man die Bindeaffinität $\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}}$ der \mathcal{A} -Proteine an die Oberfläche um den Faktor 10 und führt eine schnellere Diffusion der Proteinuntereinheiten \mathcal{B} ein, kompensiert das den Bindevorteil der Proteine \mathcal{A} an die Oberfläche (Abbildung 5.4 a). Durch die Reduktion der Bindeaffinität $\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}}$ der Proteinuntereinheiten \mathcal{A} diffundieren diese weiter in Richtung der Quelle der \mathcal{B} , bevor sie an der Oberfläche binden und sind nicht mehr hochkonzentriert in ihrem Quellbereich lokalisiert (Anhang, Abbildung D.4). Die *oberflächenassemblierten* Komplexe sind dadurch wesentlich breiter verteilt und es erfolgt für frühe Zeiten ($t < 1 \cdot 10^4 \Delta t$) eher eine Assemblierung der Komplexe in Lösung (Anhang Abbildung D.4, Abbildung 5.4 a). Mit der Zunahme der gebundenen \mathcal{A} im Quellbereich entstehen dadurch ebenfalls mehr an der Oberfläche assemblierte Komplexe (Abbil-

²Die Konzentrationen der *oberflächen-* $C_{\text{surf}}(t)$ und *lösungsassemblierten* $C_{\text{sol}}(t)$ Komplexe sind durch $C_{\text{surf}}(t) = 1/N \sum_{i=1}^N C_{i,(\mathcal{F}\mathcal{A})\mathcal{B}}(t)$ und $C_{\text{sol}}(t) = 1/N \sum_{i=1}^N C_{i,\mathcal{F}(\mathcal{A}\mathcal{B})}(t)$ gegeben.

³An der Oberfläche gebundene \mathcal{A} werden als Spezies $\mathcal{F}\mathcal{A}$ bezeichnet. Sobald diese mit \mathcal{B} binden werden diese nicht mehr als oberflächengebundene \mathcal{A} (Spezies $\mathcal{F}\mathcal{A}$) bezeichnet sondern als *oberflächenassembliert* Komplexe $(\mathcal{F}\mathcal{A})\mathcal{B}$

5. Oberflächen- vs. Lösungsassemblierung

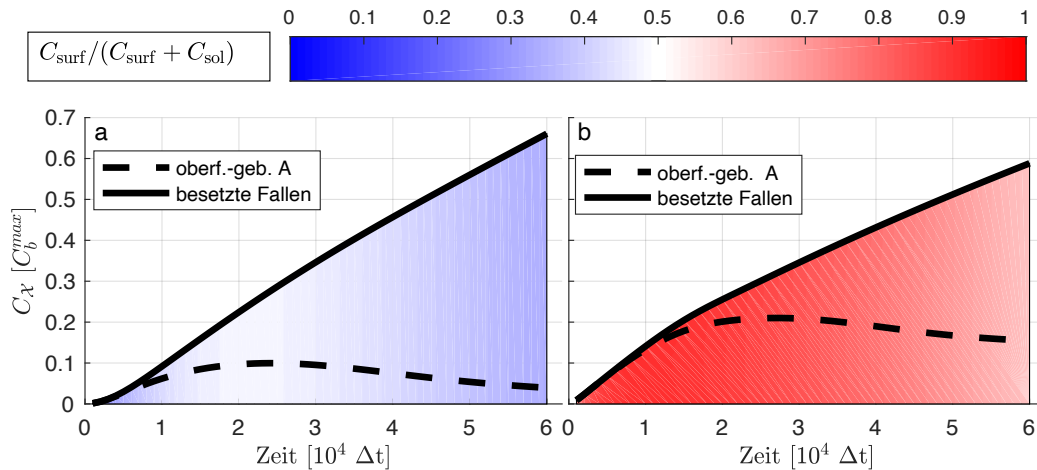


Abbildung 5.4.: Zeitliche Entwicklung der Dominanz der **oberflächen-** (rot) und **lösungsassemblierten** (blau) Komplexe. Die Stärke der Dominanz berechnet sich aus dem Verhältnis aus der Konzentration der an der Oberfläche gebundenen Komplexe durch die Gesamtanzahl der gebundenen Komplexe und ist durch den Farbgradienten dargestellt. Je dunkler die Farbe desto dominanter ist der jeweilige Assemblierungspfad, wobei weiß bedeutet, dass *Lösungs-* und *Oberflächenassemblierung* gleich stark sind. (a) Eine Reduzierung der Bindeaffinität zwischen \mathcal{A} -Protein und der Oberfläche $\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}}$ ($\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}} = \kappa_0/10 = \kappa_{\mathcal{F},\mathcal{AB}}/10 = \kappa_1/10$) bewirkt eine Verstärkung der in Lösung assemblierten Komplexe (blaue Fläche unter dem Graphen) (b) Gleiche Bindeaffinitäten ($\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}} = \kappa_0 = \kappa_{\mathcal{F},\mathcal{AB}} = \kappa_1$) bewirken eine Dominanz der *oberflächenassemblierten* Komplexe (rote Fläche unter dem Graphen)

Abbildung 5.4 a). Es folgt ein Regimewechsel von einem *lösung-* zu einem *oberflächenassemblierten* Regime, der nicht von langer Dauer ist – der Regimewechsel ist in Abhängigkeit vom Ort zu erkennen und findet lokal statt (Anhang Abbildung D.4). Durch die Sättigung der Fallen und der damit limitierten Möglichkeit der freien \mathcal{A} -Proteine in der Nähe der Quelle binden zu können, verringert sich die Dominanz der *oberflächenassemblierten* Komplexe erneut. Es kommt zu einem *lösungsdominierten* Assemblierungsgeschehen. Die Abbildung 5.4 zeigt, dass durch die Reduzierung des Vermögens von \mathcal{A} an der Oberfläche binden zu können, die Dominanz der Assemblierungspfade von *oberflächen-* (Abbildung 5.4 b) zu *lösungsassembliert* (Abbildung 5.4 a) geändert werden kann.

5.3. Vergleich von Simulation und Experiment

Von unseren Kooperationspartnern um Prof. Dr. Roy Bar-Ziv (Weizmann-Institut, Israel) wurde experimentell die Assemblierung zweier Proteintypen \mathcal{A} (*gp10*) und \mathcal{B} (*gp7*) zu einem Komplex untersucht. Hierbei wurde der Translationsort für \mathcal{A} festgehalten und für \mathcal{B} variiert. Die experimentell bestimmte Menge an gebundenen Komplexen in Abhängigkeit vom Abstand ist in Abbildung 5.5 mit ihrer Standardabweichung dargestellt [54]. Der Abstand zwischen den Translationsorten \mathcal{A} und \mathcal{B} wurde zwischen 100 und 500 μm variiert. Der Versuchsaufbau und die experimentelle Methode zur Messung der Menge der Komplexe sind in Abschnitt 3.2 erklärt. Die Messungen wurden mit dem gleichen Setup wie beim Experiment mit nur einem Proteintyp (Abschnitt 4.7) durchgeführt. Durch die Hinzunahme einer zweiten DNA-Bürste, die eine weitere Proteinuntereinheit codiert, kann die Entstehung von Proteinkomplexen beobachtet werden. Mit Hilfe der Computersimulationen werden diese experimentellen Ergebnisse nachgebildet. Durch die Betrachtung des einzelnen Proteintyps \mathcal{A} in Abschnitt 4.7 konnten bereits drei Parameter für die Simulationen festgelegt werden. Diese sind die Produktionsrate $\alpha_{\mathcal{A}}$, die Diffusionsrate $\tilde{D}_{\mathcal{A}}$ des Proteins \mathcal{A} und die Bindeaffinität $\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}}$ von \mathcal{A} -Proteinen und der Oberfläche (bzw. der dort befindlichen Fallenmoleküle). Für einige der übrigen Parameter können Schätzwerte aus der Literatur entnommen werden. So befindet sich z.B. die Diffusionsrate der Proteinuntereinheit \mathcal{B} im Bereich derer von \mathcal{A} (siehe Anhang D.1). Die Bestimmung der \mathcal{B} -Proteinexpression ist auf Grund der Vielzahl der Prozesse kompliziert. Hier finden u.a. Transkription und Translation statt, zusätzlich kommt es zu Effekten wie der Beschleunigung der Transkription bei co-transkriptionaler Translation um ein sechsfaches [75]. Die Verteilung der Komplexe, die nach $t = 2\text{ h}$ an der Oberfläche gebunden sind, ermöglicht indirekt eine Abschätzung der Produktionsrate der \mathcal{B} -Proteine. Auf Grund der Variation vieler Parameter kann diese Abschätzung aber nur grob erfolgen.

Die Verteilung der gebundenen Komplexe ist experimentell für sechs verschiedene Abstände zwischen den Translationsorten jeweils 2 h nach dem Start der Synthese gemessen worden [54]. Die experimentellen Datensätze sollen durch Simulationen nachgebildet werden, wobei nur ein bestimmender Simulationsparameter verwendet werden soll; lediglich der Parameter, der den Abstand der Translationsorte darstellt, ändert sich. Als Kriterium für die Stärke der Abweichung der theoretischen von der experimentellen Kurve wird die Summe der Residuenquadrate (engl. *sum of squared estimate of errors*, SSE) verwendet. Beim Fitting (Abbil-

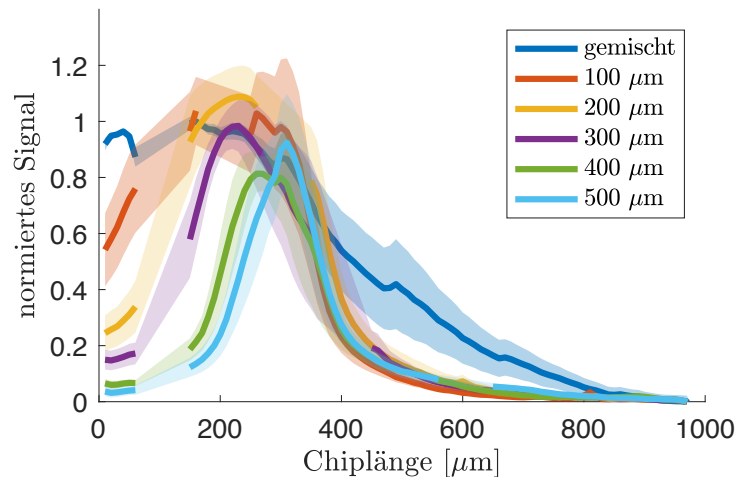


Abbildung 5.5.: Experimentelle Untersuchung der Komplexbildung durch Variation des Abstandes zwischen den Translationsorten. Die Daten zeigen die Verteilung der Proteinkomplexe entlang des Biochips für verschiedene Distanzen zwischen den Translationsorten (siehe Legende). Das Fluoreszenzsignal ist normiert auf das Maximum des Signals der gemischten DNA-Bürsten. Die Schattierung zeigt die Standardabweichung. In dem Bereich zwischen 60 und 150 µm sind die Daten beschnitten, da durch das Aufbringen der DNA-Bürsten in dem Bereich in den mikroskopischen Bildaufnahmen Artefakte entstanden („spotting“ sichtbar).

dung 5.6) sticht der Fall der gemischten DNA-Bürsten (Abstand 0 µm) heraus und weicht, im Gegensatz zu den anderen Abständen zwischen den Translationsorten, vergleichsweise stark von den theoretischen Beobachtungen ab. Der Vergleich von Abständen, die dicht beieinander liegen, mit weit voneinander entfernten Translationsorten zeigt, dass das *in-silico*-System (Abschnitt 5.1) entweder dicht beieinander liegende Translationsorte gut abbilden kann, oder weit voneinander entfernte Translationsorte. Ein perfektes Fitting, bei dem alle fünf Kurven (Abbildung 5.6 b-f) perfekt reproduziert wurden, gibt es nicht. Die genaue Betrachtung der gemischten DNA-Bürsten bestärkt die Vermutung, dass bei dicht beieinander liegenden Translationsorten ein besonderer Effekt auftritt, der in der Simulation nicht berücksichtigt wurde.

Im Fall der gemischten DNA-Bürsten (Abbildung 5.6 a) wurde das experimentelle Setup leicht verändert: Während in den Fällen mit endlichen Abständen zwischen den DNA-Bürsten 25% der DNA-Moleküle *gp10* und 100% *gp7* codieren, sind in den gemischten Bürsten 25% *gp10* der DNA-Moleküle und nur 75% *gp7* codiert. Dadurch, dass sich die Translationsorte an einem Ort befinden, halten sich auch alle für die Proteinsynthese notwendigen molekularen Maschinen an einem Ort auf. Diese Lokalisierung kann somit eine höhere Proteinexpression bewirken. Dieser Ef-

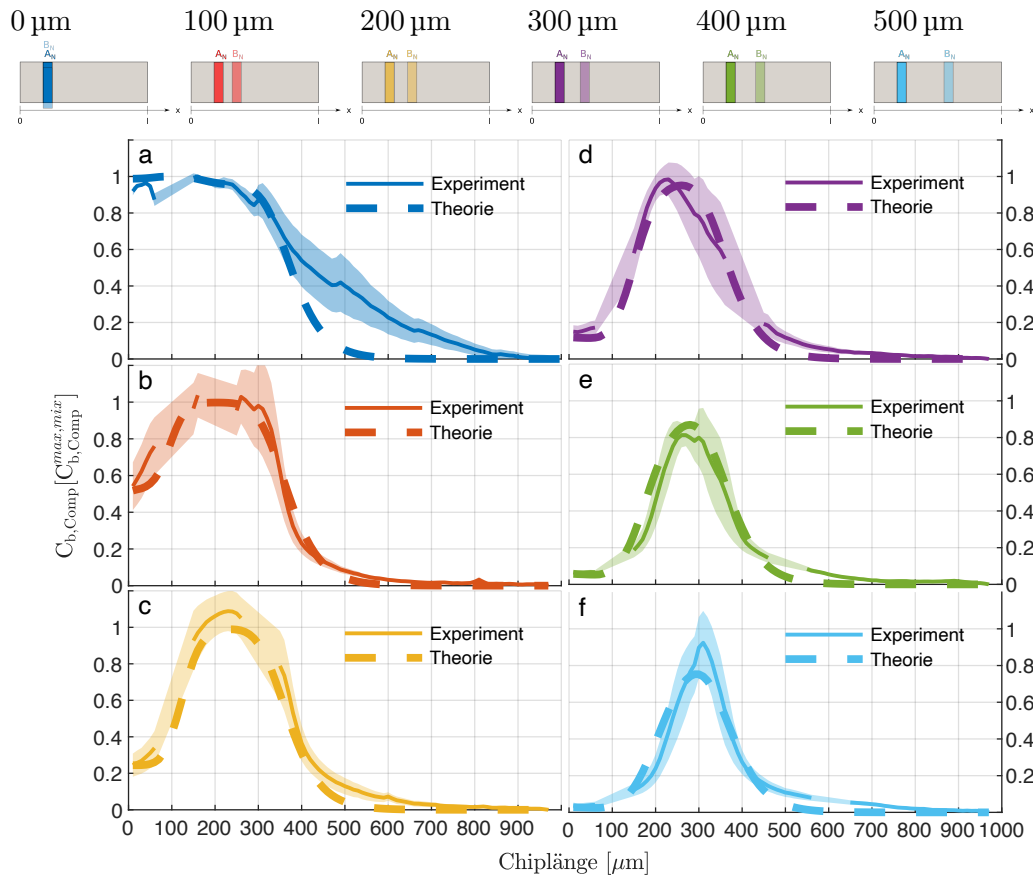


Abbildung 5.6.: Theoretische Untersuchung des Einflusses des Abstandes der Translationsorte auf die Verteilung der gebundenen Komplexe (a-f) zeigen die Konzentration $C_{b,Comp}$ der gebundenen Komplexe entlang des Biochips normiert über das Maximum der Konzentration $C_{b,Comp}^{max,mix}$ der gemischten DNA-Bürsten. Dabei werden die experimentellen Daten (durchgezogene Linien) und deren Standardabweichung (Schattierung) bestmöglich durch das in Abschnitt 5.1 beschriebene Modell mit einem Parametersatz für alle Abstände angenähert (gestrichelte Linien). Die Farben in den obigen Schemata entsprechen dem Abstand zwischen den Translationsorten: (a) gemischter Bürstenfall mit $0\ \mu\text{m}$ und einen Abstand von (b) $100\ \mu\text{m}$ (c) $200\ \mu\text{m}$ (d) $300\ \mu\text{m}$ (e) $400\ \mu\text{m}$ (f) $500\ \mu\text{m}$. Parameter sind im Anhang in Tabelle A.16 zu finden.

fekt ließ sich im Computermodell durch eine Erhöhung der entsprechenden Produktionsrate nachstellen, was aber nicht zu einer verbesserten Anpassung führt (siehe Anhang Abbildung D.2, Abbildung D.3). Demzufolge spielen anscheinend andere Effekte im Fall der gemischten DNA-Bürsten eine Rolle, die in den Simulationen noch nicht berücksichtigt sind. Einer dieser Effekte könnte die co-translationale Assemblierung sein, bei der bereits eine Proteinkomplexbildung an einem noch nicht fertigen Protein stattfindet. Dies würde somit im Modell im Bereich der Translationsorte zu einer stärkeren effektiven Bindeaffinität in der Lösung führen. Eine weitere mögliche Begründung für die experimentell gemessene breite Verteilung der Komplexe wäre eine schlechte Bindung der in Lösung assemblierten Komplexe an die Oberfläche.

Ich konnte zeigen, dass es möglich ist, die Verteilung der Komplexe aus dem Experiment für alle sechs Abstände zu fitten, solange auch eine Variation des Parametersatzes für den gemischten Bürsten-Fall ermöglicht wird [54]. Hierbei wurden die experimentellen Datensätze für die fünf endlichen Abstände mit einem Parametersatz gefittet und lediglich die Bindeaffinität in Lösung für den gemischten Bürsten-Fall erhöht. Dies zeigte, dass eine genauere Betrachtung der co-translationalen Assemblierung im Computermodell ein wichtiger Faktor sein könnte für eine noch bessere Abbildung der Experimente.

5.4. Einfluss des Abstands der Translationsorte auf den Assemblierungspfad

Ein großer Vorteil des Computermodells im Vergleich zum Experiment ist die Nachverfolgbarkeit der Assemblierungspfade. Die Simulation unterscheidet hierbei zwischen *oberflächen-* und *lösungsassemblierten* Komplexen. Da die Komplexe sich lediglich durch die Historie der Komplexbildung unterscheiden und strukturell gleich sind, kann experimentell nicht zwischen beiden Arten unterschieden werden. Der Einfluss des Abstands zwischen den Translationsorten auf die Lokalisierung der Komplexbildung und auf die Dominanz der Assemblierungspfade soll in Abbildung 5.7 näher betrachtet werden. Hierfür dient der durch das Fitting an die experimentellen Daten bestimmte Parametersatz. Die Änderung des Abstandes zwischen den Translationsorten zeigt, dass der Abstand einen Einfluss auf die Lokalisierung der Komplexe hat (Abbildung 5.7). Mit der Erhöhung des Abstands wird die Ver-

teilung der *oberflächenassemblierten* Komplexe breiter und verschiebt sich in Richtung des Translationsortes der Proteinuntereinheit \mathcal{B} (Abbildung 5.7, Anhang Abbildung D.5). Im Unterschied dazu wird die Verteilung der in Lösung assemblierten Komplexe mit zunehmenden Abstand zwischen den Translationsorten schmaler und das Maximum sinkt. Nach $t = 2$ h sind die in Lösung assemblierten Komplexe dominanter. Durch die Erhöhung des Abstands der Translationsstellen gewinnt also die Assemblierung an der Oberfläche an Bedeutung. Die Summe aus *oberflächen-* und *lösungsassemblierten* Komplexen ergibt die Gesamtkonzentration der gebundenen Komplexe, die im Experiment (Abbildung 5.7, schattierte Regionen) gemessen wurden.

Effizienz der Komplexbindung

Die Komplexbindungs-Effizienz $f_{b,Comp}$ mit der Komplexe an die Oberfläche gebunden werden, berechnet sich aus der Konzentration gebundener Komplexe ($(\mathcal{F}\mathcal{A})\mathcal{B}$, $\mathcal{F}(\mathcal{A}\mathcal{B})$) und der maximalen Konzentration aller möglichen Komplexe. Dabei werden sowohl die *lösungs-* als auch *oberflächenassemblierten* Komplexbildungspfade berücksichtigt.

$$f_{b,Comp}(t) = \frac{1}{N} \frac{\sum_{i=1}^N C_{i,(\mathcal{F}\mathcal{A})\mathcal{B}}(t) + C_{i,\mathcal{F}(\mathcal{A}\mathcal{B})}(t)}{C_{Comp,possible}(t)} \quad (5.4)$$

Die Möglichkeit zur Proteinkomplexbildung wird beschrieben durch die im Gesamtsystem befindlichen Proteinuntereinheiten \mathcal{A} , \mathcal{B} unter Einbezug der Massenerhaltung. Hierbei schreibt die Massenerhaltung vor, dass die jeweils geringere Konzentration der Proteintypen \mathcal{A} und \mathcal{B} die mögliche Konzentration $C_{Comp,possible}$ an Komplexen bestimmt.

$$C_{Comp,possible}(t) = \begin{cases} 1/N \sum_{i=1}^N \alpha_{\mathcal{A}} [i = i_{\text{prod}\mathcal{A}}] t, & \alpha_{\mathcal{A}} \leq \alpha_{\mathcal{B}} \\ 1/N \sum_{i=1}^N \alpha_{\mathcal{B}} [i = i_{\text{prod}\mathcal{B}}] t, & \alpha_{\mathcal{A}} > \alpha_{\mathcal{B}} \end{cases} \quad (5.5)$$

Der Einfluss der Limitierung der Fallen auf die Effizienz der Komplexbindung kann mit Hilfe der Fallen-Effizienz ermittelt werden. Die Fallen-Effizienz $f_{b,\mathcal{A}+Comp}$ der an der Oberfläche gebundenen Moleküle wird beschrieben durch die Gesamtanzahl aller an der Oberfläche gebundenen Proteine im Verhältnis zur möglichen Anzahl an gebundenen Proteinen. Die Bindung an der Oberfläche findet nur über die Proteine

5. Oberflächen- vs. Lösungsassemblierung

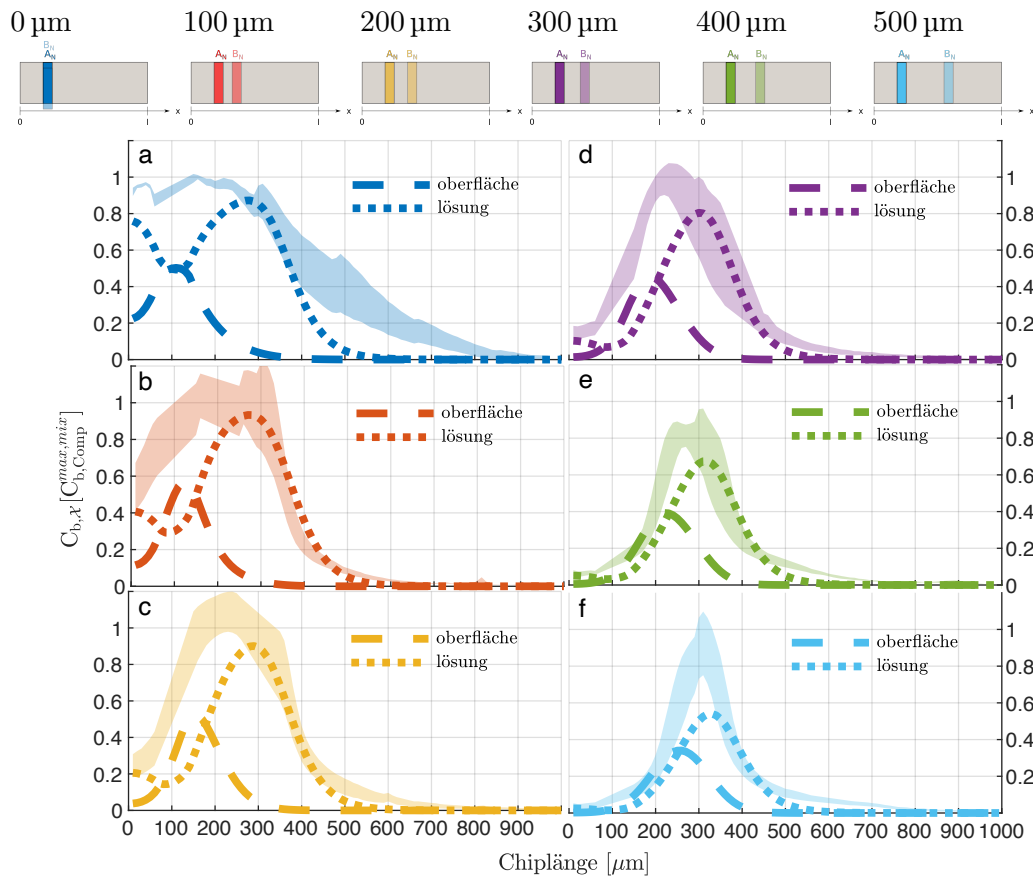


Abbildung 5.7.: Unterscheidung der Assemblierungspfade in Abhängigkeit vom Abstand der Translationsorte Gezeigt ist die Verteilung der Konzentrationen der an der Oberfläche gebundenen Spezies $C_{b,x}$, d. h. aller Komplexe, *oberflächen-* und *lösungsassemblierte* Komplexe. Der durch das Fitting in Abbildung 5.6 ermittelte Parametersatz erlaubt eine Unterscheidung zwischen *oberflächen-* und *lösungsassemblierten* (gepunktet und gestrichelt) Komplexen. Der Bereich der experimentellen Beobachtung (Schattierung, siehe auch Abbildung 5.6) dient zum Vergleich und zeigt die Konzentration $C_{b,Comp}$ der gebundenen Komplexe. Die Farben in den obigen Schemata entsprechen dem Abstand zwischen den Translationsorten: (a) gemischter Bürstenfall mit 0 μm und einen Abstand von (b) 100 μm (c) 200 μm (d) 300 μm (e) 400 μm (f) 500 μm . Parameter sind zu finden im Anhang in Tabelle A.16.

\mathcal{A} statt, somit lässt sich einfach über die Erzeugung $\alpha_{\mathcal{A}}$ der \mathcal{A} -Proteine die mögliche Anzahl an gebundenen Proteinen bestimmen:

$$f_{b,\mathcal{A}+Comp}(t) = \frac{\sum_{i=1}^N C_{i,\mathcal{F}\mathcal{A}}(t) + C_{i,(\mathcal{F}\mathcal{A})\mathcal{B}}(t) + C_{i,\mathcal{F}(\mathcal{A}\mathcal{B})}(t)}{\sum_{i=1}^N \alpha_{\mathcal{A}} [i = i_{\text{prod}\mathcal{A}}] t} \quad (5.6)$$

Die Dynamik und die Effizienz der Komplexbindung in Abhängigkeit vom Abstand ist in Abbildung 5.8 dargestellt. Auf den für das Experiment relevanten Zeitskalen resultieren für einen kleinen Abstand zwischen den Translationsorten mehr Komplexe im Vergleich zu einem weiten Abstand (Abbildung 5.8 b,d). Die Anzahl der Komplexe steigt nach einer Zeit von $4 \cdot 10^4 \Delta t$ linear mit der Zeit an. Die Effizienz der Komplexbindung wächst mit der Verringerung des Abstandes zwischen den Translationsorten (Abbildung 5.8 a). Erst auf langen Zeitskalen wird der Einfluss der Limitierung der Fallen in der Effizienz der Komplexbindung sichtbar (Abbildung 5.8 c), der auch im System mit nur einem Protein beobachtbar ist (Abschnitt 4.3 in Abbildung 4.6 a, Abbildung 4.7 a). Für einen direkten Vergleich des Einflusses der Limitierung der Fallen wird die Fallen-Effizienz für zwei Proteintypen mit Gleichung (5.6) eingeführt. Diese gibt die maximal erreichbare Effizienz der Bindung von Molekülen an der Oberfläche in Abhängigkeit von der Zeit an. Die Fallen-Effizienz ist unabhängig vom Translationsort der Proteine \mathcal{B} , da eine Bindung an der Oberfläche⁴ nur über \mathcal{A} -Proteine möglich ist.

Der Vergleich zwischen Fallen-Effizienz und der Komplexbindungs-Effizienz zeigt in welchem Bereich die Limitierung der Fallen noch keinen Einfluss auf die Beobachtung der Komplexbindung hat (Abbildung 5.8). Die Fallen-Effizienz kann wie in Abbildungen 4.6 und 4.7 in drei Regime eingeteilt werden. Es wird hierbei zwischen bindedominierten Regime, Mischregime und produktionsdominierten Regime unterschieden. Der geringste Einfluss der Fallenkapazität befindet sich im bindedominierten Regime, danach erfolgt ein geringer Einfluss der Fallenkapazität im Mischregime bis hin zum produktionsdominierten Regime, wo die Limitierung der Fallen den Verlauf der Fallen-Effizienz bestimmt. Diesen Einfluss sieht man auch in dem Verlauf der Komplexbindungs-Effizienz, dennoch kann zwischen der Komplexbindungs-Effizienz und Fallen-Effizienz unterschieden werden, was zeigt, dass die Komplexbildung im System für die Bindung der Komplexe an der Oberfläche eine Rolle spielt. Insbesondere im bindedominierten Regime und Mischre-

⁴Die Bindung der Proteinuntereinheiten \mathcal{A} erfolgt an eine modifizierte Oberfläche Abschnitt 3.1. Diese beinhaltet bereits gebundene Moleküle an der Oberfläche, die vor dem Beginn des eigentlichen Experiments aufgebracht werden.

gime sind für große Abstände der Translationsorte Fallen-Effizienz und Komplexbindungs-Effizienz unterschiedlich. Dieser Unterschied nimmt mit dem Beginn des produktionsdominierten Regimes deutlich ab. Das produktionsdominierte Regime ist daher der Bereich in dem am wenigsten Aussagen über die Komplexbildung im Experiment getroffen werden kann. Diese Zusammenhänge können mit der Betrachtung der an der Oberfläche gebundenen Komplex genauer verdeutlicht werden (Abbildung 5.8 b, d).

Mit der Sättigung der Fallen und dem Übergang ins produktionsdominierte Regime befindet sich das System in einem quasi-stationären Zustand. Die Konzentration der gebundenen Moleküle ändert sich nicht mehr mit der Zeit und die in der Lösung freien Proteinuntereinheiten und Komplexe steigen linear mit der Zeit an. Die quasi-stationäre Konzentration der an der Oberfläche gebundenen Komplexe ist abhängig vom Abstand zwischen den Translationsorten: Bei einem großen Abstand der Translationsorte zueinander binden zu Beginn recht viele \mathcal{A} -Proteine an die Oberfläche, da die \mathcal{B} -Proteine erst noch in die Nähe der \mathcal{A} -Syntheseorte diffundieren müssen und anschließend dort an die oberflächengebundenen \mathcal{A} -Proteine binden. Dies führt zu einer anfänglich dominierenden *Oberflächenassemblierung*, die aufgrund der hohen Bindeaffinität der \mathcal{A} - und \mathcal{B} -Proteine in Lösung recht schnell in eine lösungsdominierte Assemblierung umschwingt. Mit zunehmender Sättigung der Fallen verschieben sich die Komplexbildungen immer mehr in Richtung der Quelle der \mathcal{B} . An die eventuell noch freien oberflächen gebundenen \mathcal{A} ($\mathcal{F}\mathcal{A}$) werden somit kaum noch \mathcal{B} -Proteine binden. Dadurch entstehen fast nur noch in Lösung assemblierte Komplexe. Hingegen führt ein geringerer Abstand zwischen den Translationsorten zu einer Verbesserung der Bindung der \mathcal{B} -Proteine an die oberflächen gebundenen $\mathcal{F}\mathcal{A}$ -Proteine zu frühen Zeitpunkten. Dadurch wird zu frühen Zeiten der Quellbereich der \mathcal{A} -Proteine mit Komplexen gesättigt. Dies erklärt für den quasi-stationären Zustand, warum weniger gebundene Komplexe bei einem weiten Abstand zwischen den Translationsorten vorliegen.

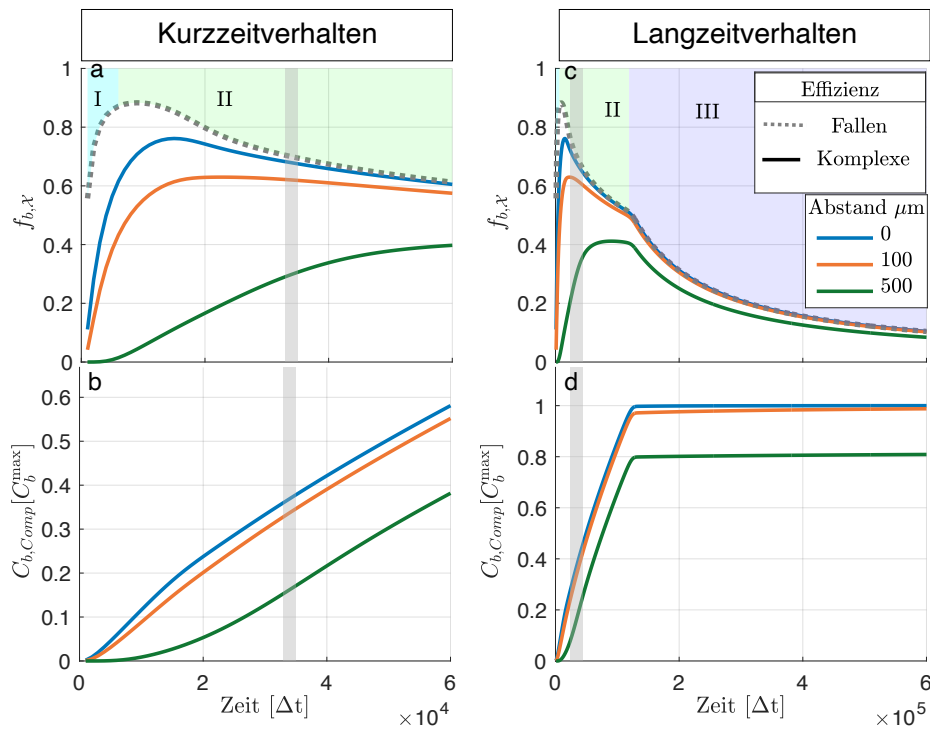


Abbildung 5.8.: Kurz- und Langzeitverhalten der Komplexbindungs-Effizienz im Vergleich zur Fallen-Effizienz. Die Beeinflussung der Komplexbindungs-Effizienz durch die Limitierung der Fallen an der Oberfläche wird durch die Fallen-Effizienz beschrieben. Wie auch im Einproteinfall lässt sich der zeitliche Verlauf der Fallen-Effizienz in drei Regime einteilen I bindedominiertes Regime, II Mischregime, III produktionsdominiertes Regime. Die Effizienz der Komplexbindung hängt ab von dem Abstand zwischen den Translationsorten (wie in der Legende angegeben). Die experimentelle Beobachtung fand nach etwa $t = 2 \text{ h}$ (grau schattierter Bereich) statt, was im beginnenden Mischregime der Fallen-Effizienz liegt. Detailkurven zu den lösungs- und oberflächenassemblierten Komplexen in Abhängigkeit vom Abstand befinden sich im Anhang Abbildung D.7

Kapitel 6

Proteinkomplexbildung in der lebenden Zelle

Die Entstehung von Multiproteinkomplexen in der Zelle wird hier im speziellen am Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) diskutiert. Das Bakterium *E. coli* kann vereinfacht als ein Zylinder mit sphärischen Endkappen beschrieben werden (Abbildung 6.1). Die Zelle lässt sich grob in Membran, Zytoplasma und Kernäquivalent (Nucleoid) einteilen. Das Kernäquivalent beschreibt die Region im Zytoplasma in der sich die DNA aufhält. Das Zytoplasma, besteht aus einer wässrigen Lösung, dem sogenannten Zytosol, in dem sich Proteine, Enzyme und die für die Proteinsynthese benötigten molekularen Maschinen und Komponenten, wie z.B. Ribosomen und tRNA befinden. Die Informationen des Bauplans der Proteine befinden sich in den entsprechenden Genen auf der DNA, die je nach ihrer Funktionalität in Clustern zusammengefasst werden, den sogenannten Operonen. Ein Operon enthält nur einen Terminator, der dazu führt, dass die entsprechenden Gene nacheinander in einer bestimmten Reihenfolge, der sogenannten Operonanordnung, transkribiert werden. Die nach der Transkription entstandene mRNA wird als polycistronische mRNA bezeichnet.

Die Transkription (Abschnitt 1.1) beginnt im Kernäquivalent mit der Bindung der RNA-Polymerase (RNAP) an den Promotor. Während die mRNA noch transkribiert wird, beginnen bereits die Ribosomen mit der Translation der mRNA (co-transkriptionelle Translation), was zu einer erhöhten Bewegung des DNA Locus zur Peripherie des Kernäquivalents führt [77]. Durch dessen Verschiebung ergibt sich eine bessere Zugänglichkeit der Ribosomen an die mRNA. Mit der Termination der mRNA nach der Transkription kann diese frei im Zytoplasma diffundieren. Je nach Größe der mRNA kann diese nach ihrer Termination vom Kernäquivalent ausgeschlossen sein. Dies hängt mit der starken Verknäulung (Supercoiling) der DNA

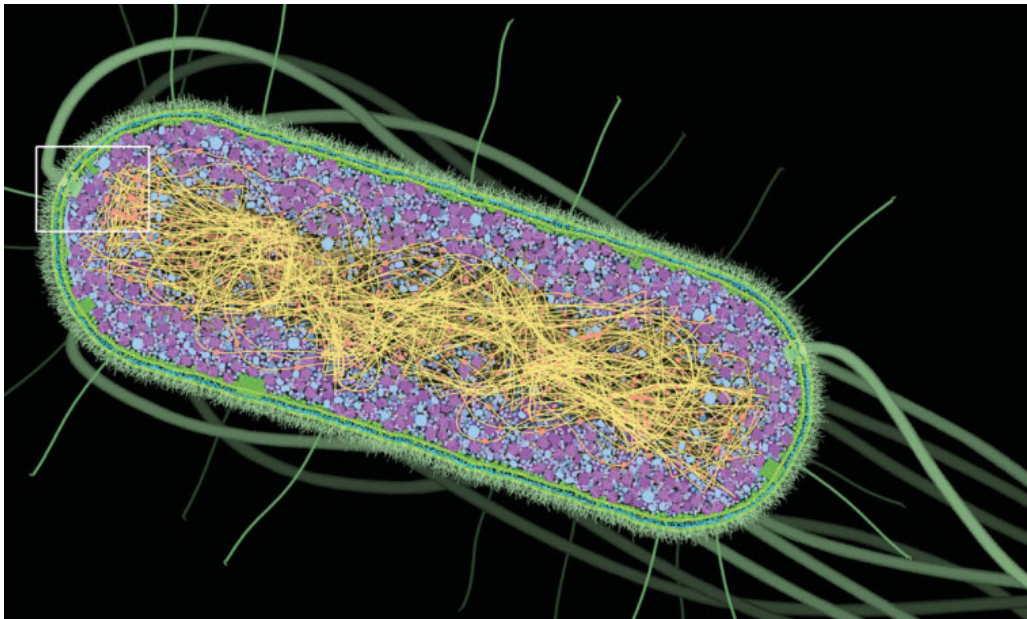


Abbildung 6.1.: Illustration des Querschnitts einer *E. coli*-Zelle von Goodsell [76]. Gezeigt sind drei Regionen: Die Zellwand (grün), das Zytoplasma (magenta und blau) und das Kernäquivalent (gelb und orange), in dem sich die DNA (gelb) aufhält.

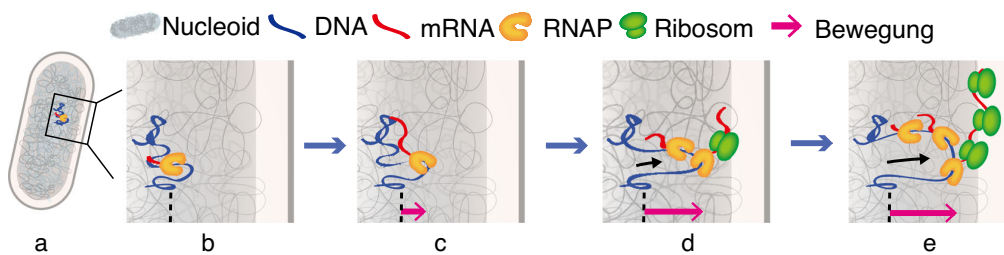


Abbildung 6.2.: Schematische Darstellung der Bewegung des Genlocus am Beispiel von *E. coli*, entnommen aus Yang u. a. [77]. (a) Schematische Darstellung der Zelle mit Kernäquivalent (grau) und Zytoplasma (weiß) (b-e) vergrößerter Zellausschnitt; (b) Beginn der Transkription durch Bindung der RNAP an den Promotor des zu synthetisierenden Gens (c) Erhöhung der Bewegung des Genlocus in Richtung der Peripherie auf Grund (d, e) von Bindung von Ribosomen an die noch zu transkribierende mRNA (co-transkriptionelle Translation).

zusammen. In der Theorie kann die DNA als domänen-organisiertes Maschennetz oder Polymernetzwerk mit einer mittleren Maschengröße interpretiert werden [78]. Partikel, die größer sind als die mittlere Maschengröße, können nicht ungehindert durch das Maschennetzwerk hindurch diffundieren und sind daher vom Kernäquivalent ausgeschlossen.

Assemblierung von Proteinkomplexen

Die Assemblierung von Proteinkomplexen aus mehreren Untereinheiten innerhalb der dicht gepackten (engl. crowded) Zellumgebung ist nicht gut verstanden. Die konventionelle Idee ist, dass es sich um einen post-translationalen Prozess (Abbildung 6.3 a) handelt, d.h. verschiedene Untereinheiten binden erst nach ihrer Proteinexpression aneinander. Die Experimente unserer Kooperationspartner, der Arbeitsgruppe von Günter Kramer (Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg) zeigen, dass sich der Komplex auch co-translational (Abbildung 6.3 b) zusammensetzen kann: D.h. eine frei diffundierende Untereinheit bindet an eine noch nicht vollständig synthetisierte Polypeptidkette [49]. Die experimentellen Untersuchungen der Komplexbildung finden im Modellorganismus *E. coli* statt. An entsprechenden Orten im *E. coli*-Chromosom werden Gene eingebracht, die die zu beobachtenden Proteinkomplexe codieren. Durch die Transkription der entsprechenden Gene entsteht mRNA, die für die Translation der entsprechenden Untereinheit benötigt wird.

Bedeutung des Abstandes zwischen den Translationsorten im *in vivo* System

Bei Prokaryoten existieren zwei unterschiedliche mRNA-Typen, die monocistronische und die polycistronische mRNA. Die polycistronische mRNA beinhaltet die Information mehrerer Proteintypen. Für sie lässt sich der Abstand der Translationsorte aus der Distanz der zu codierenden Sequenzen der Proteinuntereinheiten berechnen. Bei einer monocistronischen mRNA wird der Abstand der Translationsstellen durch die Position der entsprechenden Gene bestimmt. Grund hierfür ist die in Abbildung 6.2 beschriebene co-transkriptionelle Translation, bei der das zu transkribierende Gen in das Zytoplasma transportiert wird, wo die Translation des Pro-

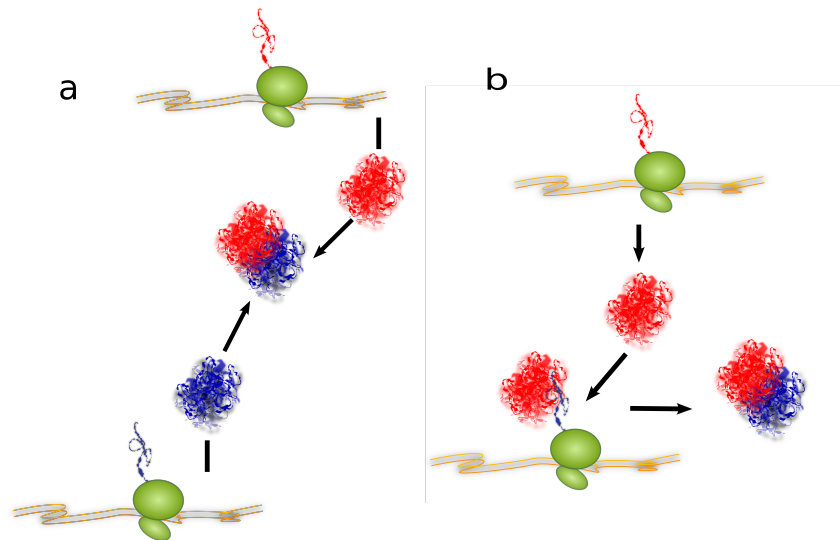


Abbildung 6.3.: Co- vs. post-translationale-Assemblierung. Räumlich voneinander getrennten Translationsorte, die durch mRNA (braun, Linie), Ribosomen (grün) und den naszierenden Polypeptidketten (rot bzw. blaue Ketten) dargestellt sind. Es werden zwei voneinander unterscheidbare Proteine (rot und blau) auf den entsprechenden Translationsorten synthetisiert. Ein fertig synthetisiertes rotes Protein (rot, Knäuel), kann auf zwei verschiedenen Wegen (Pfeile) durch die Bindung mit einem blauen Protein zu einem Komplex (rot und blau ineinander verknäult) werden. Entweder (a) post-translationale durch die Bindung mit einem freien blauen Protein (blau, Knäuel) oder (b) co-translationale durch die Bindung mit der blauen naszierenden Polypeptidkette (blaue Kette, entspricht dem noch nicht fertig synthetisierten blauen Protein, noch gebunden am Ribosom) und dessen Freilassung nach der Translation der mRNA.

teins stattfindet. Das Zytoplasma wird in meinem Modell als homogenes Medium angesehen. Durch diese Vereinfachungen kann das in Abschnitt 5.1 beschriebene *in-vitro*-Modell auf die Experimente angepasst werden. Um eine co-translationale Komplexbildung *in silico* beobachten zu können, wird anstelle der einfachen Erzeugung der fertigen Proteine eine Erzeugung von naszierenden Ketten modelliert und dadurch eine Initiationsrate und eine Terminationsrate für die jeweilige naszierende Kette eingeführt.¹

In silico soll herausgefunden werden, unter welchen Bedingungen der co- oder der post-translationale Assemblierungspfad dominiert. In Zusammenarbeit mit unserer experimentellen Kooperationsgruppe aus Heidelberg wird das in Abschnitt 5.1 be-

¹Die hier verwendeten Begriffe „Initiation“ und „Termination“ sind nicht im streng biologischen Sinn definiert. In meinem Modell wird als Initiation der Prozess beschrieben, mit der naszierende Ketten entstehen, was einer verspäteten Betrachtung des Beginns der Translation gleich kommt. Die Initiationsrate im Modell beeinflusst die Konzentration der erzeugten naszierenden Ketten pro Zeit, was durch verschiedenste biologische Faktoren wie die Rate, mit der die Ribosomen an die mRNA binden (Initiationsrate im biologischen Sinne), die Konzentration der mRNA, oder die Konzentration der auf der mRNA befindlichen Ribosomen beeinflusst werden kann. Die Termination im Modell beschreibt den Moment, in dem die naszierende Kette zu einem fertigen Protein geworden ist. Dessen Rate beinhaltet den Translationsprozess, wobei ein Teil der Faltung des Proteins bereits während des Translationsprozesses stattfindet. Die noch für die Faltung benötigte Zeit nach dem Erreichen des Stopcodons liegt im Mikrosekundenbereich und ist gering im Vergleich zum Translationsprozess, der im Minutenbereich liegt.

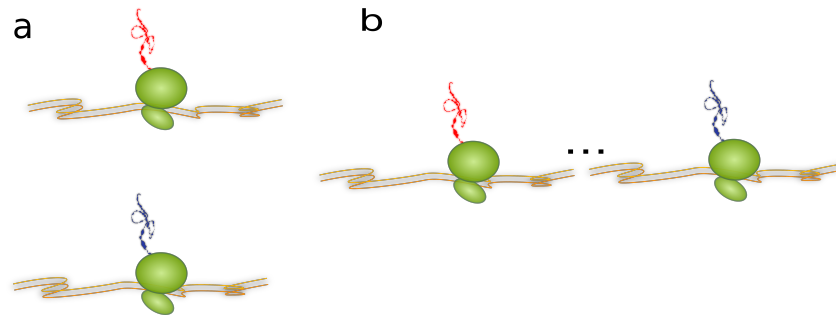


Abbildung 6.4.: Abstand der Translationsorte ist bedingt durch monocistronische (a) und poly-cistronische (b) mRNA. Räumlich voneinander getrennten Translationsorte, die durch mRNA (braun, Linie), Ribosomen (grün) und den naszierenden Polypeptidketten (rot oder blaue Ketten) dargestellt sind. Die für die Proteinsynthese benötigten Informationen für (a) genau ein Protein und (b) mehr als ein Protein befinden sich auf einer mRNA.

schriebene System an die von ihnen durchgeführten Experimente qualitativ angepasst, um so den Einfluss des Abstandes zwischen den Translationsorten der Proteinuntereinheiten auf die Effizienz der Komplexbildung bzw. die Konzentration der Komplexe zu untersuchen. Das hierfür entwickelte Modell soll die Prozesse der Proteinsynthese und der Komplexbildung miteinander koppeln.

6.1. Modellierung der *in vivo*-Proteinkomplexbildung

Im Folgenden soll die Komplexbildung von zwei Proteinuntereinheiten untersucht werden, die der Einfachheit halber Spezies \mathcal{A} und \mathcal{B} genannt werden. Wie bereits oben beschrieben, kann ein Komplex durch zwei unterschiedliche Assemblierungspfade entstehen. Durch die Einführung verschiedener Spezies („co- und post-Komplexe“) lässt sich in der Simulation der Assemblierungspfad zurückverfolgen und somit der Ursprung eines jeden Proteinkomplexes aufzeigen.

Zu Beginn der Simulation sind noch keine Proteine im System. Als erstes werden naszierende Ketten $nasc\mathcal{A}$ und $nasc\mathcal{B}$ der jeweiligen Proteinuntereinheiten \mathcal{A} und \mathcal{B} mit konstanten Initiationsraten $\alpha_{ini}^{nasc\mathcal{A}}$ und $\alpha_{ini}^{nasc\mathcal{B}}$ erzeugt. Verallgemeinert kann für die Proteinuntereinheiten \mathcal{A} oder \mathcal{B} auch \mathcal{X} geschrieben werden, wobei das \mathcal{X} durch den jeweiligen Buchstaben der Spezies \mathcal{A} oder \mathcal{B} ersetzt wird. Die naszierenden Ketten \mathcal{X} sind in den Quellbereichen der Proteinuntereinheiten \mathcal{X} immobilisiert, bis sie nach der Translationszeit ablösen und so zu einer fertig gefalteten und freien Proteinuntereinheit \mathcal{X} werden. Dieser Prozess wird durch die Terminationsrate $\omega_{term}^{\mathcal{X}}$ im Modell beschrieben. Eine freie Proteinuntereinheit \mathcal{A} kann mit einer Bindrate κ_{co} an die naszierende Kette $nasc\mathcal{B}$ binden. Der so entstandene, noch nicht

fertige und immobilisierte Komplex $AnascB$ wird mit der Terminationsrate $\omega_{\text{term}}^{nascB}$, die durch die Translationszeit der Proteinuntereinheit B vorgegeben ist, frei. Der nun freie, in der Lösung befindliche Proteinkomplex AB_{co} wird auf Grund seines Ursprungs *co-translational assemblierter Komplex* genannt. Eine weitere Möglichkeit der Komplexbildung ist die post-translationale Assemblierung: Alle naszierenden Ketten $nascB$, die noch keine Bindung mit einem Protein A eingegangen sind, werden mit der Rate $\omega_{\text{term}}^{nascB}$ zu freien Proteinen B . Trifft ein Protein B auf ein frei in der Lösung befindliches A , bilden beide Proteinuntereinheiten mit einer Binde-rate von κ_{post} einen Komplex AB_{post} . Entsteht ein Komplex auf diesem Weg, so sprechen wir von einem *post-translational assemblierten Komplex*. Der beschriebene Reaktionsverlauf und die Spezies sind im Reaktionsschema in Abbildung 6.5 sowie im Differentialgleichungssystem (6.1) dargestellt. Das so aufgebaute System erlaubt eine Verfolgung des Ursprungs der Proteinkomplexe und somit eine Unterscheidung der unterschiedlichen Assemblierungspfade.

- Initiation der Proteine



- Termination der Proteine nach Translationszeit $t_{\text{term}}^{nascA} = 1/\omega_{\text{term}}^{nascA}$,
 $t_{\text{term}}^{nascB} = 1/\omega_{\text{term}}^{nascB}$



- Assemblierung der Proteinuntereinheiten



$nascA$ – naszierendes Protein A
 A – Protein A
 $nascB$ – naszierendes Protein B
 B – Protein B
 AB_{post} – post-translationaler Komplex
 AB_{co} – co-translationaler Komplex

Abbildung 6.5.: Reaktionsschema für das *in vivo*-System. Erzeugung von naszierenden Ketten $nascA$, $nascB$ (Initiation der Proteine); Umwandlung der naszierenden Kette in ein fertiges Protein A , B ; Assemblierung der Proteinuntereinheiten zu einem Proteinkomplex AB_{post} , AB_{co} .

$$\frac{dC_{\mathcal{A}}(t)}{dt} = \omega_{\text{term}}^{\text{nasc}\mathcal{A}} C_{\text{nasc}\mathcal{A}}(t) - \kappa_{\text{post}} C_{\mathcal{A}}(t) C_{\mathcal{B}}(t) - \kappa_{\text{co}} C_{\mathcal{A}}(t) C_{\text{nasc}\mathcal{B}}(t) \quad (6.1a)$$

$$\frac{dC_{\mathcal{B}}(t)}{dt} = \omega_{\text{term}}^{\text{nasc}\mathcal{B}} C_{\text{nasc}\mathcal{B}}(t) - \kappa_{\text{post}} C_{\mathcal{A}}(t) C_{\mathcal{B}}(t) \quad (6.1b)$$

$$\frac{dC_{\mathcal{A}\mathcal{B}\text{post}}(t)}{dt} = \kappa_{\text{post}} C_{\mathcal{A}}(t) C_{\mathcal{B}}(t) \quad (6.1c)$$

$$\frac{dC_{\mathcal{A}\mathcal{B}\text{co}}(t)}{dt} = \omega_{\text{term}}^{\text{nasc}\mathcal{B}} C_{\mathcal{A}\text{nasc}\mathcal{B}}(t) \quad (6.1d)$$

$$\frac{dC_{\mathcal{A}\text{nasc}\mathcal{B}}(t)}{dt} = -\omega_{\text{term}}^{\text{nasc}\mathcal{B}} C_{\mathcal{A}\text{nasc}\mathcal{B}}(t) + \kappa_{\text{co}} C_{\mathcal{A}}(t) C_{\text{nasc}\mathcal{B}}(t) \quad (6.1e)$$

$$\frac{dC_{\text{nasc}\mathcal{A}}(t)}{dt} = \alpha_{\text{ini}}^{\text{nasc}\mathcal{A}} - \omega_{\text{term}}^{\text{nasc}\mathcal{A}} C_{\text{nasc}\mathcal{A}}(t) \quad (6.1f)$$

$$\frac{dC_{\text{nasc}\mathcal{B}}(t)}{dt} = \alpha_{\text{ini}}^{\text{nasc}\mathcal{B}} - \omega_{\text{term}}^{\text{nasc}\mathcal{B}} C_{\text{nasc}\mathcal{B}}(t) - \kappa_{\text{co}} C_{\mathcal{A}}(t) C_{\text{nasc}\mathcal{B}}(t) \quad (6.1g)$$

Bei dem oben beschriebenen System handelt es sich um ein ortshomogenes System. Dies gilt nur unter der Annahme, dass die Translationsorte und die Proteinuntereinheiten homogen verteilt sind. Wie eingangs beschrieben, muss in der Zelle von einer lokalisierten Proteinsynthese ausgegangen werden, was eine Ortsabhängigkeit impliziert. Die *E. coli*-Zelle ist ein stäbchenförmiges Bakterium und kann als Zylinder mit sphärischen Endkappen (Abbildung 6.1) betrachtet werden. Diese hat in den Experimenten unserer Kooperationspartner der Universität Heidelberg eine Länge von 3 μm und einen Durchmesser von 1 μm . Zur Vereinfachung des Systems haben wir diesen als einen länglichen Quader angenähert. Dieser ist in seiner y - und z -Richtung mit 1 μm um ein 3-faches kleiner als in seiner x -Richtung mit 3 μm . Eine Reduzierung des Systems auf eine Dimension erfolgt durch die Projektion der y - und z -Achse auf die x -Achse, was zu einer Vernachlässigung der Exklusion der in dem System zu betrachtenden Molekülen führt (siehe Abschnitte 4.1 und 4.2). Wie in Abschnitt 4.3 beschrieben erfolgt eine Diskretisierung des Ortes in Boxen i mit $N = 100$ Boxen, was bei der *E. coli* Zelle in x -Richtung eine Boxgröße von 0.03 μm entspricht. Durch die Ortseinführung spielt jetzt auch die Diffusion des jeweiligen Proteins eine Rolle. Diese wird durch die unterschiedlichen Diffusionskonstanten $D_{\mathcal{A}}$, $D_{\mathcal{B}}$ für die Proteinuntereinheiten \mathcal{A} , \mathcal{B} und die Diffusionskonstante $D_{\mathcal{A}\mathcal{B}}$ der frei diffundierenden Komplexe $\mathcal{A}\mathcal{B}\text{post}$ und $\mathcal{A}\mathcal{B}\text{co}$ eingeführt. Die Diffusionskonstante $D_{\mathcal{A}\mathcal{B}}$ der fertigen Komplexe $\mathcal{A}\mathcal{B}\text{post}$ und $\mathcal{A}\mathcal{B}\text{co}$ ist gleich, unter der Annahme, dass sich die auf unterschiedlichen Assemblierungspfaden gebildeten Komplexe in ihren physikalischen, makroskopischen Eigenschaften nicht unterscheiden. Die Spezies

6. Proteinkomplexbildung in der lebenden Zelle

$nascA$ und $nascB$ sind noch nicht fertig translatiert und befinden sich im Modell daher immobilisiert im Quellbereich der $nascA$ und $nascB$. Somit ist die durch den co-translationalen Prozess entstandene Spezies $AnascB$ bis zur fertigen Translation des $nascB$ zu B ebenfalls im Quellbereich immobilisiert. Immobilisierte Proteine besitzen im Modell eine Diffusionskonstante von Null. Das beschriebene System entspricht folgendem Differentialgleichungssystem, wobei $[i = i_{\text{prodX}}]$ die Iverson-Klammer (engl. *Iverson bracket*) repräsentiert:

$$\frac{dC_{i,AnascB}(t)}{dt} = -\omega_{\text{term}}^{nascB} C_{i,AnascB}(t) + \kappa_{\text{co}} C_{i,A}(t) \cdot C_{i,nascB}(t), \quad (6.2a)$$

$$\frac{dC_{i,nascA}(t)}{dt} = \alpha_{\text{ini}}^{nascA} [i = i_{\text{ini}}^{nascA}] - \omega_{\text{term}}^{nascA} C_{i,nascA}(t), \quad (6.2b)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{i,nascB}(t)}{dt} &= \alpha_{\text{ini}}^{nascB} [i = i_{\text{ini}}^{nascB}] - \omega_{\text{term}}^{nascB} C_{i,nascB}(t) \\ &\quad - \kappa_{\text{co}} C_{i,A}(t) \cdot C_{i,nascB}(t), \end{aligned} \quad (6.2c)$$

für $i = 1, \dots, N$,

$$\frac{dC_{i,A}(t)}{dt} = \frac{D_A}{\Delta x^2} (C_{i+1,A}(t) + C_{i-1,A}(t) - 2C_{i,A}(t)) + \omega_{\text{term}}^{nascA} C_{i,nascA}(t) - \kappa_{\text{post}} C_{i,A}(t) \cdot C_{i,B}(t) - \kappa_{\text{co}} C_{i,A}(t) \cdot C_{i,nascB}(t), \quad (6.3a)$$

$$\frac{dC_{i,B}(t)}{dt} = \frac{D_B}{\Delta x^2} (C_{i+1,B}(t) + C_{i-1,B}(t) - 2C_{i,B}(t)) + \omega_{\text{term}}^{nascB} C_{i,nascB}(t) - \kappa_{\text{post}} C_{i,A}(t) \cdot C_{i,B}(t), \quad (6.3b)$$

$$\frac{dC_{i,AB\text{post}}(t)}{dt} = \frac{D_{AB}}{\Delta x^2} (C_{i+1,AB\text{post}}(t) + C_{i-1,AB\text{post}}(t) - 2C_{i,AB\text{post}}(t)) + \kappa_{\text{post}} C_{i,A}(t) \cdot C_{i,B}(t), \quad (6.3c)$$

$$\frac{dC_{i,AB\text{co}}(t)}{dt} = \frac{D_{AB}}{\Delta x^2} (C_{i+1,AB\text{co}}(t) + C_{i-1,AB\text{co}}(t) - 2C_{i,AB\text{co}}(t)) + \omega_{\text{term}}^{nascB} C_{i,nascB}(t), \quad (6.3d)$$

für $i = 2, \dots, N - 1$, und

$$\frac{dC_{1,A}(t)}{dt} = \frac{D_A}{\Delta x^2} (C_{2,A}(t) - C_{1,A}(t)) + \omega_{\text{term}}^{nascA} C_{1,nascA}(t) - \kappa_{\text{post}} C_{1,A}(t) \cdot C_{1,B}(t) - \kappa_{\text{co}} C_{1,A}(t) \cdot C_{1,nascB}(t), \quad (6.3e)$$

$$\frac{dC_{N,A}(t)}{dt} = \frac{D_A}{\Delta x^2} (C_{N-1,A}(t) - C_{N,A}(t)) + \omega_{\text{term}}^{nascA} C_{N,nascA}(t) - \kappa_{\text{post}} C_{N,A}(t) \cdot C_{N,B}(t) - \kappa_{\text{co}} C_{N,A}(t) \cdot C_{N,nascB}(t), \quad (6.3f)$$

$$\frac{dC_{1,B}(t)}{dt} = \frac{D_B}{\Delta x^2} (C_{2,B}(t) - C_{1,B}(t)) + \omega_{\text{term}}^{nascB} C_{1,nascB}(t) - \kappa_{\text{post}} C_{1,A}(t) \cdot C_{1,B}(t), \quad (6.3g)$$

$$\frac{dC_{N,B}(t)}{dt} = \frac{D_B}{\Delta x^2} (C_{N-1,B}(t) - C_{N,B}(t)) + \omega_{\text{term}}^{nascB} C_{N,nascB}(t) - \kappa_{\text{post}} C_{N,A}(t) \cdot C_{N,B}(t), \quad (6.3h)$$

$$\frac{dC_{1,AB\text{post}}(t)}{dt} = \frac{D_{AB}}{\Delta x^2} (C_{2,AB\text{post}}(t) - C_{1,AB\text{post}}(t)) + \kappa_{\text{post}} C_{1,A}(t) \cdot C_{1,B}(t), \quad (6.3i)$$

$$\frac{dC_{N,AB\text{post}}(t)}{dt} = \frac{D_{AB}}{\Delta x^2} (C_{N-1,AB\text{post}}(t) - C_{N,AB\text{post}}(t)) + \kappa_{\text{post}} C_{N,A}(t) \cdot C_{N,B}(t), \quad (6.3j)$$

$$\frac{dC_{1,AB\text{co}}(t)}{dt} = \frac{D_{AB}}{\Delta x^2} (C_{2,AB\text{co}}(t) - C_{1,AB\text{co}}(t)) + \omega_{\text{term}}^{nascB} C_{1,nascB}(t), \quad (6.3k)$$

$$\frac{dC_{N,AB\text{co}}(t)}{dt} = \frac{D_{AB}}{\Delta x^2} (C_{N-1,AB\text{co}}(t) - C_{N,AB\text{co}}(t)) + \omega_{\text{term}}^{nascB} C_{N,nascB}(t), \quad (6.3l)$$

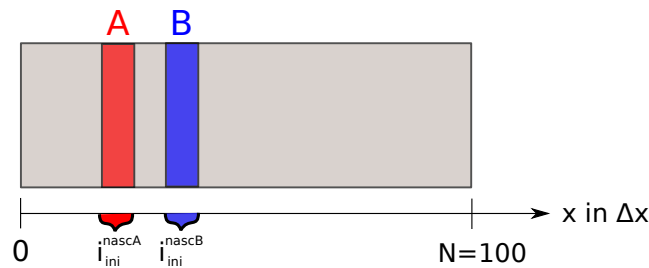


Abbildung 6.6.: Schema des diskretisierten Modellbakteriums mit unterschiedlichen Translationsorten für Protein \mathcal{A} (rot) und \mathcal{B} (blau). Die farbigen Bereiche kennzeichnen die Boxen $[i = i_{ini}^{nascA}]$ und $[i = i_{ini}^{nascB}]$.

Die *in vivo* Experimente unserer Kooperationspartner fanden in *E. coli* statt unter der Betrachtung der Komplexbildung des Proteins CarAB aus den Proteinuntereinheiten CarA, CarB und dem Protein Luciferase, was aus den Proteinuntereinheiten LuxA, LuxB [49] aufgebaut ist. Mittels einer Kombination aus Ribosomeprofiling und Immunopurifikation [49],[79]–[81] konnte herausgefunden werden, dass LuxA an *nascLuxB*, aber nicht LuxB an *nascLuxA* bindet (die gleiche Assymetrie gilt für CarA und CarB) [49], was in unserem Modell berücksichtigt wurde. Ebenfalls zeigten die experimentellen Ergebnisse, dass erst ab einer bestimmten naszierenden Kettenlänge eine co-translationale Assemblierung möglich ist. Dies liegt u.a. daran, dass die naszierende Kette erst den Exittunnel des Ribosoms passieren muss, bevor es für eine Bindung zur Verfügung steht [82]–[87]. Das Modell erlaubt daher auch erst die Bindung eines freien Proteins mit der naszierenden Kette sobald mehr als die Hälfte der Kettenlänge des fertigen Proteins vorliegt. Dies hat einen Einfluss auf die verwendeten Werte der Terminationsraten ω_{term}^{nascA} und ω_{term}^{nascB} , welche sich nach der Länge der erzeugten naszierenden Kette *nascA* und *nascB* richten. Die Experimente unserer Kooperationsgruppe haben gezeigt, dass ab etwa der Hälfte der exprimierten Kettenlänge eine Bindung der *nascB* mit einem fertig translatierten Protein \mathcal{A} möglich ist [49]. Somit werden im Modell bereits halb lange *nascB* und *nascA* erzeugt. Somit entspricht die Terminationszeit t_{term}^{nascA} , t_{term}^{nascB} der naszierenden Ketten *nascA*, *nascB* in etwa der Hälfte der biologischen Translationszeit t_{trans}^{nascA} , t_{trans}^{nascB} des gesamten Proteins \mathcal{A} , \mathcal{B} .

6.2. Degradation und Lokalisierung

Unterschiedliche Prozesse wie z.B. Fehlfaltung der translatierten Proteinuntereinheit [88], [89] oder die Degradation [90] im eigentlichen Sinne führen dazu, dass

eine Proteinuntereinheit für die Proteinkomplexbildung nicht mehr zur Verfügung steht. Im Modell sind diese Prozesse unter dem Begriff „Degradation“ zusammengefasst. Dessen Einführung im Modell erfolgt durch Degradationsraten $\gamma_{\text{deg}}^{\mathcal{A}}$, $\gamma_{\text{deg}}^{\mathcal{B}}$ für die frei in Lösung befindlichen Proteinuntereinheiten \mathcal{A} , \mathcal{B} . Die Degradation der Proteinkomplexe und der noch zu translatierenden Proteine soll hierbei vernachlässigt werden. Entsprechend ergibt sich folgendes Gleichungssystem:

$$\frac{dC_{i,Anasc\mathcal{B}}(t)}{dt} = -\omega_{\text{term}}^{nasc\mathcal{B}} C_{i,Anasc\mathcal{B}}(t) + \kappa_{\text{co}} C_{i,\mathcal{A}}(t) \cdot C_{i,nasc\mathcal{B}}(t), \quad (6.4a)$$

$$\frac{dC_{i,nasc\mathcal{A}}(t)}{dt} = \alpha_{\text{ini}}^{nasc\mathcal{A}} [i = i_{\text{ini}}^{nasc\mathcal{A}}] - \omega_{\text{term}}^{nasc\mathcal{A}} C_{i,nasc\mathcal{A}}(t), \quad (6.4b)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{i,nasc\mathcal{B}}(t)}{dt} &= \alpha_{\text{ini}}^{nasc\mathcal{B}} [i = i_{\text{ini}}^{nasc\mathcal{B}}] - \omega_{\text{term}}^{nasc\mathcal{B}} C_{i,nasc\mathcal{B}}(t) \\ &\quad - \kappa_{\text{co}} C_{i,\mathcal{A}}(t) \cdot C_{i,nasc\mathcal{B}}(t), \end{aligned} \quad (6.4c)$$

für $i = 1, \dots, N$,

$$\frac{dC_{i,A}(t)}{dt} = \frac{D_A}{\Delta X^2} (C_{i+1,A}(t) + C_{i-1,A}(t) - 2C_{i,A}(t)) + \omega_{\text{term}}^{\text{nascA}} C_{i,\text{nascA}}(t) - \kappa_{\text{post}} C_{i,A}(t) \cdot C_{i,\text{B}}(t) - \kappa_{\text{co}} C_{i,A}(t) \cdot C_{i,\text{nascB}}(t) - \gamma_{\text{deg}}^A C_{i,A}(t), \quad (6.5a)$$

$$\frac{dC_{i,B}(t)}{dt} = \frac{D_B}{\Delta X^2} (C_{i+1,B}(t) + C_{i-1,B}(t) - 2C_{i,B}(t)) + \omega_{\text{term}}^{\text{nascB}} C_{i,\text{nascB}}(t) - \kappa_{\text{post}} C_{i,A}(t) \cdot C_{i,\text{B}}(t) - \gamma_{\text{deg}}^B C_{i,B}(t), \quad (6.5b)$$

$$\frac{dC_{i,AB\text{post}}(t)}{dt} = \frac{D_{AB}}{\Delta X^2} (C_{i+1,AB\text{post}}(t) + C_{i-1,AB\text{post}}(t) - 2C_{i,AB\text{post}}(t)) + \kappa_{\text{post}} C_{i,A}(t) \cdot C_{i,B}(t), \quad (6.5c)$$

$$\frac{dC_{i,AB\text{co}}(t)}{dt} = \frac{D_{AB}}{\Delta X^2} (C_{i+1,AB\text{co}}(t) + C_{i-1,AB\text{co}}(t) - 2C_{i,AB\text{co}}(t)) + \omega_{\text{term}}^{\text{nascB}} C_{i,\text{nascB}}(t), \quad (6.5d)$$

für $i = 2, \dots, N - 1$, und

$$\frac{dC_{1,A}(t)}{dt} = \frac{D_A}{\Delta X^2} (C_{2,A}(t) - C_{1,A}(t)) + \omega_{\text{term}}^{\text{nascA}} C_{1,\text{nascA}}(t) - \kappa_{\text{post}} C_{1,A}(t) \cdot C_{1,B}(t) - \kappa_{\text{co}} C_{1,A}(t) \cdot C_{1,\text{nascB}}(t) - \gamma_{\text{deg}}^A C_{1,A}(t), \quad (6.5e)$$

$$\frac{dC_{N,A}(t)}{dt} = \frac{D_A}{\Delta X^2} (C_{N-1,A}(t) - C_{N,A}(t)) + \omega_{\text{term}}^{\text{nascA}} C_{N,\text{nascA}}(t) - \kappa_{\text{post}} C_{N,A}(t) \cdot C_{N,B}(t) - \kappa_{\text{co}} C_{N,A}(t) \cdot C_{N,\text{nascB}}(t) - \gamma_{\text{deg}}^A C_{N,A}(t), \quad (6.5f)$$

$$\frac{dC_{1,B}(t)}{dt} = \frac{D_B}{\Delta X^2} (C_{2,B}(t) - C_{1,B}(t)) + \omega_{\text{term}}^{\text{nascB}} C_{1,\text{nascB}}(t) - \kappa_{\text{post}} C_{1,A}(t) \cdot C_{1,B}(t) - \gamma_{\text{deg}}^B C_{1,B}(t), \quad (6.5g)$$

$$\frac{dC_{N,B}(t)}{dt} = \frac{D_B}{\Delta X^2} (C_{N-1,B}(t) - C_{N,B}(t)) + \omega_{\text{term}}^{\text{nascB}} C_{N,\text{nascB}}(t) - \kappa_{\text{post}} C_{N,A}(t) \cdot C_{N,B}(t) - \gamma_{\text{deg}}^B C_{N,B}(t), \quad (6.5h)$$

$$\frac{dC_{1,AB\text{post}}(t)}{dt} = \frac{D_{AB}}{\Delta X^2} (C_{2,AB\text{post}}(t) - C_{1,AB\text{post}}(t)) + \kappa_{\text{post}} C_{1,A}(t) \cdot C_{1,B}(t), \quad (6.5i)$$

$$\frac{dC_{N,AB\text{post}}(t)}{dt} = \frac{D_{AB}}{\Delta X^2} (C_{N-1,AB\text{post}}(t) - C_{N,AB\text{post}}(t)) + \kappa_{\text{post}} C_{N,A}(t) \cdot C_{N,B}(t), \quad (6.5j)$$

$$\frac{dC_{1,AB\text{co}}(t)}{dt} = \frac{D_{AB}}{\Delta X^2} (C_{2,AB\text{co}}(t) - C_{1,AB\text{co}}(t)) + \omega_{\text{term}}^{\text{nascB}} C_{1,\text{nascB}}(t), \quad (6.5k)$$

$$\frac{dC_{N,AB\text{co}}(t)}{dt} = \frac{D_{AB}}{\Delta X^2} (C_{N-1,AB\text{co}}(t) - C_{N,AB\text{co}}(t)) + \omega_{\text{term}}^{\text{nascB}} C_{N,\text{nascB}}(t), \quad (6.5l)$$

Abbildung 6.7 zeigt den Einfluss der Degradation auf die Lokalisierung der Komplexbildung in der Simulation. Der dafür verwendete Parametersatz ist so gewählt, dass er die Eigenschaften der von unserem Kooperationspartner (in Abschnitt 6.1) verwendeten Proteine abbildet Tabelle A.19. Es werden die Fälle mit und ohne Degradation der Proteinuntereinheiten \mathcal{A} , \mathcal{B} verglichen.

Ohne eine Degradation ergibt sich für hinreichend lange Zeiten eine homogene Verteilung der frei diffundierenden \mathcal{A} , \mathcal{B} -Untereinheiten (Abbildung 6.7 a), wobei in den Bereichen rechts der \mathcal{A} -Quelle weniger \mathcal{A} als \mathcal{B} Untereinheiten zu finden sind. Die post-translationale Assemblierung ist durch die Verteilung der beiden Untereinheiten bestimmt. Die \mathcal{A} -Proteine sind limitierend, sodass die Verteilung des Entstehungsortes der Komplexe² ihnen folgt (Abbildung 6.7 b). Die co-translationale Komplexbildung ist durch die Verteilung der \mathcal{A} und der $nasc\mathcal{B}$ bestimmt. Die naszierenden Ketten $nasc\mathcal{B}$ der \mathcal{B} -Proteine sind im Bereich der Quelle der \mathcal{B} -Proteine immobilisiert. Eine Entstehung der co-translationally assemblierten Komplexe $\mathcal{A}\mathcal{B}_{co}$ findet somit lediglich im Bereich der \mathcal{B} Quelle statt. Da in diesem Bereich mehr $nasc\mathcal{B}$ -Ketten als \mathcal{A} -Proteine existieren (Abbildung 6.7 a), folgt die Verteilung des Erzeugungsortes der Komplexe³ in etwa der Verteilung der Proteinuntereinheiten \mathcal{A} . Dieser Aspekt wird durch die Einführung der Degradation verstärkt.

Die Degradation bewirkt für hinreichend lange Zeiten eine ortsfeste und stationäre Verteilung der freien Proteinuntereinheiten \mathcal{A} und \mathcal{B} , was auch zu einer Lokalisierung der Proteinkomplexbildung führt. Die maximale Ausbeute an Komplexen $\mathcal{A}\mathcal{B}_{co}$ und $\mathcal{A}\mathcal{B}_{post}$ erhält man in Bereichen, in denen von beiden Proteinuntereinheiten genug zur Verfügung steht (Abbildung 6.7 d). Deshalb entsteht die maximale Konzentration an post-translationally assemblierten Komplexen $\mathcal{A}\mathcal{B}_{post}$ im Schnittpunkt der Verteilung der freien Proteinuntereinheiten \mathcal{A} und \mathcal{B} (Abbildung 6.7 c, d). Die Verteilung der Komplexe links und rechts vom Maximum folgt der jeweils limitierenden Untereinheit. Somit folgt die linke Seite der Limitierung durch \mathcal{B} -Untereinheiten und die rechte Seite der Limitierung durch \mathcal{A} -Proteine. Für den co-translationalen Assemblierungspfad lassen sich ebenfalls Unterschiede in der Komplexbildung im Vergleich zum Fall ohne Degradation feststellen: Während im Fall ohne Degradation im \mathcal{B} -Quellenbereich eine fast homogene Verteilung der $nasc\mathcal{B}$ entsteht, bewirkt die Degradation der \mathcal{A} -Proteine eine deutlich inhomogene Verteilung, der $nasc\mathcal{B}$ im \mathcal{B} -Quellenbereich (Abbildung 6.7 c). Das Maximum der Komplexbil-

²Beobachtet wird der Entstehungsort der co-translationally assemblierten Komplexe $\mathcal{A}\mathcal{B}_{co}$ und der post-translationally assemblierten Komplexe $\mathcal{A}\mathcal{B}_{post}$

³co-translationally assembliert $\mathcal{A}\mathcal{B}_{co}$

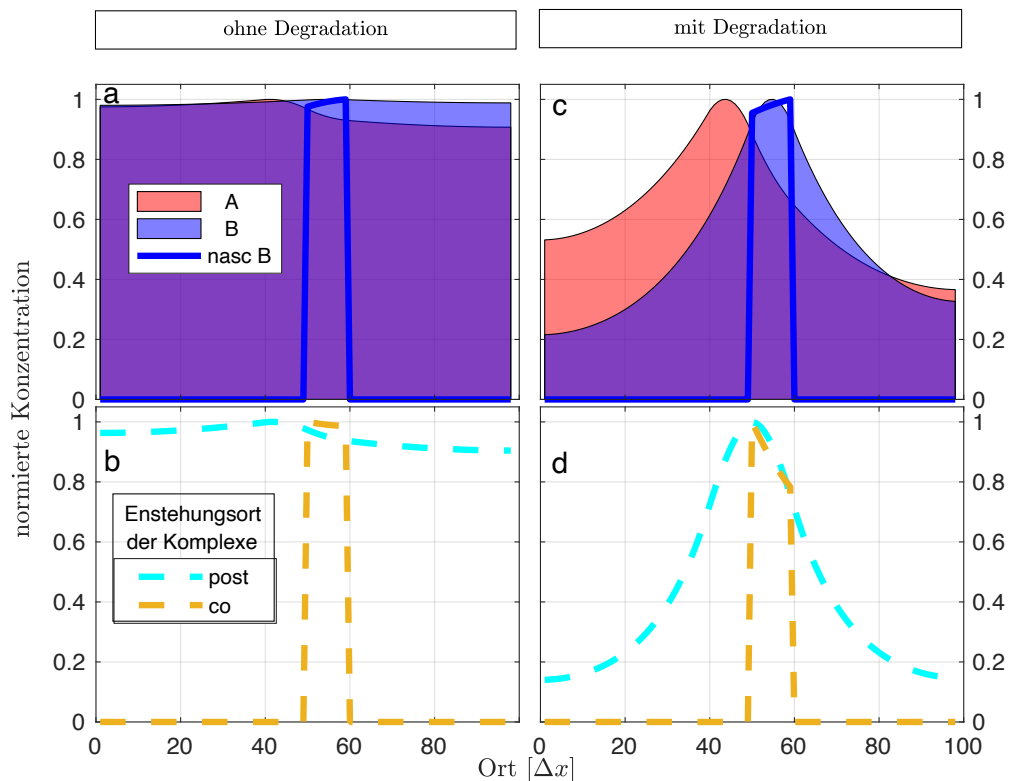


Abbildung 6.7.: Verteilungen von zwei Proteinuntereinheiten und Ort der Komplexbildung ohne (links) und mit (rechts) Degradation der Proteinuntereinheiten A und B . Gezeigt werden die Verteilungen: (a, c) der freien Proteinuntereinheiten A , B und die naszierenden Ketten B ; (b, d) der Entstehungsorte der co- und post-translationalen Proteinkomplexe AB_{co} und AB_{post} .

lung liegt im Schnittpunkt der Verteilung der $nascB$ und der A -Untereinheiten. Die Verteilung, der co-translational assemblierten Komplexe rechts vom Maximum der $nascB$ nimmt mit sinkender Konzentration der A -Proteine ab.

Durch das Einführen einer Degradation der freien Proteinuntereinheiten lässt sich die Lokalisierung der Proteine steuern. Dies erlaubt eine Lokalisierung der Proteinuntereinheiten, selbst bei einer hohen Diffusion⁴ und einer geringen Bindeaffinität.

Einfluss des Abstands der Translationsorte

Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt, hat die Lokalisierung der Proteinuntereinheiten einen Einfluss auf die Lokalisierung der Komplexbildung, insbesondere der post-translational assemblierten Komplexe. Hier verhindern die geringe

⁴Eine hohe Diffusion bedeutet, dass das Protein die gesamte Zelllänge in wenigen Sekunden durchqueren kann.

Bindeaffinität und die hohe Diffusionskonstante bei zu geringen Degradationsraten eine Lokalisierung. Die Erzeugung der co-translational assemblierten Komplexe ist auf Grund ihrer Immobilisierung stets lokalisiert.

Die Betrachtungen in Abbildung 6.7 beziehen sich nur auf einen ausgewählten Zeitpunkt. Im Folgenden soll eine genaue Untersuchung der Dynamik der Komplexbildung erfolgen – bezogen auf die Degradation der Proteinuntereinheiten und mit Fokus auf den Abstand der Translationsorte zueinander.

Die Betrachtung der Dominanz des co-translationalen oder post-translationalen Assemblierungspfades erfolgt über das Verhältnis aus der Gesamtkonzentration der co- zur Konzentration der post-translational assemblierten Komplexe

$$d_{\text{Ass}}(t) = \frac{C_{\mathcal{A}nasc\mathcal{B}}(t) + C_{\mathcal{A}\mathcal{B}co}(t)}{C_{\mathcal{A}\mathcal{B}post}(t)} . \quad (6.6)$$

Ist die Dominanz der Assemblierung $d_{\text{Ass}} > 1$ sprechen wir von einer co-translational dominierten und bei $d_{\text{Ass}} \leq 1$ von einer post-translational dominierten Assemblierung.

Die Verringerung des Abstandes der Translationsorte führt unabhängig von der Degradation der Proteinuntereinheiten zu einer Erhöhung der Dominanz der Assemblierung d_{Ass} (Abbildung 6.8 a, c). Durch die Degradation der Proteinuntereinheiten wird der Einfluss des Abstandes der Translationsorte auf die Dominanz des co-translationalen Assemblierungspfades ausgeprägter (Abbildung 6.8 c). Während für kurze Zeitskalen unter $\frac{1}{2}$ min der post-translationaler Assemblierungsprozess noch überwiegt, steigt die Dominanz des co-translationalen Assemblierungsprozesses mit der Zeit an. Auf längeren Zeitskalen $t > 5$ min ist die co-translational Komplexbildung dominant und ein quasi-stationärer Zustand stellt sich ein.

Mit einer endlichen Degradation der Proteinuntereinheiten wirkt sich die Verringerung des Abstandes der Translationsorte positiv auf die Effizienz der Komplexbildung aus: Es entstehen mehr Komplexe pro Zeit, wenn die Translationsorte dicht beieinander liegen, als bei weit entfernten Translationsorten. Ohne Degradation ist bei der Variation des Abstandes kein Unterschied in der Effizienz der Komplexbildung erkennbar. Trotz der Dominanz der co-translationalen Komplexbildung und deren Lokalisierung hat auf Grund der homogenen Verteilung der Proteinuntereinheiten \mathcal{A} , \mathcal{B} die Lokalisierung der Translationsorte keinen Einfluss auf die Gesamteffizienz der Komplexbildung.

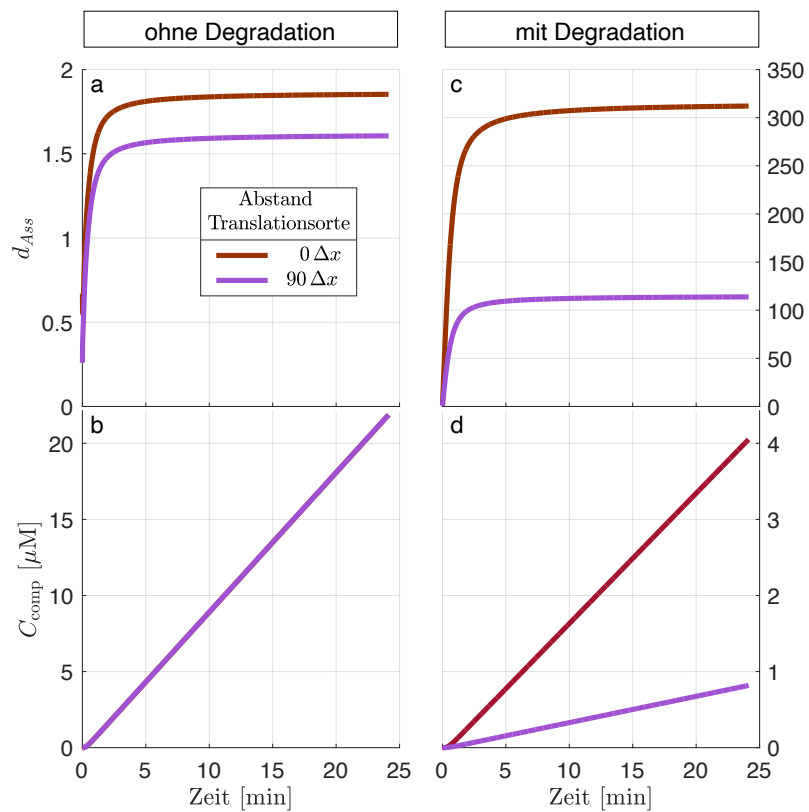


Abbildung 6.8.: Die Effizienz der Komplexbildung ist nur dann vom Abstand zwischen Translationsorten abhängig, wenn die Degradation der Proteinuntereinheiten nicht Null ist. (a) und (c) zeigen die Dominanz der Assemblierung, definiert in Gleichung (6.6) (b) und (d) geben die Gesamtkonzentration an Komplexen ($C_{\text{comp}} = C_{\text{AnascB}}(t) + C_{\text{ABco}}(t) + C_{\text{ABpost}}(t)$) im Lauf der Zeit an.

6.3. Initiationsrate beeinflusst den Assemblierungsprozess

Im hier diskutierten Modell haben die Quellen \mathcal{A} und \mathcal{B} voneinander unterscheidbare Initiationsraten $\alpha_{\text{ini}}^{\text{nascA}}$ und $\alpha_{\text{ini}}^{\text{nascB}}$ für die naszierenden Ketten nascA und nascB . Somit entstehen in der einen Proteinquelle mehr naszierende Polypeptidketten pro Zeit als in der anderen. Die Translation der Proteinuntereinheiten \mathcal{A} und \mathcal{B} findet zur gleichen Zeit und im Gegensatz zum vorherigen Abschnitt, am gleichen Ort statt. In Abbildung 6.9 werden drei Kombinationen der Initiationsraten $\alpha_{\text{ini}}^{\text{nascA}} < \alpha_{\text{ini}}^{\text{nascB}}$, $\alpha_{\text{ini}}^{\text{nascA}} > \alpha_{\text{ini}}^{\text{nascB}}$, sowie $\alpha_{\text{ini}}^{\text{nascB}} = \alpha_{\text{ini}}^{\text{nascA}}$ verwendet und deren Einfluss auf Dynamik und Dominanz des Assemblierungspfad untersucht.

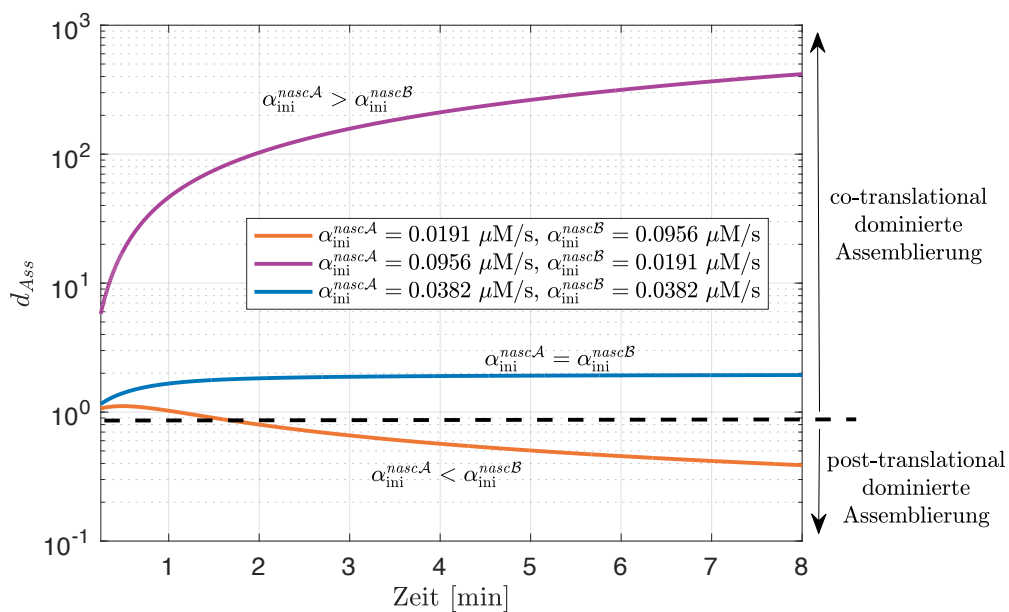


Abbildung 6.9.: Initiationsraten beeinflussen die Dominanz d_{Ass} der co-translationalen Assemblierung. Initiationsraten $\alpha_{\text{ini}}^{\text{nascA}}$ und $\alpha_{\text{ini}}^{\text{nascB}}$ für nascA und nascB : $\alpha_{\text{ini}}^{\text{nascA}} < \alpha_{\text{ini}}^{\text{nascB}}$ (orange), $\alpha_{\text{ini}}^{\text{nascA}} = \alpha_{\text{ini}}^{\text{nascB}}$ (blau), $\alpha_{\text{ini}}^{\text{nascA}} > \alpha_{\text{ini}}^{\text{nascB}}$ (magenta). Nur im ersten Fall dominiert die post-translationale Assemblierung für hinreichend große Zeiten.

Der erste Fall mit, einer fünfmal geringeren Initiationsrate $\alpha_{\text{ini}}^{\text{nascA}}$ im Vergleich zu $\alpha_{\text{ini}}^{\text{nascB}}$ ($\alpha_{\text{ini}}^{\text{nascA}} < \alpha_{\text{ini}}^{\text{nascB}}$) zeigt nach einer anfänglichen Dominanz der co-translational assemblierten Komplexe für große Zeitskalen eine Dominanz der post-translational assemblierten Komplexe (Abbildung 6.9). Bei einer höheren Initiationsrate der \mathcal{A} -Proteine ($\alpha_{\text{ini}}^{\text{nascA}} > \alpha_{\text{ini}}^{\text{nascB}}$) hingegen dominiert der co-translational Assemblierungspfad (Abbildung 6.9). Die Dominanz d_{Ass} steigt mit der Zeit weiter an und erreicht bereits nach 8 min den Wert 420. Im Fall gleich großer Initiationsraten ($\alpha_{\text{ini}}^{\text{nascB}} = \alpha_{\text{ini}}^{\text{nascA}}$) folgt auf einen anfänglichen Anstieg der Dominanz der co-translationalen Assemblierung eine Sättigung bei einem Wert von ungefähr 2.

Die alleinige Erhöhung der Initiationsrate für die naszierende Kette $nas\mathcal{A}$ bewirkt also eine zunehmende co-translationale Assemblierung, eine Erhöhung der Initiationsrate für die naszierende Kette $nas\mathcal{B}$ hingegen einen Wechsel von einer anfänglich co-translationalen Assemblierung hin zur post-translational dominierten Komplexbildung. Obwohl \mathcal{A} - und \mathcal{B} -Untereinheiten am selben Ort entstehen ist im Bereich kleiner Zeitskalen, d.h. bis ca. 1 min, ein Vorteil der co-translationalen Komplexbildung im Vergleich zur post-translationalen Komplexbildung zu erkennen. Der Unterschied in der Konzentration der Komplexe ist jedoch gering (siehe Anhang Abbildung E.2).

6.4. Einfluss der Operonanordnung auf die Assemblierung

Die Operonanordnung wird simuliert durch unterschiedlich große Startkonzentrationen an naszierenden Ketten $nas\mathcal{A}$, $nas\mathcal{B}$ und bereits freien Proteinuntereinheiten \mathcal{A} , \mathcal{B} . Eine Operonanordnung $\mathcal{A}\mathcal{B}$ bewirkt, dass \mathcal{A} vor \mathcal{B} translatiert wird, was in der Simulation durch eine Startkonzentration $C_{i_{ini}^{nas\mathcal{A}},nas\mathcal{A}}(t=0) > 0$ der $nas\mathcal{A}$ -Ketten und einer Konzentration $C_{i_{ini}^{nas\mathcal{A}},\mathcal{A}}(t=0) > 0$ der \mathcal{A} Proteine in den Quellbereichen $i_{ini}^{nas\mathcal{A}}$ implementiert ist; entsprechend der Operonanordnung $\mathcal{B}\mathcal{A}$. Alle anderen Anfangskonzentrationen bleiben Null. Der Wert der Anfangskonzentration der naszierenden Ketten hängt von der Länge der jeweiligen mRNA ab: Da auf eine längere mRNA mehr Ribosomen passen, können somit auch mehr naszierende Ketten des betreffenden Proteintyps entstehen. Für den Fall, dass die \mathcal{B} -mRNA um den Faktor r länger ist als die \mathcal{A} -mRNA, ergibt sich für die Operonanordnung $\mathcal{B}\mathcal{A}$ eine r -mal größere Anzahl an $nas\mathcal{B}$ im Vergleich zur Anzahl an $nas\mathcal{A}$ bei der Operonanordnung $\mathcal{A}\mathcal{B}$. Für eine Translation von \mathcal{A} und \mathcal{B} zur gleichen Zeit wird das in Abschnitt 6.3 beschriebene System verwendet, in dem die Startkonzentrationen aller Spezies Null sind. Wir unterscheiden im Folgenden also zwischen drei Fällen: Operonanordnung $\mathcal{A}\mathcal{B}$, Operonanordnung $\mathcal{B}\mathcal{A}$, gleichzeitige Translation der Proteinuntereinheiten \mathcal{A} und \mathcal{B} .

Untersucht wird der Einfluss der Operonanordnung auf die Dominanz der Assemblierungspfade (Abbildung 6.10) d_{Ass} definiert in Gleichung (6.6). Das binäre Farbschema in Abbildung 6.10 stellt die Dominanz d_{Ass} (Gleichung (6.6)) des jeweiligen Assemblierungspfades dar, wobei blau ($d_{Ass} > 1$) für eine dominante co-translationale und rot ($d_{Ass} \leq 1$) für eine post-translational dominierte Assemb-

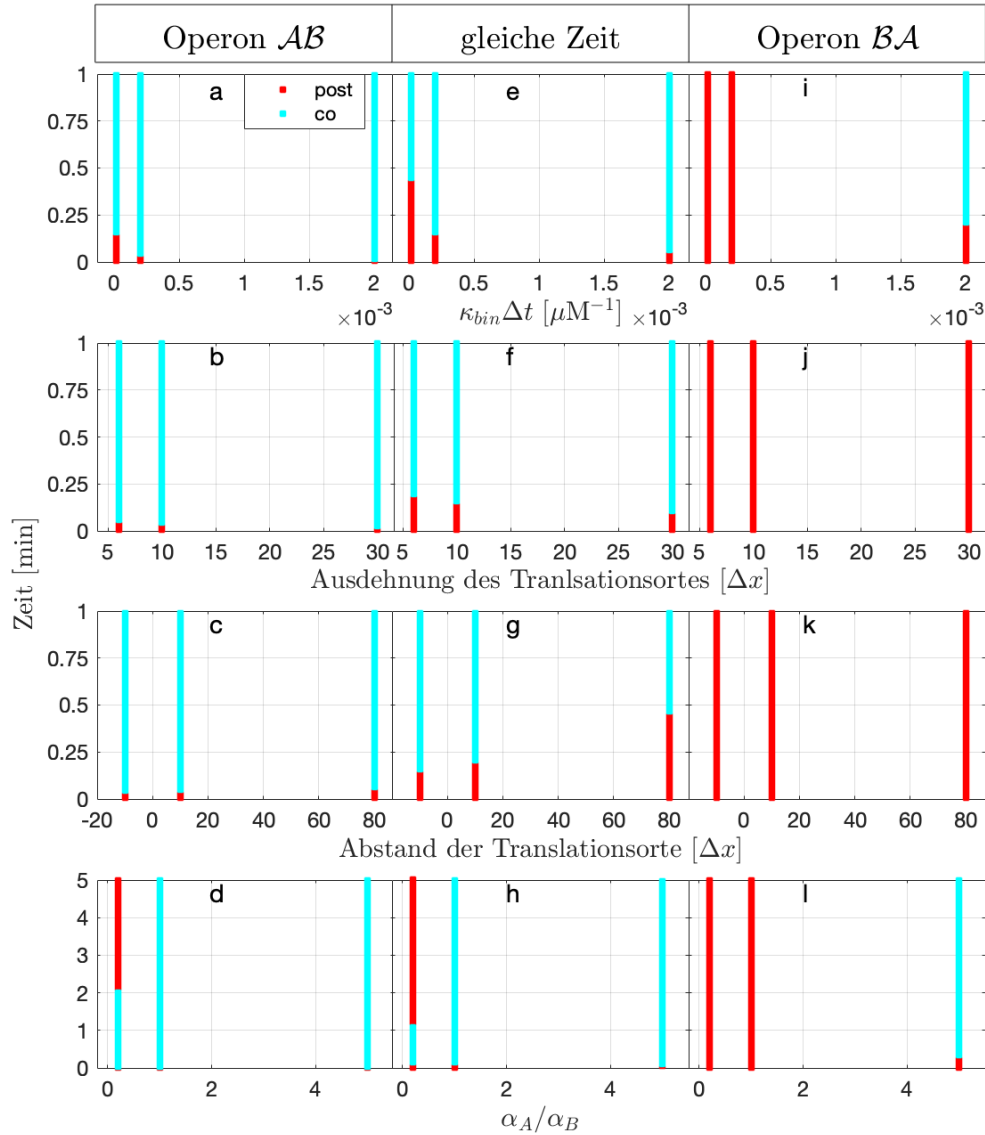


Abbildung 6.10.: Einfluss der Opernanordnung auf den Regimewechsel von post- (rot) und co-translationaler (blau) Assemblierung. Die Spalten stehen für die unterschiedliche Opernanordnung (a-d) Operon \mathcal{AB} , (e-h) Startpunkt der Initiation von \mathcal{A} , \mathcal{B} erfolgt zur gleichen Zeit, (i-j) Operon \mathcal{BA} . Jede Zeile zeigt die Variation eines anderen Parameters (a, e, i) Bindeaffinität κ_{bin} der Proteine, (b, f, j) Breite des Translationsortes, (c, g, k) Abstand der Translationsorte, (d, h, j) Verhältnis $\alpha_{ini}^{nascA} / \alpha_{ini}^{nascB}$ aus der Initiationsrate des Proteins \mathcal{A} und \mathcal{B} .

lierung steht. Am Beispiel des Abstands der Translationsorte soll der Einfluss der Operonanordnung im Folgenden diskutiert werden (Abbildung 6.10 c, g, k). Für alle Operonanordnungen ist der post-translationale Assemblierungspfad auf kurzen Zeitskalen dominant. Nach einer bestimmten Zeit erfolgt ein Regimewechsel vom post- zum co-translational dominierten Assemblierungsprozess, der je nach Operonanordnung zu unterschiedlichen Zeiten stattfindet. Für die Operonanordnung \mathcal{AB} und der zeitgleichen Translation von \mathcal{A} und \mathcal{B} , ergibt sich für Zeiten $t > 1$ min ein co-translational dominierter Assemblierungspfad (Abbildung 6.10 c, g). Im Gegensatz dazu kommt es für die Operonanordnung \mathcal{BA} (Abbildung 6.10 k) zu keinem Regimewechsel. Somit bleibt auch für lange Zeiten die Dominanz der post-translationalen Assemblierung bestehen.

Die Operonanordnung \mathcal{AB} (Abbildung 6.10 c) und die zeitgleiche Translation von \mathcal{A} und \mathcal{B} (Abbildung 6.10 g) zeigen bei einer Vergrößerung des Abstandes der Translationsorte eine Verzögerung des Regimewechsels von einem dominierenden post-translationalen zu einem co-translational dominierten Assemblierungspfad. Allerdings ist der Einfluss des Abstandes der Translationsorte im Fall der Operonanordnung \mathcal{AB} auf die Zeitverschiebung des Regimewechsels vernachlässigbar klein. Die Steuerung der Dominanz des jeweiligen Assemblierungspfades kann somit durch die Operonanordnung und durch den Abstand der Translationsorte erfolgen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei gleicher Initiation des Translationsprozesses (Abbildung 6.10 a-c, e-g, i-k) der post-translationale Assemblierungsprozess auf kurzen Zeitskalen dominiert. Die Operonanordnung \mathcal{AB} (Abbildung 6.10 a-c) unterstützt die Dominanz des co-translationalen Assemblierungsprozesses, wohingegen bei der Operonanordnung \mathcal{BA} (Abbildung 6.10 i-k) der post-translationale Assemblierungsprozess auch auf längeren Zeitskalen dominieren kann. Die Operonanordnung hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die Dominanz der Assemblierungspfade.

Kapitel 7

Fazit und Ausblick

Die Effizienz und die Präzision, mit der Proteinkomplexe in Zellen gebildet werden, ist zu weiten Teilen noch unverstanden und daher Gegenstand aktueller Forschung. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Proteinkomplexbildung sowohl in zellfreien *in-vitro*-Systemen als auch im *in-vivo*-Modellsystem *E. coli* analytisch sowie *in-silico* beschrieben und untersucht. Hierbei lag der Fokus auf der Kopplung von Proteinsynthese und Komplexbildung der Proteinuntereinheiten. Die Modellierung erfolgte in Abstimmung mit den Arbeitsgruppen von Roy Bar-Ziv (Weizmann-Institut, Rehovot, Israel) und Günter Kramer (Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg), um eine möglichst realistische *in-silico*-Nachbildung der experimentellen Systeme unserer Kooperationspartner zu erhalten. So berücksichtigt unser *in-silico*-Modell der Proteinkomplexbildung u. a. verschiedene Syntheseorte und molekulare Eigenschaften der beteiligten Proteinuntereinheiten wie deren Diffusionsraten und Bindeaffinitäten. Mit diesem Modell wurden insbesondere die Dynamik der Komplexbildung, die Lokalisierung der Komplexe sowie die Dominanz unterschiedlicher Assemblierungspfade untersucht.

In Kapitel 4 wurde zunächst ein vereinfachtes *in-vitro*-System diskutiert, in dem Proteinuntereinheiten eines Typs überall oder in räumlich begrenzten Regionen erzeugt und durch molekulare Fallen an der Oberfläche gebunden werden. Hierbei wurde auch die Endlichkeit der Bindekapazität aufgrund der begrenzten Anzahl an verfügbaren Fallen berücksichtigt. In diesem vereinfachten System wurde der Einfluss der Diffusionskonstanten, der Syntheserate und der Bindeaffinität auf die Fallen-Effizienz untersucht.

Es stellte sich heraus, dass Systeme mit einer räumlich homogenen Erzeugung von Untereinheiten einen Übergang von einem binde- zu einem produktionsdominier-

ten Regime durchlaufen. Das erste Regime ist charakterisiert durch eine Dominanz der Bindung der Proteinuntereinheiten an die Oberfläche. Das zweite Regime ist geprägt von einer abnehmenden Fallen-Effizienz, die von einer hohen Fallenbesetzung verursacht wird und mit dem Auffüllen des *in-vitro*-Systems mit ungebundenen Proteinuntereinheiten einhergeht. Die Einführung einer örtlich inhomogenen Erzeugung der Proteinuntereinheiten bewirkt eine Aufspaltung in drei Regime: Ein rein bindedominiertes Regime, ein Mischregime und ein rein produktionsdominiertes Regime. Der Übergang von einem bindedominierten zu einem Mischregime erfolgt, wenn ein Großteil der Fallen in der Nähe des Syntheseortes besetzt ist. Der Übergang vom Mischregime zum reinen produktionsdominierten Regime tritt auf, wenn auch in den von der Synthese entfernten Regionen die Verfügbarkeit an freien Fallen abnimmt. Neben den Syntheseorten können auch die molekularen Fallen räumlich inhomogen verteilt sein, was eine Veränderung der Fallen-Effizienz insbesondere im Mischregime zur Folge hat. Es zeigte sich, dass sich – je nach Wahl der Systemparameter – die Fallenverteilung lange vor einer vollständigen Fallensättigung in der Verteilung der gebundenen Proteine an der Oberfläche wiederfinden kann. Die Modifizierung der Fallenverteilung ermöglicht somit eine gezielte zeitabhängige und räumliche Steuerung der Bindung der Proteinuntereinheiten an die Oberfläche. In Systemen mit räumlich stark eingeschränkter Bindung wirkt sich eine Variation des Abstandes zwischen dem Proteinsyntheseort und dem Fallenbereich je nach Parameterwahl unterschiedlich auf die Bindung der Proteine an die Oberfläche aus. Diese Abhängigkeit liefert einen neuen Ansatz zur Abschätzung der Bindeaffinität eines Proteins, sofern seine Syntheserate und Diffusionskonstante bekannt sind. Mit Hilfe unserer Kooperationspartner vom Prof. Dr. Roy Bar-Ziv (Weizmann-Institut, Israel) konnte zum einen das in Abschnitt 4.3 eingeführte System (Einzelbinder) experimentell validiert und zum anderen dessen Modellparameter bestimmt werden. So stimmte die im Experiment beobachtete Bindung der Proteine *gp10* und GFP bei unterschiedlichen Syntheseraten und Fallenverteilungen sehr gut mit den Vorhersagen der Computersimulationen überein. Das Modell kann beispielsweise verwendet werden, um in Abhängigkeit der Systemparameter das Maximum der Fallen-Effizienz zu ermitteln und somit die optimale Experimentlaufzeit zu bestimmen.

Die Bildung von Proteinkomplexen aus zwei Untereinheiten wurde durch die Erweiterung des einfachen *in-vitro*-Systems mit einem zusätzlichen Proteintyp in Kapitel 5 untersucht. Hierbei wurde zwischen zwei möglichen Pfaden der Komplex-

bildung, der *Oberflächenassemblierung* und der *Lösungassemblierung*, unterscheiden. Bei gleicher Wahl der Parameter (Bindeaffinität, Diffusionskonstante und Produktionsrate aller Proteinuntereinheiten bzw. Komplexe) wird der Assemblierungsprozess zunächst durch die *Oberflächenassemblierung* dominiert. Die zunehmende Besetzung der Fallen verringert diese Dominanz *oberflächen-*assemblierter Komplexe. Je nach Wahl der Systemparameter kann es schließlich zu einem Regimewechsel von einer Dominanz der *Oberflächenassemblierung* zu einer Dominanz der *Lösungassemblierung* kommen. Der Vergleich von Simulationen und experimentellen Daten, in denen der Abstand der Translationsorte variiert worden ist, hat gezeigt, dass das numerische Modell gut an die experimentellen Daten angepasst werden kann. Mit dem angepassten Modell konnte gezeigt werden, dass der Abstand der Translationsorte direkt die Komplexbildung beeinflusst. So ist der Prozess umso effizienter, je geringer der Abstand zwischen den Synthesorten ist.

In Kapitel 6 haben wir unser Modell für die Analyse der Komplexbildung mit zwei Proteinuntereinheiten \mathcal{A} und \mathcal{B} in der lebenden Zelle angepasst. Im Gegensatz zum *in-vitro*-System entsteht beim *in-vivo*-System die räumliche Distanz zwischen den Synthesorten der beiden Proteinuntereinheiten nicht durch eine fest vorgegebene Einteilung des Reaktionsvolumens in Kompartimente, sondern durch den Abstand proteincodierender Sequenzen auf dem Chromosom des Bakteriums. Doch auch im *in-vivo*-System existieren zwei konkurrierende Assemblierungspfade, die co- und die post-translationale Assemblierung. Die hier vorgestellten Analysen haben gezeigt, dass die Operonanordnung bestimmt, auf welchen Zeitskalen eine Dominanz von co- oder post-translationaler Assemblierung vorherrscht. Wenn Protein \mathcal{B} co-translational von Protein \mathcal{A} gebunden werden kann, aber nicht umgekehrt, so führt die Operonanordnung $\mathcal{A}\mathcal{B}$ zu einer Dominanz der co-translationalen Assemblierung und die Operonanordnung $\mathcal{B}\mathcal{A}$ zu einer Dominanz der post-translationalen Assemblierung. Bei einer genau gleichzeitigen Translation der Proteinuntereinheiten tritt ein Regimewechsel von der post- zur co-translationalen Assemblierung auf, wobei der Zeitpunkt des Regimewechsels vom Abstand zwischen den Operonen abhängig ist: Je geringer der Abstand, desto schneller findet der Regimewechsel statt. Bei realistischen Diffusionskonstanten der Proteine und für lange Zeitskalen hat der Operonabstand keinen Einfluss auf die Anzahl der gebildeten Komplexe, es sei denn, die Proteine haben eine ausreichend hohe Degradationsrate. In diesem Fall entsteht bei einem großen Operonabstand eine kleinere Anzahl an Komplexen als bei einem geringen Abstand.

Die in dieser Arbeit entwickelten *in-silico*-Modelle lassen sich direkt auf andere Systeme beispielsweise aus der synthetischen Biologie oder der molekularen Biotechnologie anwenden. Dabei sind die Anwendungen nicht auf reine Proteinkomplex-Systeme beschränkt. Die *in-silico*-Modelle ließen sich beispielsweise auch für die Analyse und Optimierung von DNA-Origami-Systemen oder der Assemblierung von Block-Copolymeren nutzen.

Kapitel 8

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken die zum Abschluss dieser Doktorarbeit beigetragen haben. In erster Linie geht mein Dank an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Lipowsky, der mir die Möglichkeit gegeben hat in seiner Abteilung an diesem vielfältigen Projekt zu arbeiten. Insbesondere möchte ich mich für die jahrelange Unterstützung, wissenschaftliche Anleitung und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Ein weiterer Dank geht an Frau Prof. Dr. Sophia Rudorf für ihre herzliche Betreuung, kreative Ideen und inspirierenden Diskussionen, die ich sehr geschätzt habe. Ihre Unterstützung sowohl innerhalb, als auch außerhalb des Instituts waren wichtig für meine Weiterentwicklung.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Edda Klipp als dritte Gutachterin meiner Dissertation, dass sie sich die Zeit nimmt meine Arbeit zu begutachten.

Unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Roy Bar-Ziv und Mitarbeiter*innen möchte ich für die unglaublich tolle Gastfreundschaft in Israel, die fruchtbare Zusammenarbeit und die Durchführung der Experimente danken. Insbesondere geht dabei mein Dank an Dr. Ohad Vonshak für seine Zeit für die unzähligen Webmeetings.

Auch unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Bernd Bukau und Mitarbeiter*innen möchte ich danken für die Zusammenarbeit und meine Zeit im Labor in Heidelberg. Insbesondere geht mein Dank an Dr. Günter Kramer, Yu-Wei und Josef für die Einführung in die Welt der co-translationalen Komplexbildung.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Theorieabteilung bin ich sehr dankbar für die Unterstützung, das Teilen Ihres Wissens und die tolle Arbeitsatmosphäre. Ich würde immer wieder mit euch zusammenarbeiten. Besonderer Dank geht an

8. Danksagung

Susi bei allen administrativen Arbeiten, René und der IT für die hervorragende technische Unterstützung. Insbesondere möchte ich mich bei den besten Bürokollegen ever Simon, Vahid, Marzie und Nadin bedanken. Aparna, Rikhia, Pallavi, Isabelle danke ich für entschleunigende Mittagspausen und gemeinsamen Unternehmungen. Ein lieber Dank geht an Jan-Hendrik für das Interesse an meiner Arbeit und die tollen Hundebildmotivationen.

Meinen Freunden, insbesondere Mario, Basti, Carina und Jan bin ich unglaublich dankbar für die Perspektivwechsel, ein offenes Ohr und die Möglichkeit dem Alltag zu entfliehen. Danke das ihr es so lange mit mir ausgehalten habt. Ich freue mich auf weitere schöne Jahre mit euch.

Meinem Freund Markus danke ich für seine uneingeschränkte Liebe und mir immer wieder auf die Füße zu treten. Es ist geschafft jetzt können wir unsere gemeinsamen Backprojekte starten.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und meiner Familie, die mich mein Leben lang unterstützt haben und ohne die ich es niemals bis hierher geschafft hätte und ihrer Geduld mit mir.

Anhang A

Parameter

Dieser Abschnitt listet die Parameter auf, mit denen die Abbildungen in dieser Arbeit erzeugt worden sind. Eine detailliertere Auflistung der Tabellen findet sich unter <https://github.com/stefoe-up/phd-project>.

Tabelle A.1.: Parameter für Abschnitt 4.1 Abbildung 4.2

α_{prod} [$\mu\text{M s}^{-1}$]	κ_{bin} [$\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$]	$C_{\text{b}}^{\text{max}}$ [μM]	$C_{\text{b}}(0)$ [μM]	$C_{\text{u}}(0)$ [μM]	Abbildung	Kapitel
0.001	0.0001	1	0	0	4.2a,b	4.1
0.001	0.001	1	0	0	4.2a,b	4.1
0.001	0.1	1	0	0	4.2a,b	4.1
0.01	0.001	1	0	0	4.2a,b	4.1
0.1	0.01	1	0	0	4.2a,b	4.1
0.1	0.1	1	0	0	4.2a,b	4.1
1	0.1	1	0	0	4.2a,b	4.1
0.0001	0.001	1	0	0	4.2c	4.1
0.001	0.001	1	0	0	4.2c	4.1
0.01	0.001	1	0	0	4.2c	4.1
0.1	0.001	1	0	0	4.2c	4.1
0.0001	0.1	1	0	0	4.2d	4.1
0.001	0.1	1	0	0	4.2d	4.1
0.01	0.1	1	0	0	4.2d	4.1
0.1	0.1	1	0	0	4.2d	4.1

Tabelle A.2.: Parameter für Abschnitt 4.1 Abbildung 4.3, Abbildung C.1, Abbildung C.2

C_b^{\max} [μM]	$C_b(0)$ [μM]	$C_u(0)$ [μM]	Abbildung	Kapitel
1	0	0	4.3	4.1

Variation von α_{prod} in [$\mu\text{M s}^{-1}$]

Variation von κ_{bin} in [$\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$]

Detaillierte Parameterwahl findet sich in [github](#).

Tabelle A.3.: Parameter für Abschnitt 4.2 Abbildung 4.5

α_{prod} [$\mu\text{M s}^{-1}$]	κ_{bin} [$\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$]	\tilde{D} [s^{-1}]	C_b^{\max} [μM]	$C_b(0)$ [μM]	$C_u(0)$ [μM]	Abbildung	Kapitel
0.001	0.001	0.001	1	0	0	4.5abc	4.2
0.001	0.1	0.001	1	0	0	4.5abc	4.2
0.1	0.1	0.001	1	0	0	4.5abc	4.2
0.01	0.001	0.001	1	0	0	4.5abc	4.2
0.001	0.0001	0.001	1	0	0	4.5abc	4.2
0.001	0.001	0.1	1	0	0	4.5def	4.2
0.001	0.1	0.1	1	0	0	4.5def	4.2
0.1	0.1	0.1	1	0	0	4.5def	4.2
0.01	0.001	0.1	1	0	0	4.5def	4.2
0.001	0.0001	0.1	1	0	0	4.5def	4.2

Tabelle A.4.: Parameter für Abschnitt 4.3 Abbildung 4.6

$\alpha_{\text{prod}}\Delta t$ [μM]	$\kappa_{\text{bin}}\Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D}\Delta t$ []	C_b^{\max} [μM]	$C_b(0)$ [μM]	$C_u(0)$ [μM]	i_{prod}	Abbildung	Kapitel
0.0002	0.0002	0.03125	1	0	0	12-19	4.6	4.3

Tabelle A.5.: Parameter für Abschnitt 1.2.2 Abbildung 1.3

α_A [$\mu\text{M s}^{-1}$]	α_B [$\mu\text{M s}^{-1}$]	κ_{on} [$\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$]	κ_{off} [$\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$]	C_{A_0} [μM]	C_{B_0} [μM]	C_{C_0} [μM]	Abbildung	Kapitel
0.1	0.05	0.001	1e-05	0	0	0	1.3a	1.2.2
0	0	0.001	0	5	2.5	0	1.3b	1.2.2

Tabelle A.6.: Parameter für Abschnitt 2.3 Abbildung 2.4

\dot{J}_{prod_A}	\dot{J}_{prod_B}	α_{prod_A} [$\mu\text{M s}^{-1}$]	α_{prod_A} [$\mu\text{M s}^{-1}$]	κ_{bin} [$\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$]	D_A [$\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]	D_B [$\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]	D_C [$\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]	t [s]	Δx [μm]	Abbildung	Kapitel
3 - 4	5 - 6	10	10	10	5000	5000	0	10	10	2.4	2.3

$$a(t=0) = b(t=0) = c(t=0) = 0 \text{ [}\mu\text{M]}$$

Tabelle A.7.: Parameter für Abschnitt 4.3 Abbildung 4.7

$\alpha_{\text{prod}} \Delta t$ [μM]	$\kappa_{\text{bin}} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D} \Delta t$	C_b^{max} [μM]	Fallenverteilung Abbildung A.1	Abbildung	i_{prod}
0.0002	0.0002, 0.002, 0.02	0.083333	1	1	4.7 a-d	12-19
0.0002	0.02	0.083333, 0.03125, 0.0098039	1	1	4.7 e-h	12-19
0.0001, 0.0002, 0.0003	0.02	0.083333	1	1	4.7 g-1	12-19

$$\text{Startkonzentration } C_u(0) = C_b(0) = 0 \mu\text{M}$$

Tabelle A.8.: Parameter für Abschnitt 4.4 Abbildung 4.8

$\alpha_{\text{prod}} \Delta t$ [μM]	$\kappa_{\text{bin}} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D} \Delta t$	C_b^{max} [μM]	Fallen- verteilung	$C_u(0)$ [μM]	Abbildung	i_{prod}
0.0002	0.0002	0.083333	1	Abbildung 4.8 a	0	4.8 b	12-19
0.0002	0.002	0.0098039	1	Abbildung 4.8 a	0	4.8 c	12-19
0.0002	0.0002	0.083333	1	Abbildung 4.8 d	0	4.8 e	12-19
0.0002	0.002	0.0098039	1	Abbildung 4.8 d	0	4.8 f	12-19

Tabelle A.9.: Parameter für Abschnitt 4.5 Abbildung 4.9

$\alpha_{\text{prod}} \Delta t$ [μM]	$\kappa_{\text{bin}} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D} \Delta t$	C_b^{max} [μM]	Fallenverteilung Abbildung A.1	$C_u(0)$ [μM]	Abbildung	i_{prod}
0.0002	0.002	0.0098039	1	23, 27, 31, 32, 33	0	4.9 a-c	7-14
0.0002	0.002	0.083333	1	23, 27, 31, 32, 33	0	4.9 d-f	7-14
0.0002	0.0002	0.083333	1	23, 27, 31, 32, 33	0	4.9 g-i	7-14

Tabelle A.10.: Parameter für Abschnitt 4.6 Abbildung 4.10

$\alpha_{\text{prod}} \Delta t$ [μM]	$\kappa_{\text{bin}} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D} \Delta t$	C_b^{max} [μM]	Fallenverteilung Abbildung A.1	$C_u(0)$ [μM]	Abbildung	i_{prod}
0.0002	0.02, 0.002, 0.0002	0.03125	1	1	0	4.10 a, b, c	12-19
0.0002	0.02, 0.002, 0.0002	0.03125	2	1	0	4.10 d, e, f	12-19

Tabelle A.11.: Parameter für Abschnitt 4.7 Abbildung 4.12

i_{prod}	$\alpha_{\text{prod}}\Delta t$ [μM]	$\kappa_{\text{bin}}\Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D}\Delta t$	C_b^{max} [μM]	Fallenverteilung Abbildung A.1	$C_u(0)$ [μM]	Abbildung
12-19	0.0002	0.002	0.03125	1	39	0	4.12 a, b
12-19	0.0002	0.002	0.03125	1	10	0	4.12 c, d
12-19	0.0002	0.002	0.03125	2	11	0	4.12 e, f

Tabelle A.12.: Parameter für Abschnitt 4.7 Abbildung 4.11

i_{prod}	$\alpha_{\text{prod}}\Delta t$ [μM]	$\kappa_{\text{bin}}\Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D}\Delta t$	C_b^{max} [μM]	Fallenverteilung Abbildung A.1	$C_u(0)$ [μM]	Abbildung
7-14	0.0002, 0.00075	0.002	0.045455	1	1	0	4.11

Der Bereich der Quellen i_{prod} ist fest vorgegeben durch den experimentellen Aufbau.

Tabelle A.13.: Parameter für Kapitel 5 Abbildung 5.2

$\alpha_A\Delta t$ [μM]	$\alpha_B\Delta t$ [μM]	$\kappa_1\Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_{\mathcal{F},A}\Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_0\Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_{\mathcal{F},AB}\Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D}_A\Delta t$	$\tilde{D}_B\Delta t$	$\tilde{D}_{AB}\Delta t$	$i_{\text{prod},A}$	$i_{\text{prod},B}$	t_{sim}^a
0.0002	0.0002	2e-10	0.002	0.004	0.002	0.0098039	0.083333	0.0098039	7-14	57-64	$1 \cdot 10^4$
0.0002	0.0001	0.02	2e-100	0.02	0.02	0.083333	0.0098039	0.0098039	7-14	87-94	$2 \cdot 10^4$
0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.045455	0.045455	0.045455	7-14	57-64	$2 \cdot 10^4$

^a Simulationszeit $t_{\text{sim}} = t/\Delta t$

Startkonzentration $C_A(0) = C_B(0) = C_{AB}(0) = 0 \mu\text{M}$

Tabelle A.13.: Fortsetzung Parameter für Kapitel 5 Abbildung 5.2

$\alpha_A \Delta t$ [μM]	$\alpha_B \Delta t$ [μM]	$\kappa_1 \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_{\mathcal{F},A} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_0 \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_{\mathcal{F},AB} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D}_A \Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D}_B \Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D}_{AB} \Delta t$ [μM^{-1}]	$i_{\text{prod}A}$	$i_{\text{prod}B}$	t_{sim}^a
------------------------------------------	------------------------------------------	-----------------------------------------------	-------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------	--------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------	--------------------------------------------------	-----------------------------------------------------	--------------------	--------------------	--------------------

Fallenverteilung Abbildung A.1 (1)

$$C_b^{\text{max}} = 1 \mu\text{M}$$

Tabelle A.14.: Parameter für Abschnitt 5.2 Abbildung 5.3

$i_{\text{prod}A}$	$\alpha_A \Delta t$ [μM]	$\alpha_B \Delta t$ [μM]	$\kappa_{\mathcal{F},A} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_0 \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_{\mathcal{F},AB} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_1 \Delta t$ [μM^{-1}]	Fallenverteilung Abbildung A.1
7-14	57-64	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	1

$$\text{Startkonzentration } C_A(0) = C_B(0) = C_{AB}(0) = 0 \mu\text{M}$$

$$\text{Maximalkonzentration an Fallen } C_b^{\text{max}} = 1 \mu\text{M}$$

$$\text{Diffusion } \tilde{D}_A \Delta t = \tilde{D}_B \Delta t = \tilde{D}_{AB} \Delta t = 0.045455$$

Tabelle A.15.: Parameter für Abschnitt 5.2 Abbildung 5.4

$i_{\text{prod}A}$	$\alpha_A \Delta t$ [μM]	$\alpha_B \Delta t$ [μM]	$\kappa_{\mathcal{F},A} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_0 \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_{\mathcal{F},AB} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_1 \Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D}_A \Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D}_B \Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D}_{AB} \Delta t$ [μM^{-1}]	Abbildung
7-14	57-64	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.045455	0.142857	0.045455	5.4 a
7-14	57-64	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.045455	0.045455	0.045455	5.4 b

$$\text{Startkonzentration } C_A(0) = C_B(0) = C_{AB}(0) = 0 \mu\text{M}$$

Fallenverteilung Abbildung A.1 (1)

Tabelle A.15.: Fortsetzung Parameter für Abschnitt 5.2 Abbildung 5.4

$i_{\text{prod}A}$	$i_{\text{prod}B}$	$\alpha_A \Delta t$ [μM]	$\alpha_B \Delta t$ [μM]	$\kappa_{\mathcal{F},A} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_0 \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_{\mathcal{F},AB} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_I \Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D}_A \Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D}_B \Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D}_{AB} \Delta t$ [μM^{-1}]	Abbildung

Maximalkonzentration an Fallen $C_b^{\text{max}} = 1 \mu\text{M}$

Tabelle A.16.: Parameter für Abschnitt 5.4 Abbildung 5.6

$i_{\text{prod}A}$	$i_{\text{prod}B}$	$\alpha_A \Delta t$ [μM]	$\alpha_B \Delta t$ [μM]	$\kappa_{\mathcal{F},A} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_0 \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_{\mathcal{F},AB} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_I \Delta t$ [μM^{-1}]	t_{sim}^a	Fallenverteilung	Abbildung
7-14	7-14	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	5.6 a
7-14	17-24	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	5.6 b
7-14	27-34	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	5.6 c
7-14	37-44	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	5.6 d
7-14	47-54	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	5.6 e
7-14	57-64	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	5.6 f

^a Simulationszeit $t_{\text{sim}} = t/\Delta t$

Startkonzentration $C_A(0) = C_B(0) = C_{AB}(0) = 0 \mu\text{M}$

Maximalkonzentration an Fallen $C_b^{\text{max}} = 1 \mu\text{M}$

Diffusion $\tilde{D}_A \Delta t = \tilde{D}_B \Delta t = \tilde{D}_{AB} \Delta t = 0.045455$

Tabelle A.17.: Parameter für Abschnitt 5.4 Abbildung 5.7

$i_{\text{prod}A}$	$i_{\text{prod}B}$	$\alpha_A \Delta t$ [μM]	$\alpha_B \Delta t$ [μM]	$\kappa_{\mathcal{F},A} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_o \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_{\mathcal{F},AB} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_i \Delta t$ [μM^{-1}]	t_{sim}^a	Fallenverteilung Abbildung A.1	Abbildung
7-14	7-14	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	5.7 a
7-14	17-24	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	5.7 b
7-14	27-34	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	5.7 c
7-14	37-44	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	5.7 d
7-14	47-54	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	5.7 e
7-14	57-64	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	5.7 f

^a Simulationszeit $t_{\text{sim}} = t/\Delta t$

Startkonzentration $C_A(0) = C_B(0) = C_{AB}(0) = 0 \mu\text{M}$

Maximalkonzentration an Fallen $C_b^{\text{max}} = 1 \mu\text{M}$

Diffusion $\tilde{D}_A \Delta t = \tilde{D}_B \Delta t = \tilde{D}_{AB} \Delta t = 0.045455$

Tabelle A.18.: Parameter für Abschnitt 5.4 Abbildung 5.8

$i_{\text{prod}A}$	$i_{\text{prod}B}$	$\alpha_A \Delta t$ [μM]	$\alpha_B \Delta t$ [μM]	$\kappa_{\mathcal{F},A} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_o \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_{\mathcal{F},AB} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_i \Delta t$ [μM^{-1}]	Fallenverteilung Abbildung A.1	Abbildung
7-14	7-14	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	1	5.8 a-d
7-14	17-24	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	1	5.8 a-d
7-14	57-64	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	1	5.8 a-d

Startkonzentration $C_A(0) = C_B(0) = C_{AB}(0) = 0 \mu\text{M}$

Tabelle A.18.: Fortsetzung Parameter für Abschnitt 5.4 Abbildung 5.8

$\dot{i}_{\text{prod},A}$	$\dot{i}_{\text{prod},B}$	$\alpha_A \Delta t$	$\alpha_B \Delta t$	$\kappa_{F,A} \Delta t$	$\kappa_o \Delta t$	$\kappa_{F,AB} \Delta t$	$\kappa_1 \Delta t$	Fallenverteilung	Abbildung
		[μM]	[μM]	[μM^{-1}]	[μM^{-1}]	[μM^{-1}]	[μM^{-1}]	Abbildung A.1	

Maximalkonzentration an Fallen $C_b^{\text{max}} = 1 \mu\text{M}$

Diffusion $\tilde{D}_A \Delta t = \tilde{D}_B \Delta t = \tilde{D}_{AB} \Delta t = 0.045455$

Tabelle A.19.: Parameter für Abschnitt 6.2 Abbildung 6.7

$\tilde{D}_A \Delta t$	$\tilde{D}_B \Delta t$	$\tilde{D}_{AB} \Delta t$	$\kappa_{\text{co}} \Delta t$	$\kappa_{\text{post}} \Delta t$	$\gamma_{\text{deg}}^A \Delta t$	$\gamma_{\text{deg}}^B \Delta t$	$i_{\text{ini}}^{\text{asc},A}$	$i_{\text{ini}}^{\text{asc},B}$	$\alpha_{\text{ini}}^{\text{asc},A} \Delta t$	$\alpha_{\text{ini}}^{\text{asc},B} \Delta t$	$\omega_{\text{term}}^{\text{asc},A} \Delta t$	$\omega_{\text{term}}^{\text{asc},B} \Delta t$
			[μM^{-1}]	[μM^{-1}]			[μM]	[μM]	[μM]	[μM]		
0.5	0.25	0.125	3.6133e-04	3.6133e-04	0	0	41-50	51-60	4.4281e-06	4.4281e-06	3.8611e-06	1.9306e-06
0.5	0.25	0.125	3.6133e-04	3.6133e-04	45e-05	45e-05	41-50	51-60	4.4281e-06	4.4281e-06	3.8611e-06	1.9306e-06

Startkonzentration $C_A(0) = C_B(0) = C_{AB}(0) = 0$

Tabelle A.20.: Parameter für Abschnitt 6.2 Abbildung 6.8

$\tilde{D}_A \Delta t$	$\tilde{D}_B \Delta t$	$\tilde{D}_{AB} \Delta t$	$\kappa_{\text{co}} \Delta t$	$\kappa_{\text{post}} \Delta t$	$\gamma_{\text{deg}}^A \Delta t$	$\gamma_{\text{deg}}^B \Delta t$	$i_{\text{ini}}^{\text{asc},A}$	$i_{\text{ini}}^{\text{asc},B}$	$\alpha_{\text{ini}}^{\text{asc},A} \Delta t$	$\alpha_{\text{ini}}^{\text{asc},B} \Delta t$	$\omega_{\text{term}}^{\text{asc},A} \Delta t$	$\omega_{\text{term}}^{\text{asc},B} \Delta t$
			[μM^{-1}]	[μM^{-1}]			[μM]	[μM]	[μM]	[μM]		
0.5	0.25	0.125	3.6133e-04	3.6133e-04	0	0	1-10	91-100	4.4281e-06	4.4281e-06	3.8611e-06	1.9306e-06
0.5	0.25	0.125	3.6133e-04	3.6133e-04	45e-05	45e-05	1-10	91-100	4.4281e-06	4.4281e-06	3.8611e-06	1.9306e-06
0.5	0.25	0.125	3.6133e-04	3.6133e-04	0	0	46-55	46-55	4.4281e-06	4.4281e-06	3.8611e-06	1.9306e-06
0.5	0.25	0.125	3.6133e-04	3.6133e-04	45e-05	45e-05	46-55	46-55	4.4281e-06	4.4281e-06	3.8611e-06	1.9306e-06

Startkonzentration $C_A(0) = C_B(0) = C_{AB}(0)$

Tabelle A.21.: Parameter für Abschnitt 6.3 Abbildung 6.9

$\tilde{D}_A \Delta t$	$\tilde{D}_B \Delta t$	$\tilde{D}_{AB} \Delta t$	$\kappa_{co} \Delta t$	$\kappa_{post} \Delta t$	$\gamma_{deg}^A \Delta t$	$\gamma_{deg}^B \Delta t$	i_{ini}^{nascA}	i_{ini}^{nascB}	$\alpha_{ini}^{nascA} \Delta t$	$\alpha_{ini}^{nascB} \Delta t$	$\omega_{term}^{nascA} \Delta t$	$\omega_{term}^{nascB} \Delta t$
			$[\mu\text{M}^{-1}]$	$[\mu\text{M}^{-1}]$						$[\mu\text{M}]$	$[\mu\text{M}]$	
0.5	0.25	0.125	0.0036	0.0036	0	0	46-55	46-55	5.5351e-07	2.7676e-06	3.8611e-06	1.9306e-06
0.5	0.25	0.125	0.0036	0.0036	0	0	46-55	46-55	2.7676e-06	5.5351e-07	3.8611e-06	1.9306e-06
0.5	0.25	0.125	0.0036	0.0036	0	0	46-55	46-55	1.1070e-06	1.1070e-06	3.8611e-06	1.9306e-06

$\Delta x = 0.03 \mu\text{m}$

$\Delta t = 2.8958 \cdot 10^{-5} \text{ s}$

Startkonzentration $C_A(0) = C_B(0) = C_{AB}(0) = 0$

Tabelle A.22.: Parameter für Abschnitt 6.4 Abbildung 6.10

$\kappa_{co} \Delta t$	$\kappa_{post} \Delta t$	i_{ini}^{nascA}	i_{ini}^{nascB}	$\alpha_{ini}^{nascA} \Delta t$	$\alpha_{ini}^{nascB} \Delta t$	$C_{i,nascA}(0)$	$C_{i,nascB}(0)$	$C_{i,A}(0)$	$C_{i,B}(0)$	Abbildung
$[\mu\text{M}^{-1}]$	$[\mu\text{M}^{-1}]$			$[\mu\text{M}]$	$[\mu\text{M}]$	$[i = i_{ini}^{nascA}]$	$[i = i_{ini}^{nascB}]$	$[i = i_{ini}^{nascA}]$	$[i = i_{ini}^{nascB}]$	
0.036133	0.036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0	0	6.10 a
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0	0	6.10 a
0.00036133	0.00036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0	0	6.10 a
0.0036133	0.0036133	48-53	48-53	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0	0	6.10 b
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0	0	6.10 b
0.0036133	0.0036133	36-65	36-65	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0	0	6.10 b
0.0036133	0.0036133	1-10	91-100	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0	0	6.10 c
0.0036133	0.0036133	36-45	56-65	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0	0	6.10 c
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0	0	6.10 c

Tabelle A.22.: Fortsetzung Parameter für Abschnitt 6.4 Abbildung 6.10

Tabelle A.22.: Parameter für Abschnitt 6.4 Abbildung 6.10											
$\kappa_{co}\Delta t$	$\kappa_{post}\Delta t$	i_{mi}^{nascA}	i_{mi}^{nascB}	$\alpha_{mi}^{nascA}\Delta t$	$\alpha_{mi}^{nascB}\Delta t$	$C_{i,nascA}(0)$	$C_{i,A}(0)$	$C_{i,nascB}(0)$	$C_{i,B}(0)$	Abbildung	
$[\mu M^{-1}]$	$[\mu M^{-1}]$	$[\mu M]$	$[\mu M]$	$[\mu M]$	$[\mu M]$	$[i = i_{mi}^{nascA}]$	$[i = i_{mi}^{nascA}]$	$[i = i_{mi}^{nascB}]$	$[i = i_{mi}^{nascB}]$		
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	5.5351e-07	2.7676e-06	0	0	0	0	6.10d	
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	2.7676e-06	5.5351e-07	0	0	0	0	6.10d	
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0	0	6.10d	
0.036133	0.036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0.27676	1.107e-06	0	0	6.10e	
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0.27676	1.107e-06	0	0	6.10e	
0.00036133	0.00036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0.27676	1.107e-06	0	0	6.10e	
0.0036133	0.0036133	48-53	48-53	1.107e-06	1.107e-06	0.27676	1.107e-06	0	0	6.10f	
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0.27676	1.107e-06	0	0	6.10f	
0.0036133	0.0036133	36-65	36-65	1.107e-06	1.107e-06	0.27676	1.107e-06	0	0	6.10f	
0.0036133	0.0036133	1-10	91-100	1.107e-06	1.107e-06	0.27676	1.107e-06	0	0	6.10g	
0.0036133	0.0036133	36-45	56-65	1.107e-06	1.107e-06	0.27676	1.107e-06	0	0	6.10g	
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0.27676	1.107e-06	0	0	6.10g	
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	5.5351e-07	2.7676e-06	0.27676	1.107e-06	0	0	6.10h	
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	2.7676e-06	5.5351e-07	0.27676	1.107e-06	0	0	6.10h	
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0.27676	1.107e-06	0	0	6.10h	
0.036133	0.036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0.55351	1.107e-06	6.10i	
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0.55351	1.107e-06	6.10i	
0.00036133	0.00036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0.55351	1.107e-06	6.10i	

Tabelle A.22.: Fortsetzung Parameter für Abschnitt 6.4 Abbildung 6.10

$\kappa_{\text{co}} \Delta t$	$\kappa_{\text{post}} \Delta t$	$i_{\text{mi}}^{\text{ascA}}$	$i_{\text{mi}}^{\text{ascB}}$	$\alpha_{\text{mi}}^{\text{ascA}} \Delta t$	$\alpha_{\text{mi}}^{\text{ascB}} \Delta t$	$C_{i, \text{ascA}}(0)$	$C_{i, \text{ascA}}(0)$	$C_{i, \text{ascB}}(0)$	$C_{i, \text{ascB}}(0)$	Abbildung
$[\mu\text{M}^{-1}]$	$[\mu\text{M}^{-1}]$	$[\mu\text{M}^{-1}]$	$[\mu\text{M}^{-1}]$	$[\mu\text{M}]$	$[\mu\text{M}]$	$[i = i_{\text{mi}}^{\text{ascA}}]$	$[i = i_{\text{mi}}^{\text{ascA}}]$	$[i = i_{\text{mi}}^{\text{ascB}}]$	$[i = i_{\text{mi}}^{\text{ascB}}]$	
0.0036133	0.0036133	48-53	48-53	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0.55351	1.107e-06	6.10j
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0.55351	1.107e-06	6.10j
0.0036133	0.0036133	36-65	36-65	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0.55351	1.107e-06	6.10j
0.0036133	0.0036133	1-10	91-100	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0.55351	1.107e-06	6.10k
0.0036133	0.0036133	36-45	56-65	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0.55351	1.107e-06	6.10k
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0.55351	1.107e-06	6.10k
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	5.5351e-07	2.7676e-06	0	0	0.55351	1.107e-06	6.10l
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	2.7676e-06	5.5351e-07	0	0	0.55351	1.107e-06	6.10l
0.0036133	0.0036133	46-55	46-55	1.107e-06	1.107e-06	0	0	0.55351	1.107e-06	6.10l

Startkonzentration $C_{\text{ABpost}}(0) = C_{\text{ABco}}(0) = C_{\text{AnascB}}(0) = 0$

$\gamma_{\text{deg}}^A \Delta t = \gamma_{\text{deg}}^B \Delta t = 0$

$\tilde{D}_A \Delta t = 0.5, \tilde{D}_B \Delta t = 0.25, \tilde{D}_{\text{AB}} \Delta t = 0.125$

$\omega_{\text{term}}^{\text{ascA}} \Delta t = 3.8611 \cdot 10^{-6}, \omega_{\text{term}}^{\text{ascB}} \Delta t = 1.9306 \cdot 10^{-6}$

$\Delta t = 2.8958 \cdot 10^{-5} \text{ s}$

Tabelle A.23.: Parameter für Anhang Abbildung D.4

$i_{\text{prod}A}$	$i_{\text{prod}B}$	$\alpha_A \Delta t$ [μM]	$\alpha_B \Delta t$ [μM]	$\kappa_{\mathcal{F},A} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_{\mathcal{F},AB} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_o \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_i \Delta t$ [μM^{-1}]	$\tilde{D}_A \Delta t$	$\tilde{D}_B \Delta t$	$\tilde{D}_{AB} \Delta t$	Abbildung
7-14	57-64	0.0002	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.045455	0.142857	0.045455	D.4

Startkonzentration $C_A(0) = C_B(0) = C_{AB}(0) = 0 \mu\text{M}$

Fallenverteilung Abbildung A.1 (1)

Maximalkonzentration an Fallen $C_b^{\text{max}} = 1 \mu\text{M}$

Tabelle A.24.: Parameter für Abschnitt 5.4 Abbildung D.2

$i_{\text{prod}A}$	$i_{\text{prod}B}$	$\alpha_A \Delta t$ [μM]	$\alpha_B \Delta t$ [μM]	$\kappa_{\mathcal{F},A} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_o \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_{\mathcal{F},AB} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_i \Delta t$ [μM^{-1}]	t_{sim}^a	Fallenverteilung Abbildung A.1	Abbildung
7-14	7-14	0.0003	0.0003	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	D.2 a
7-14	17-24	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	D.2 b
7-14	27-34	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	D.2 c
7-14	37-44	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	D.2 d
7-14	47-54	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	D.2 e
7-14	57-64	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	D.2 f

^a Simulationszeit $t_{\text{sim}} = t/\Delta t$

Startkonzentration $C_A(0) = C_B(0) = C_{AB}(0) = 0 \mu\text{M}$

Maximalkonzentration an Fallen $C_b^{\text{max}} = 1 \mu\text{M}$

Diffusion $\tilde{D}_A \Delta t = \tilde{D}_B \Delta t = \tilde{D}_{AB} \Delta t = 0.045455$

Tabelle A.25.: Parameter für Abschnitt 5.4 Abbildung D.3

$i_{\text{prod}A}$	$i_{\text{prod}B}$	$\alpha_A \Delta t$ [μM]	$\alpha_B \Delta t$ [μM]	$\kappa_{\mathcal{F},A} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_o \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_{\mathcal{F},AB} \Delta t$ [μM^{-1}]	$\kappa_i \Delta t$ [μM^{-1}]	t_{sim}^a	Fallenverteilung Abbildung A.1	Abbildung
7-14	7-14	0.0002	0.0003	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	D.3 a
7-14	17-24	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	D.3 b
7-14	27-34	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	D.3 c
7-14	37-44	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	D.3 d
7-14	47-54	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	D.3 e
7-14	57-64	0.0002	0.0002	0.002	0.002	0.002	0.02	$34 \cdot 10^3$	1	D.3 f

^a Simulationszeit $t_{\text{sim}} = t/\Delta t$

Startkonzentration $C_A(0) = C_B(0) = C_{AB}(0) = 0 \mu\text{M}$

Maximalkonzentration an Fallen $C_b^{\text{max}} = 1 \mu\text{M}$

Diffusion $\tilde{D}_A \Delta t = \tilde{D}_B \Delta t = \tilde{D}_{AB} \Delta t = 0.045455$

A.1. Fallenverteilung

Die Parameterkombination für die Erzeugung der Fallenverteilung unter der Annahme, dass Streptavidin an die Fallen binden kann. Streptavidin wird benötigt um die DNA-Bürsten an der Oberfläche zu fixieren. Das Anbringen der DNA-Bürsten erfolgt in den Quellbereichen mittels einer Micropipette, was zu einer Konzentration von Streptavidin in den Quellbereichen führt (Abschnitt 3.1). Berechnung der Streptavidinverteilung nach einer Zeit von $t = 2$ h mittels folgender Parameterkombinationen. Die Simulationen ergeben die Konzentration $C_{i,b}$ der gebundenen Streptavidin Moleküle, dessen Inverse entspricht der Konzentration an freien Fallen.

Tabelle A.26.: Parameter für die Erzeugung der Fallenverteilungen auf Grund von Verunreinigungen. Die Verunreinigungen befinden sich zum Zeitpunkt $t = 0$ s frei in Lösung

i_{prod}	$\alpha_{\text{prod}}\Delta t$ [μM]	$\kappa_{\text{bin}}\Delta t$ [μM^{-1}]	$C_{i_{\text{prod}},u}(0)$ [μM]	C_b^{max} [μM]	Fallenverteilung Abb. A.1	Abbildung $C_{i,b}^{-1}$
12-19	0	0.0002	1	1	1	A.1 (7)
12-19	0	0.0002	1	2	1	A.1 (8)
12-19	0	0.0002	1	10	1	A.1 (9)
12-19	0	0.002	1	1	1	A.1 (10)
12-19	0	0.002	1	2	1	A.1 (11)
12-19	0	0.002	1	10	1	A.1 (12)
12-19	0	0.002	1	1	38	A.1 (39)
12-19	0	0.0002	1	1	38	A.1 (40)

$C_{i_{\text{prod}},u}(0)$ beschreibt die Startkonzentration von ungebundenen Molekülen an der Stelle i_{prod} zum Zeitpunkt $t = 0$ s.

$$\tilde{D}\Delta t = 0.03125$$

$$C_b(0) = 0$$

A.2. Startkonzentration

Die Startkonzentrationen liegen je nach Proteintyp \mathcal{A} , \mathcal{B} an unterschiedlichen Orten $i_{\text{prod}\mathcal{A}}$ bzw. $i_{\text{prod}\mathcal{B}}$. Diese werden in allen Simulationen durch Rechteckfunktionen beschrieben.

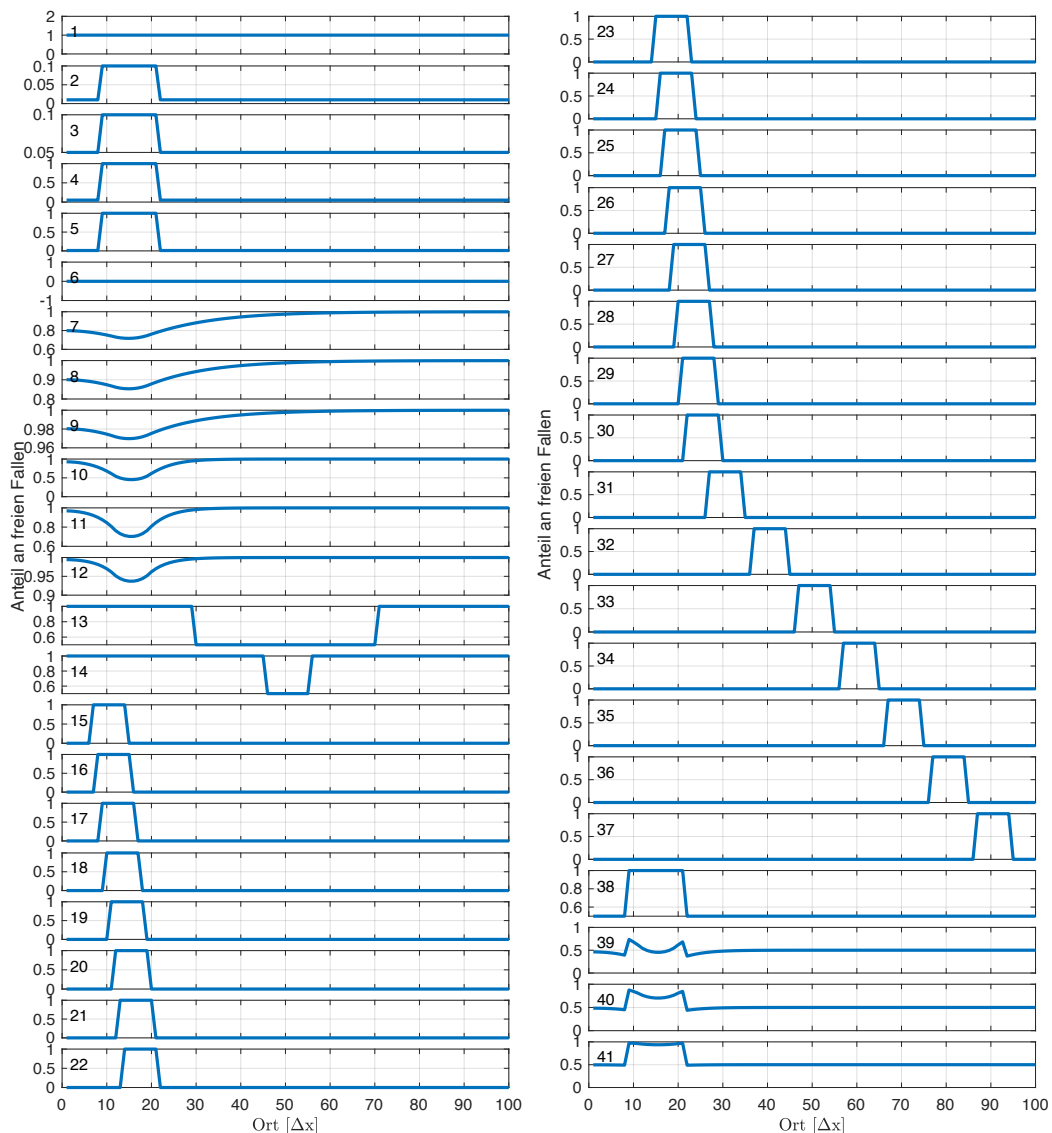


Abbildung A.1.: Angenommene und simulierte Verteilungen an freien Fallen. Zu Beginn der Simulationen wird eine Startkonzentration an freien Fallen angenommen, die homogen (1) oder auch inhomogen verteilt sind. Dargestellt ist hier der angenommene Anteil an freien Fallen. In (7-12) wird der Anteil der freien Fallen simuliert in dem eine Startkonzentration von Schmutzpartikeln (Streptavidin) im Quellbereich existiert, die sich entlang des Biochips verteilen und somit bestimmt Bereiche des Chips belegt, was zu einer Verringerung der freien Fallen führt. Es wird für (7-12) von einer homogenen Verteilung (1) der freien Fallen ausgegangen, die durch die Verteilung der Schmutzpartikel zu einer inhomogenen Verteilung wird. Für (39-41) wird von einer inhomogenen Startkonzentrationsverteilung (38) an Fallen ausgegangen.

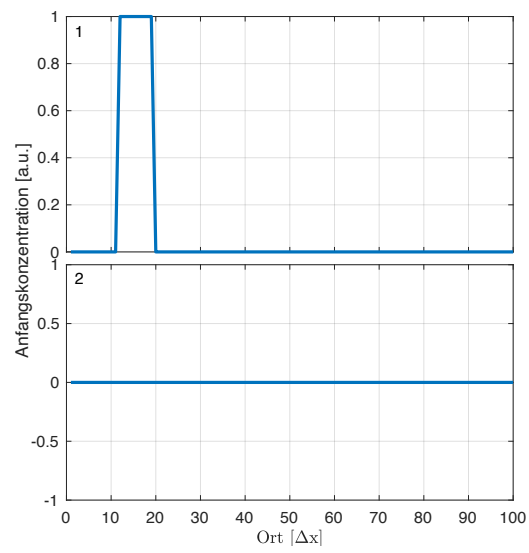


Abbildung A.2.: Anfangskonzentration an ungebundenen Molekülen im System.

Anhang B

Zusatzmaterial numerische Methoden

B.1. Euler-Verfahren Population \mathcal{B} und \mathcal{C}

Das beschriebene Differentialgleichungssystem (2.2) bis (2.4) lässt sich mit dem Euler-Verfahren lösen. Eine detaillierte Beschreibung befindet sich in Abschnitt 2.1 am Beispiel der Population \mathcal{A} . In diesem Abschnitt werden die Lösungen auch für die Populationen \mathcal{B} und \mathcal{C} kurz skizziert. Die konstanten Terme für die Moleküle \mathcal{B} lauten für die Diffusion $s^{\mathcal{B}}$, die Reaktion z und die Produktion $p^{\mathcal{B}}$.

$$\begin{aligned} s^{\mathcal{B}} &= \frac{D_{\mathcal{B}}\Delta t}{(\Delta x)^2} \\ z &= \kappa_{\text{bin}}\Delta t \\ p^{\mathcal{B}} &= \alpha_{\text{prod}_{\mathcal{B}}}\Delta t \end{aligned} \tag{B.1}$$

$$b_j^{k+1} = (1 - 2s^{\mathcal{B}} - za_j^k) b_j^k + s^{\mathcal{B}}b_{j-1}^k + s^{\mathcal{B}}b_{j+1}^k + p_{j=j_{\text{prod}_{\mathcal{B}}}}^{\mathcal{B}} \tag{B.2}$$

Die Konzentration von den Molekülen \mathcal{B} nach $k + 1$ Zeitschritten in jedem Bin kann in seiner Gesamtheit durch eine Matrix ausgedrückt werden:

$$\begin{pmatrix} b_1^{k+1} \\ \vdots \\ b_j^{k+1} \\ \vdots \\ b_N^{k+1} \end{pmatrix} = \Lambda_{\mathcal{B}} \begin{pmatrix} b_1^k \\ \vdots \\ b_j^k \\ \vdots \\ b_N^k \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} p_{1=j_{\text{prod}_{\mathcal{B}}}}^{\mathcal{B}} \\ \vdots \\ p_{j=j_{\text{prod}_{\mathcal{B}}}}^{\mathcal{B}} \\ \vdots \\ p_{N=j_{\text{prod}_{\mathcal{B}}}}^{\mathcal{B}} \end{pmatrix} \tag{B.3}$$

Anhang C

Zusatzmaterial zu Kapitel 4

Hier befinden sich zusätzliche Abbildungen für das Ein-Boxmodell und für die quasi-realistischen Systeme.

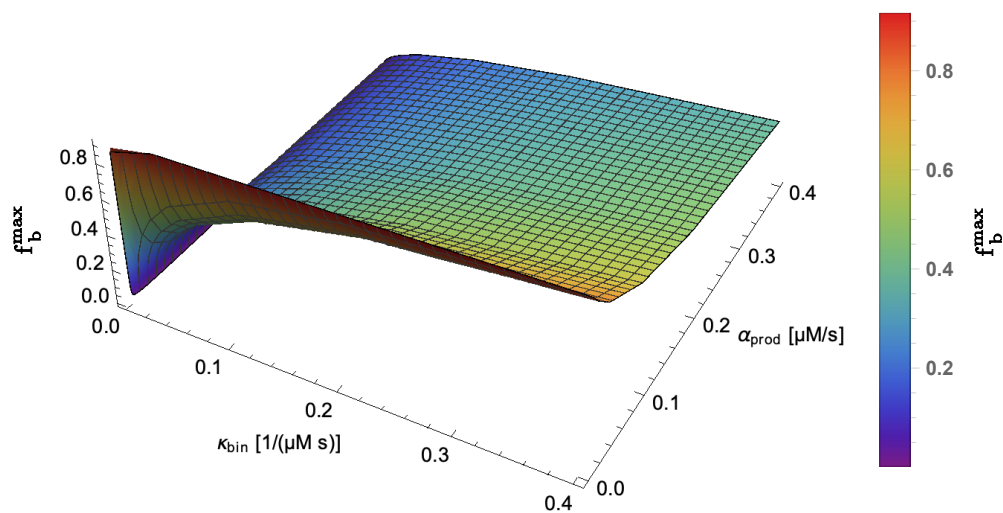


Abbildung C.1.: Maximum der Fallen-Effizienz f_b^{\max} zum Zeitpunkt t^* in Abhängigkeit von der Binderate κ_{bin} und der Produktionsrate α_{prod} ; Der Farbcode sowie die z-Achse geben den Wert der maximalen Fallen-Effizienz an

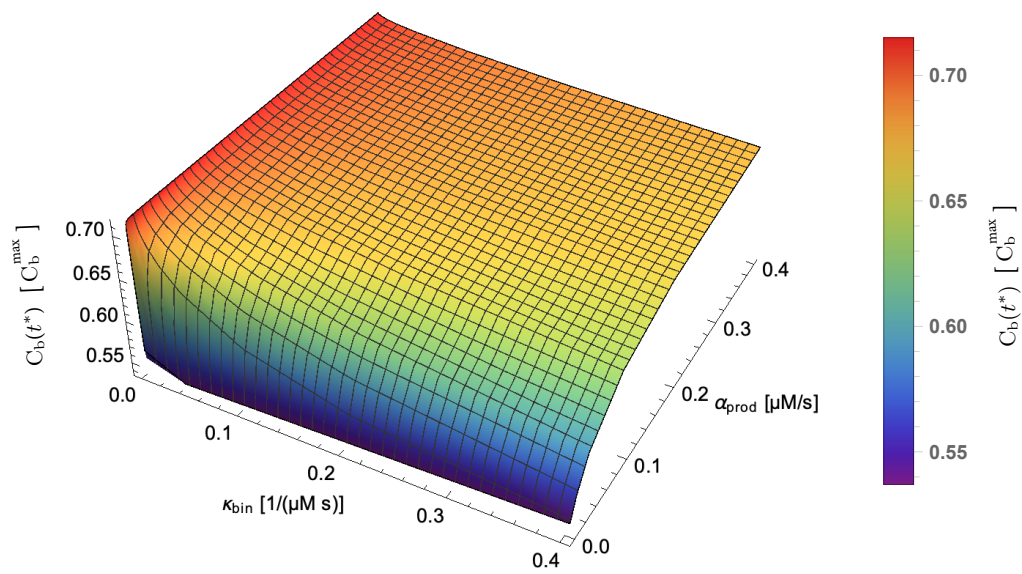


Abbildung C.2.: Konzentration der gebundenen Moleküle $C_b(t^*)$ zum Zeitpunkt t^* , wenn das maximale f_b^{max} erreicht ist in Abhängigkeit von der Binderate κ_{bin} und der Produktionsrate α_{prod}

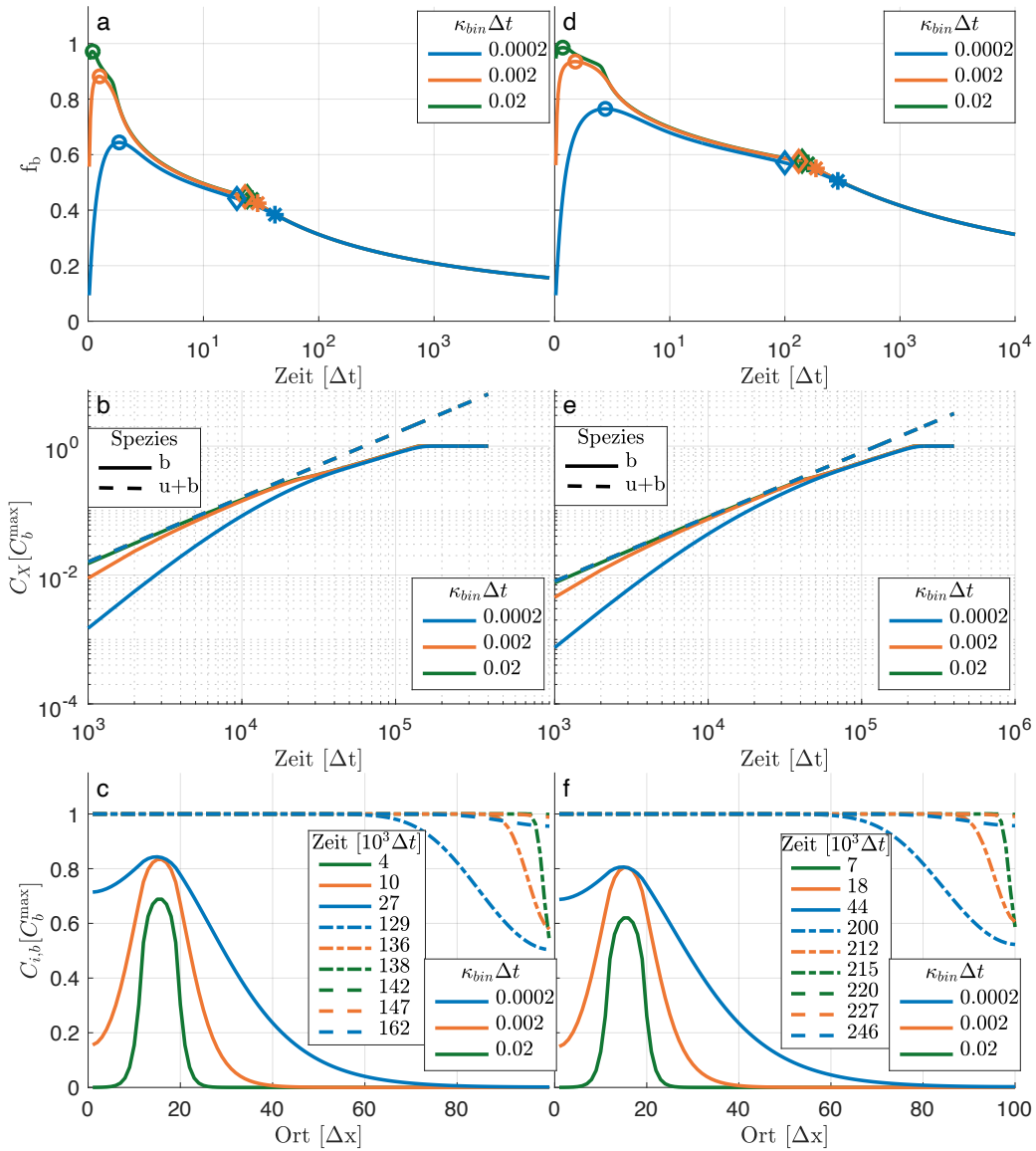


Abbildung C.3.: Eine Erhöhung der Fallen-Kapazität bewirkt eine Verschiebung der Verteilung der gebundenen Moleküle an der Oberfläche zu späteren Zeitskalen. Erste Spalte (a-c): Fallen-Kapazität $C_{i,b}^{max} = 1 \mu M$, zweite Spalte (d-f) Fallen-Kapazität $C_{i,b}^{max} = 1 \mu M$. (a,d) Darstellung der Fallen-Effizienz $f_b(t)$ (b,e) Anzahl an gebundenen und Gesamtanzahl an Molekülen im System (c,f) Darstellung der Verteilung der gebundenen Moleküle zu den für die Fallen-Effizienz charakteristischen Zeitpunkten

- DNA Bereich
- zu aktivierender Bereich

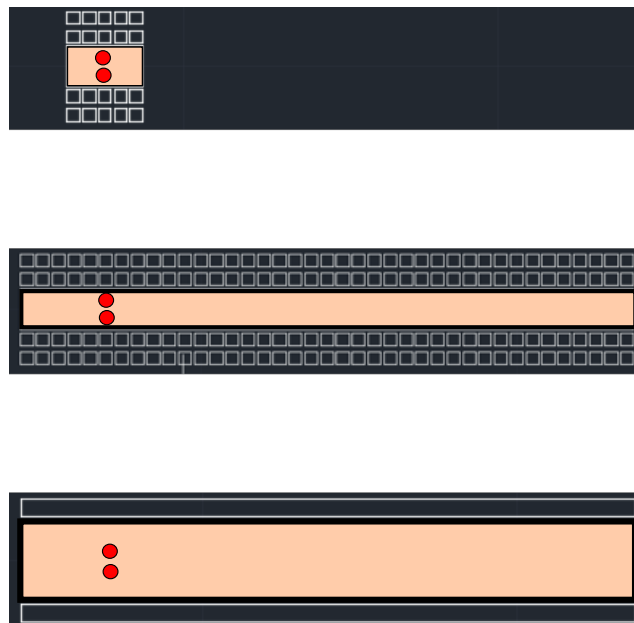


Abbildung C.4.: Bereich der Aktivierung der Oberfläche des Biochips [74] Gezeigt an einer mikroskopischen Aufnahme des experimentellen Biochips von oben. Farblich eingezeichnet sind die Bereiche für die DNA-Bürsten (rot) und die zu aktivierenden Bereiche der Oberfläche mittels lokaler Belichtung mit UV-Licht (hellorange). Die durch UV-Licht aktivierten Bereiche, sind die Bereiche in denen sich die Fallen befinden. Die Versuchsaufbaubeschreibung findet sich in Abschnitt 3.1 [54], [i.V. 74].

Anhang D

Zusatzmaterial zu Kapitel 5

D.1. Abschätzung der Diffusionskonstanten der Proteine

Die Diffusionskonstanten für die jeweiligen Proteine müssen aus der Literatur abgeschätzt werden, da keine Diffusionskonstanten im Experiment bestimmten wurden. Die Abschätzungen erfolgt mittels dessen Sedimentationskoeffizienten in [91, Tabelle 1, 3, 92] unter Verwendung der Gleichung [93, Gleichung (1)] aus dem Paper von Lebowitz u. a. Angenommen wurde ein spezifisches Volumen $\bar{v} = 0.75 \text{ ml g}^{-1}$ und eine drei mal höhere Viskosität als Wasser. Dabei ergeben sich die in Tabelle D.1 dargestellten Diffusionskonstanten. Die in den Experimenten verwendeten Proteine haben die in Tabelle D.2 dargestellten Bezeichnungen in der Simulation.

Tabelle D.1.: Diffusionskonstanten aus der Literatur bestimmt

Proteinbezeichnung	Sedimentationskoeffizient [S]	Diffusionskonstante [$\mu\text{m s}^{-2}$]
gp11	4.2	19
gp10	7.8	13
gp7	5.7	16
gp10-gp7	10.2	11

Tabelle D.2.: Proteinbezeichnungen aus dem Experiment und in der Simulation

Experiment	Simulation
gp11	\mathcal{F}
gp10	\mathcal{A}
gp7	\mathcal{B}
gp10-gp7	\mathcal{AB}
gp11-gp10-gp7	$\mathcal{F}(\mathcal{AB}) + (\mathcal{FA})\mathcal{B}$

D.2.1. Gemischte DNA-Bürsten

Die Anpassung des Fittings mit dem gemischten DNA-Bürsten-Falls erfolgt am Beispiel der Veränderung der Erzeugung der Produktionsrate α_A, α_B der Proteine A und B. Die Variation erfolgt so, dass trotzdem ein Fitting für die anderen Translationsabstände ermöglicht wird.

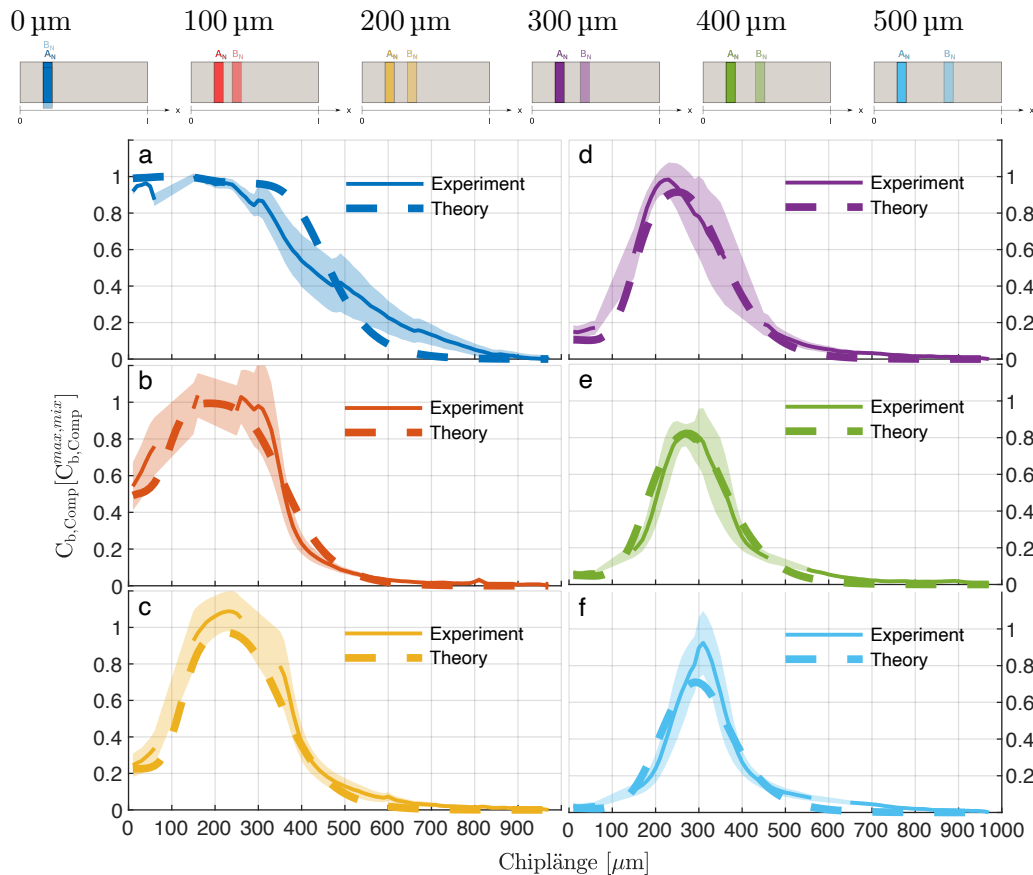


Abbildung D.2.: Theoretische Untersuchung des Einflusses des Abstandes der Translationsorte auf die Verteilung der gebundenen Komplexe (a-f) zeigen die Konzentration der gebundenen Komplexe entlang des Biochips. Dabei werden die experimentellen Daten (durchgezogene Linien) und deren Standardabweichung (Schattierung) bestmöglich durch das in Abschnitt 5.1 beschriebene Modell mit einem Parametersatz für alle Abstände angenähert (gestrichelte Linien). Die Farben in den obigen Schemata entsprechen dem Abstand zwischen den Translationsorten: (a) gemischter Bürstenfall und einen Abstand von (b) 100 µm (c) 200 µm (d) 300 µm (e) 400 µm (f) 500 µm Parameter können nachgelesen werden im Anhang in Tabelle A.24

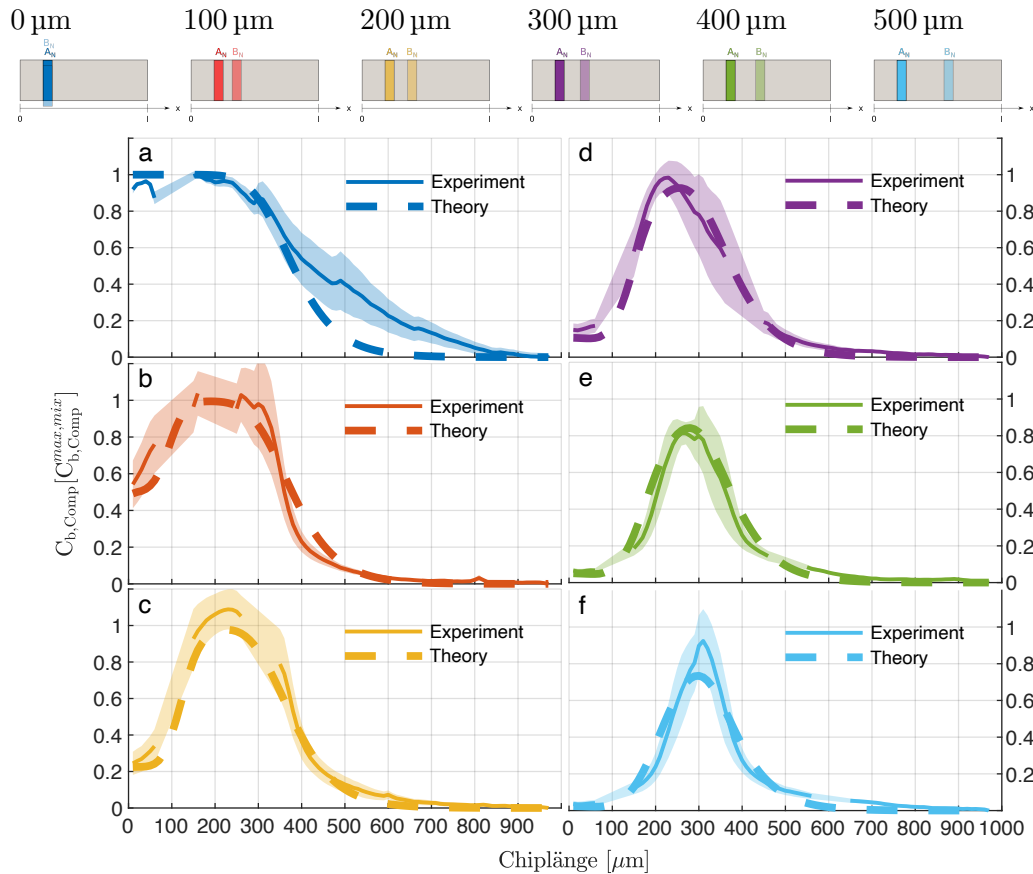


Abbildung D.3.: Theoretische Untersuchung des Einflusses des Abstandes der Translationsorte auf die Verteilung der gebundenen Komplexe (a-f) zeigen die Konzentration der gebundenen Komplexe entlang des Biochips. Dabei werden die experimentellen Daten (durchgezogene Linien) und deren Standardabweichung (Schattierung) bestmöglich durch das in Abschnitt 5.1 beschriebene Modell mit einem Parametersatz für alle Abstände angenähert (gestrichelte Linien). Die Farben in den obigen Schemata entsprechen dem Abstand zwischen den Translationsorten: (a) gemischter Bürstenfall und einen Abstand von (b) 100 μm (c) 200 μm (d) 300 μm (e) 400 μm (f) 500 μm . Parameter können nachgelesen werden im Anhang in Tabelle A.25

D.3. Dominanz der Assemblierungspfade

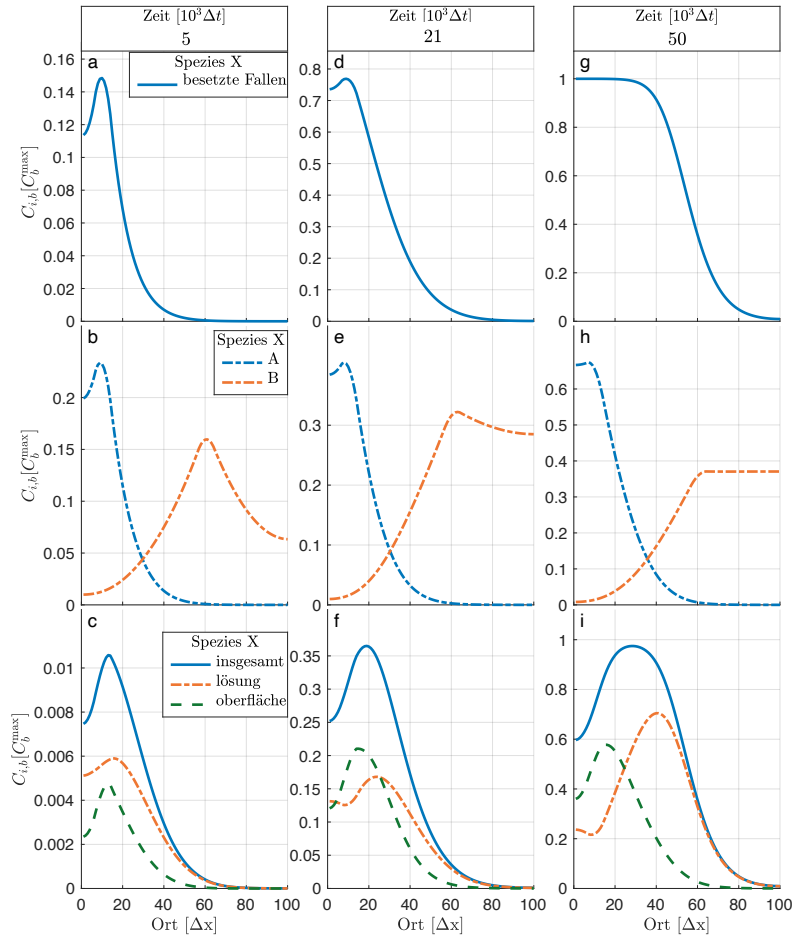


Abbildung D.4.: Die Limitierung der Fallen führt zu einem Wechsel von einem *oberflächenassemblierten* zu einem *lösungsassemblierten* Regime. Dargestellt ist die Konzentrationsverteilung verschiedener Spezies \mathcal{X} zu den Zeitpunkten t : Spalten (a-c) $t = 5 \cdot 10^3 \Delta t$, (d-f) $t = 21 \cdot 10^3 \Delta t$, (g-i) $t = 50 \cdot 10^3 \Delta t$. Unterschieden wird in den Zeilen zwischen den Spezies: (a, d, g) der besetzten Fallen, die der Gesamtheit aller gebundener Proteine im System entspricht, (b, e, h) der freien Proteinuntereinheiten \mathcal{A} (blau, ---) und \mathcal{B} (orange, ---), (c, f, i) der Gesamtkonzentration an gebundenen Komplexen (blau, —) die aus der Summe der *oberflächenassemblierten* Komplexe die an der Oberfläche gebunden (orange, ---) sind und der *lösungsassemblierten* Komplexe (grün, ---) bestehen. Die Quellbereiche der Proteinuntereinheiten \mathcal{A} (blau) und \mathcal{B} (orange) sind als farbige Rechtecke gekennzeichnet. Genaue Parameter siehe Tabelle A.23, Allgemeine Aussage zur Dominanz der Assemblierungspfade auf das Gesamtsystem Abbildung 5.4 a)

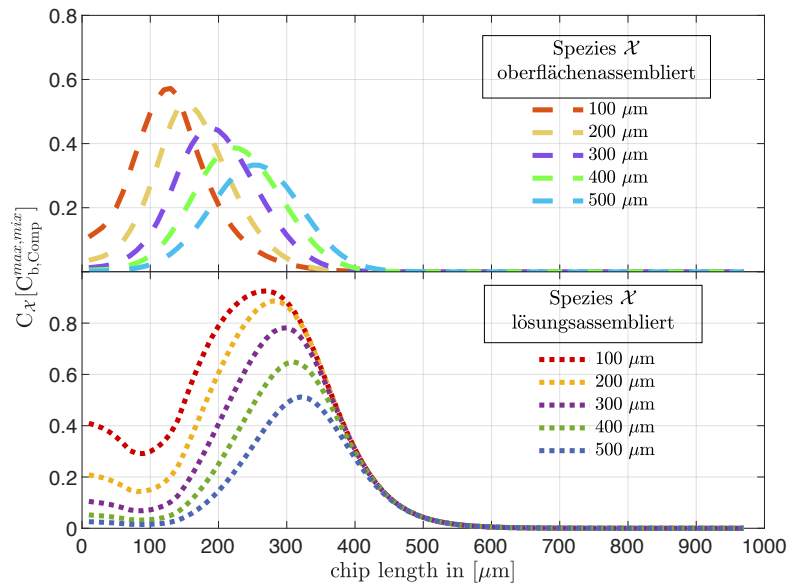


Abbildung D.5.: Unterscheidung der Assemblierungspfade in Abhängigkeit vom Abstand der Translationsorte Dargestellt ist die Verteilung der Konzentration der an der Oberfläche gebundenen *oberflächen-* und *lösungsassemblierten* Komplexe. Der Ort des Maximums und die Breite der Verteilung der *oberflächen-* und *lösungsassemblierten* Komplexe (a und b) richtet sich nach dem Abstand der Translationsorte. Gleicher Parametersatz wie in Abbildung 5.6.

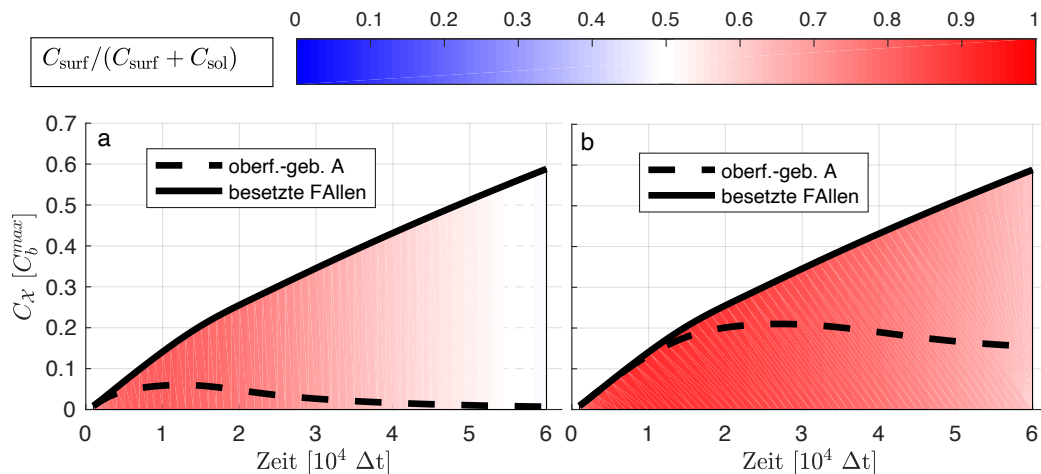


Abbildung D.6.: Die Stärke der Dominanz von Lösungs- und Oberflächenassemblierung richtet sich nach dem Abstand der Translationsorte. Dargestellt ist die zeitliche Entwicklung der Dominanz der *oberflächen-* (rot) und *lösungsassemblierten* (blau) Komplexe. Die Stärke der Dominanz berechnet sich aus dem Verhältnis aus der Konzentration der an der Oberfläche gebundenen Komplexe durch die Gesamtanzahl der gebundenen Komplexe und ist durch den Farbgradienten dargestellt. Je dunkler die Farbe desto dominanter ist der jeweilige Assemblierungspfad, wobei weiß bedeutet, dass *Lösungs-* und *Oberflächenassemblierung* gleich stark sind. Die Translationsorte der \mathcal{A} und \mathcal{B} haben einen Abstand von: (a) 100 μm (b) 500 μm

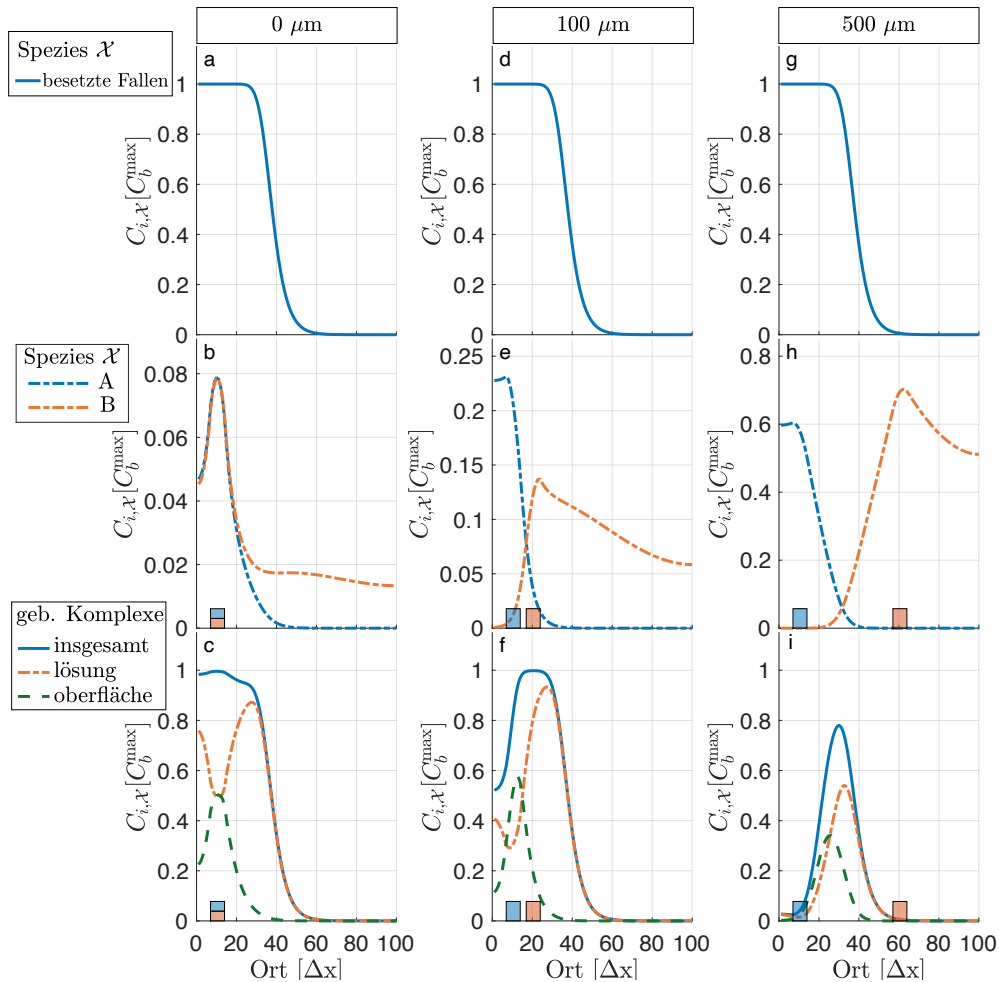


Abbildung D.7.: Einfluss des Abstand der Translationsorte auf die Komplexbildung. Dargestellt sind die Verteilungen von Proteinen zum Zeitpunkt $t = 34 \cdot 10^3 \Delta t$ für unterschiedliche Abstände zwischen den Translationsorten: (a-c) $0 \mu\text{m}$, (d-f) $100 \mu\text{m}$, (g-i) $500 \mu\text{m}$. Unterschieden wird in den Zeilen zwischen den Spezies: (a, d, g) der besetzten Fallen, die der Gesamtheit aller gebundener Proteine im System entspricht, (b, e, h) der freien Proteinuntereinheiten \mathcal{A} (blau) und \mathcal{B} (orange), (c, f, i) der Gesamtkonzentration an gebundenen Komplexen (blau) die aus der Summe der *oberflächenassemblierten* Komplexe die an der Oberfläche gebunden (orange) sind und der *lösungsassemblierten* Komplexe (grün) bestehen. Die Quellbereiche der Proteinuntereinheiten \mathcal{A} (blau) und \mathcal{B} (orange) sind als farbige Rechtecke gekennzeichnet.

Anhang E

Zusatzmaterial zu Kapitel 6

E.1. Abschätzung der Diffusionskonstanten der Proteine

In den Experimenten unserer Kooperationspartner werden u.a. die Proteinkomplexe Luciferase und CarAB betrachtet. Luciferase setzt sich aus den Untereinheiten LuxA, LuxB. Der Proteinkomplex CarAB besteht aus den Untereinheiten CarA und CarB. Für die Simulationen werden fiktive Werte verwendet, die in den Bereichen von LuxA, LuxB und CarA und CarB liegen. Am Beispiel zweier Proteinuntereinheiten \mathcal{A} und \mathcal{B} die zu dem Proteinkomplex \mathcal{AB} werden. Die Proteinuntereinheit \mathcal{A} soll aus einer Kette von 300 Aminosäuren und Proteinuntereinheit \mathcal{B} aus 600 Aminosäuren bestehen. Allein durch die Information der Anzahl an Aminosäuren lassen sich die Translationszeit, Diffusionskonstante des jeweiligen Proteins grob abschätzen.

Mit einer mittleren Translationszeit von 0.05 s pro Aminosäure [94] in *E. coli* lassen sich die Translationszeiten der Proteinuntereinheiten \mathcal{A} und \mathcal{B} bestimmen. Für Protein \mathcal{A} bzw. \mathcal{B} ergibt sich somit einen Translationszeit von 15 s bzw. 30 s.

Die Bestimmung der Diffusionskonstanten erfolgte durch unsere Kooperationspartnern aus der Gruppe von Günter Kramer in der *E. coli*-Zelle. Gemessen wurden in der Zelle die Diffusionskonstanten von verschiedenen Proteinen mittels FRAP (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*) in Abhängigkeit von deren molekularer Masse MM. In Abbildung E.1 sind die experimentell bestimmten Werte für Proteine mit einer molekularen Masse von 27, 64, 68 und 133 kDa dargestellt. Mittels eines Fittings mit dem Modell von Kumar, Mommer und Sourjik [95] konnte ein Zusammenhang zwischen der molekularen Masse im Experiment und der Diffusionskonstanten hergestellt werden. Somit lässt sich unter Verwendung der mo-

lekularen Masse MM des jeweiligen Proteins die Diffusionskonstante abschätzen. Eine Aminosäure besitzt im Mittel eine molekulare Masse von 110 Da [96, S. 78], woraus sich die molekulare Masse der Proteine berechnen lässt (siehe Tabelle E.1).

Tabelle E.1.: Translationszeit und molekulare Masse der Proteine

Proteintyp	Anzahl an Aminosäuren	mittlere Translationszeit		molekulare Masse
			[s]	
\mathcal{A}	300		15	≈ 35
\mathcal{B}	600		30	≈ 70

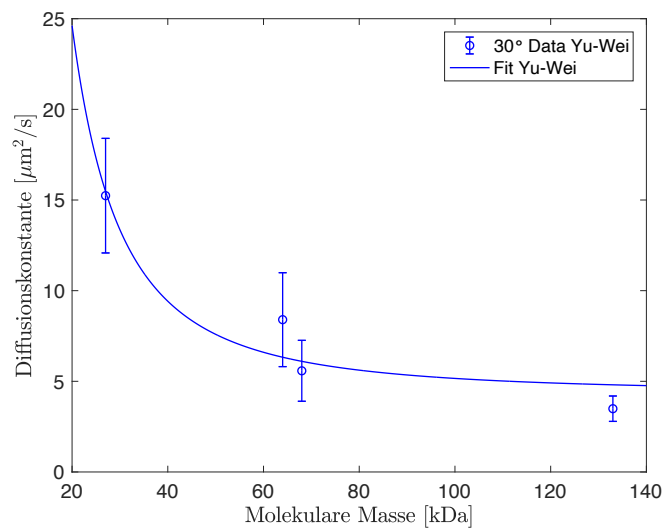


Abbildung E.1.: Diffusionskonstante für Proteine in *E. coli* gemessen von Yu-Wei Shieh (Gruppe Günter Kramer) bei 30° Fitting der experimentell bestimmten Diffusionskoeffizienten mittels des Modells in [95, Abbildung 4, S. 556]

Die Summe aus der molekularen Masse der zwei Proteinuntereinheiten \mathcal{A} und \mathcal{B} bestimmt die molekulare Masse des Proteinkomplexes \mathcal{AB} mit ≈ 105 kDa. Mittels der empirischen Funktion

$$D = \alpha(MM)^{-2} + D_0$$

in [95, Abbildung 4, S. 556] ergeben sich folgende Diffusionskonstanten: Die in der

E.2. Initiationsrate beeinflusst den Assemblierungsprozess

Tabelle E.2.: Aus dem Experiment abgeschätzte sowie in der Simulation verwendete Diffusionskonstanten der Proteine.

Proteintyp	molekulare Masse [kDa]	Diffusionskonstante aus Experiment [$\mu\text{m s}^{-2}$]	Diffusionskonstante in Simulation [$\mu\text{m s}^{-2}$]
<i>A</i>	≈ 35	11	16
<i>B</i>	≈ 70	6	8
<i>AB</i>	≈ 105	5	4

Simulation verwendeten Diffusionskonstanten liegen ungefähr in dem Bereich der experimentellen Diffusionskonstanten.

E.2. Initiationsrate beeinflusst den Assemblierungsprozess

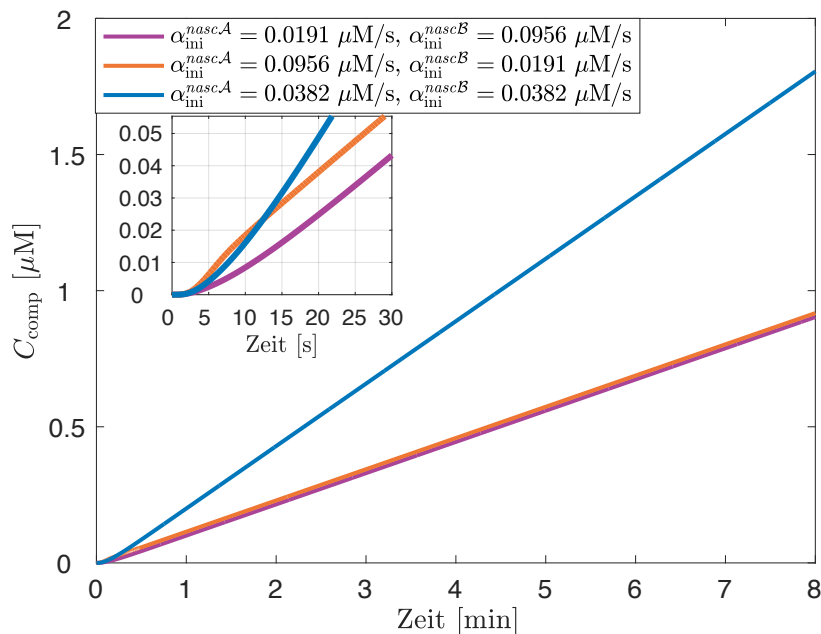


Abbildung E.2.: Initiationsraten haben einen geringen Einfluss auf die Gesamtkonzentration der Komplexe. Gesamtkonzentration an Komplexen beinhaltet sowohl die freien Proteinkomplexe ($C_{ABco}(t) + C_{ABpost}(t)$) als auch die noch gebundenen ($C_{AnascB}(t)$). Initiationsraten α_{ini}^{nascA} und α_{ini}^{nascB} für *nascA* und *nascB*: $\alpha_{ini}^{nascA} < \alpha_{ini}^{nascB}$ (orange), $\alpha_{ini}^{nascA} = \alpha_{ini}^{nascB}$ (blau), $\alpha_{ini}^{nascA} > \alpha_{ini}^{nascB}$ (magenta). Nur im ersten Fall dominiert die post-translationale Assemblierung für hinreichend große Zeiten.

Anhang F

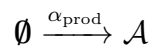
Betrachtung der im Modell verwendeten Proteinexpression *in vivo* und *in vitro*

Eine kurze Zusammenfassung der für die Proteinexpression verwendeten Modelle in Kapitel 5 und Kapitel 6 und des Vergleiches zwischen *in vitro* und *in vivo*.

F.1. Theoretische Betrachtung der Proteinexpression *in vitro*

Die Erzeugung von \mathcal{A} -Proteine im *in vitro* Modell in Kapitel 4 wird durch die Differentialgleichung F.1 beschrieben. Analog gilt der gleiche Zusammenhang für \mathcal{B} -Proteine.

- Erzeugung von \mathcal{A}



$$\frac{dC_{i,\mathcal{A}}(t)}{dt} = \alpha_{\text{prod}} [i = i_{\text{prod},\mathcal{A}}] \quad (\text{F.1})$$

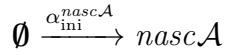
Mit der Lösung der Differentialgleichung ergibt sich für die Gesamtkonzentration der erzeugten Proteine \mathcal{A} im System

$$C_{\mathcal{A}}(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \alpha_{\text{prod}} [i = i_{\text{prod},\mathcal{A}}] t. \quad (\text{F.2})$$

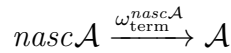
F.2. Theoretische Betrachtung der Proteinexpression *in vivo*

Die Erzeugung von \mathcal{A} -Proteine im *in vivo* Modell in Kapitel 6 wird durch das Differentialgleichungssystem F.3, F.4 beschrieben. Analog gilt der gleiche Zusammenhang für \mathcal{B} -Proteine.

- Initiation der Proteine



- Termination der Proteine nach Translationszeit $t_{\text{term}}^{\text{nasc}\mathcal{A}}$



$$\frac{dC_{i,\mathcal{A}}(t)}{dt} = \omega_{\text{term}}^{\text{nasc}\mathcal{A}} C_{i,\text{nasc}\mathcal{A}}(t) \quad (\text{F.3})$$

$$\frac{dC_{i,\text{nasc}\mathcal{A}}(t)}{dt} = \alpha_{\text{ini}}^{\text{nasc}\mathcal{A}} [i = i_{\text{ini}}^{\text{nasc}\mathcal{A}}] - \omega_{\text{term}}^{\text{nasc}\mathcal{A}} C_{i,\text{nasc}\mathcal{A}}(t) \quad (\text{F.4})$$

Gesamtkonzentration der Proteine \mathcal{A} im System

$$C_{\mathcal{A}}(t) = \left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \alpha_{\text{ini}}^{\text{nasc}\mathcal{A}} [i = i_{\text{ini}}^{\text{nasc}\mathcal{A}}] \right) \left(t + \frac{1}{\omega_{\text{term}}^{\text{nasc}\mathcal{A}}} \left(e^{-\omega_{\text{term}}^{\text{nasc}\mathcal{A}} t} - 1 \right) \right) \quad (\text{F.5})$$

F.3. Vergleich Proteinexpression *in vitro* und *in vivo* Modell

Die Proteinexpression wird betrachtet am Beispiel von fiktiv gewählten Initiations- und Terminationsraten für ein Protein.

Experimentelle Ergebnisse (Diskussion bereits in Abschnitt 4.7)

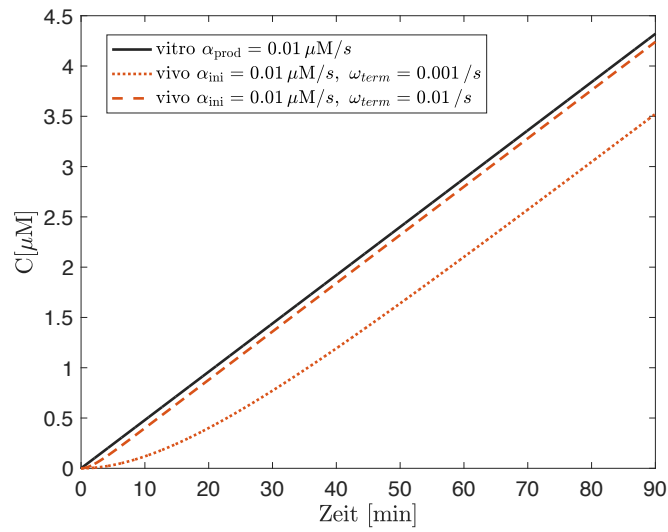


Abbildung F.1.: Proteinexpression im *in vitro* und *in vivo*. Konzentration der im Gesamtsystem befindlichen Proteine \mathcal{A} in Abhängigkeit von der Zeit. Unterschieden wird zwischen einem *in vivo* Modell mit Initiationsrate und Terminationsrate der Proteine \mathcal{A} und einem *in vitro* Modell mit einer Produktionsrate der Proteine \mathcal{A}

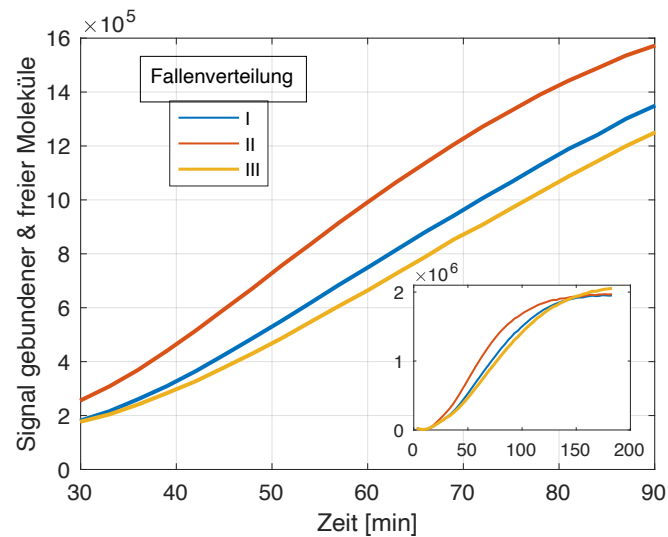


Abbildung F.2.: Summe aus gebundenen und freien *grün fluoreszierenden Proteinen* (GFP) im *in vitro* System. Experimentell von der Gruppe Roy Bar-Ziv ermittelte zeitliche Entwicklung der Erzeugung eines Proteintyps (GFP). Die Erzeugung der Protein wird in Systemen mit drei unterschiedlichen Fallenverteilungen betrachtet. Die zeitliche Entwicklung verläuft zwischen (30 bis 90) min annähernd linear, wohingegen für lange Zeitskalen eine leichte Sättigung eintritt.

Abkürzungsverzeichnis

DNA Desoxyribonukleinsäure

E. coli *Escherichia coli*

FDM Finite-Differenzen-Methode

FRET Förster-Resonanzenergietransfer

gp Genprodukt

GFP *grün fluoreszierende Protein*

HA-Tag Hämagglutinin Tag

IP Immunopurifikation

mRNA messenger RNA

RvD Reaktion-verlangsamt-Diffusion

PEG Polyethylenglycol

RNA Ribonukleinsäure

rRNA ribosomale RNA

RNAP RNA-Polymerase

tRNA transfer-RNA

Si-Wafer Siliziumwafer

SeRP *Selective Ribosome Profiling*

SSE Summe der Residuenquadrate

Tabellenverzeichnis

A.1. Parameter für Abschnitt 4.1 Abbildung 4.2	103
A.2. Parameter für Abschnitt 4.1 Abbildung 4.3, Abbildung C.1, Abbildung C.2	104
A.3. Parameter für Abschnitt 4.2 Abbildung 4.5	104
A.4. Parameter für Abschnitt 4.3 Abbildung 4.6	104
A.5. Parameter für Abschnitt 1.2.2 Abbildung 1.3	105
A.6. Parameter für Abschnitt 2.3 Abbildung 2.4	105
A.7. Parameter für Abschnitt 4.3 Abbildung 4.7	105
A.8. Parameter für Abschnitt 4.4 Abbildung 4.8	106
A.9. Parameter für Abschnitt 4.5 Abbildung 4.9	106
A.10. Parameter für Abschnitt 4.6 Abbildung 4.10	106
A.11. Parameter für Abschnitt 4.7 Abbildung 4.12	107
A.12. Parameter für Abschnitt 4.7 Abbildung 4.11	107
A.13. Parameter für Kapitel 5 Abbildung 5.2	107
A.13. Fortsetzung Parameter für Kapitel 5 Abbildung 5.2	108
A.14. Parameter für Abschnitt 5.2 Abbildung 5.3	108
A.15. Parameter für Abschnitt 5.2 Abbildung 5.4	108
A.15. Fortsetzung Parameter für Abschnitt 5.2 Abbildung 5.4	109
A.16. Parameter für Abschnitt 5.4 Abbildung 5.6	109
A.17. Parameter für Abschnitt 5.4 Abbildung 5.7	110
A.18. Parameter für Abschnitt 5.4 Abbildung 5.8	110
A.18. Fortsetzung Parameter für Abschnitt 5.4 Abbildung 5.8	111
A.19. Parameter für Abschnitt 6.2 Abbildung 6.7	111
A.20. Parameter für Abschnitt 6.2 Abbildung 6.8	111
A.21. Parameter für Abschnitt 6.3 Abbildung 6.9	112
A.22. Parameter für Abschnitt 6.4 Abbildung 6.10	112
A.22. Fortsetzung Parameter für Abschnitt 6.4 Abbildung 6.10	113
A.22. Parameter für Abschnitt 6.4 Abbildung 6.10	113
A.22. Fortsetzung Parameter für Abschnitt 6.4 Abbildung 6.10	114
A.22. Parameter für Abschnitt 6.4 Abbildung 6.10	114
A.23. Parameter für Anhang Abbildung D.4	115
A.24. Parameter für Abschnitt 5.4 Abbildung D.2	115
A.25. Parameter für Abschnitt 5.4 Abbildung D.3	116

A.26. Parameter für die Erzeugung der Fallenverteilungen auf Grund von Verunreinigungen. Die Verunreinigungen befinden sich zum Zeitpunkt $t = 0$ s frei in Lösung	117
D.1. Diffusionskonstanten aus der Literatur bestimmt	129
D.2. Proteinbezeichnungen aus dem Experiment und in der Simulation	130
E.1. Translationszeit und molekulare Masse der Proteine	138
E.2. Aus dem Experiment abgeschätzte sowie in der Simulation verwendete Diffusionskonstanten der Proteine.	139

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Schematische Darstellung des T4-Phagen [39]. Der T4-Phage besteht grob aus einem Kopf (braun) und einem Schwanz. Der Schwanz wird eingeteilt in Schwanzstück (gelb), Grundplatte (keilförmige cyanblaue, orange Bereiche) und Schwanzfasern (grau).	2
1.2.	Translation der mRNA durch ein Ribosom. Das Ribosom bewegt sich Codon für Codon (dreifarbig: rot, blau, gelb) entlang der mRNA (bunte Linie). Mit jedem Schritt wird eine neue Aminosäure (cyanblau) an die naszierende Polypeptidkette (blaue Kugelkette) gebunden. Der Transport der neuen Aminosäuren an das Ribosom geschieht mittels einer tRNA (orange), die ein zum Codon passendes Anticodon besitzt.	5
1.3.	Reaktion der Reaktanten A und B zu Produkt C. (a) Konstante Produktion von Reaktanten A und B, wobei $\alpha_A = 0.1 \mu\text{M s}^{-1}$, $\alpha_B = \frac{1}{2}\alpha_A$ und die Anfangskonzentrationen $C_{A_0} = C_{B_0} = C_{C_0} = 0 \mu\text{M}$, (b) keine Produktion der Reaktanten ($\alpha_B = \alpha_A = 0 \mu\text{M s}^{-1}$) mit Anfangskonzentrationen $C_{A_0} = 5 \mu\text{M}$ und $C_{B_0} = 1/2 \cdot C_{A_0}$. Weitere Parameter siehe Anhang Tabelle A.5.	10
2.1.	Schematische Darstellung der Diskretisierung im Ort und in der Zeit. Änderung der Konzentration einer Population vom Zeitschritt k zum Zeitschritt $k+1$ unter der Annahme einer Ungleichverteilung der Moleküle nach k Zeitschritten. Die Graustufen beschreiben die Konzentration in den entsprechenden Bereichen, je dunkler das Grau desto höher ist die Konzentration der Moleküle. Eine Diffusion ist nur in benachbarte Bins möglich (geschwungene Pfeile). Zwischen den Zeitschritten vergeht eine kleine Zeitdifferenz Δt . Die Berechnung der neuen Konzentrationen zum Zeitpunkt $k+1$ erfolgt durch ein explizites Verfahren und somit über die bekannte Konzentration zum Zeitpunkt k (Richtung des geraden Pfeils). . . .	13
2.2.	Schematische Darstellung der möglichen Änderung der Konzentration der Population A in Bin j. (a) Eine Diffusion ist nur aus Bin j in benachbarte Bins möglich (b) Verweilen in Bin j , ohne dass eine Aktion passiert. (c) Anteiliger Verlust $f_{j,\text{reac},A}^k$ durch Reaktion mit B-Molekülen.	15

2.3.	<p>Schematische Darstellung des Gewinns für die Population \mathcal{A} in Bin j. Diffusion aus den Nachbarbins $j - 1$ und $j + 1$ mit Diffusionsanteilen $f_{j-1,\text{diff},\mathcal{A}}^k$ (Pfeil nach rechts) und $f_{j+1,\text{diff},\mathcal{A}}^k$ (Pfeil nach links).</p>	16
2.4.	<p>Die RvD-Methode liefert für große Zeitschritte Δt eine präzisere Lösung als das explizite Euler-Verfahren. Verteilungen der \mathcal{A}-, \mathcal{B}- und \mathcal{C}-Moleküle nach $t = 10$ s. Anfangskonzentration $a(x, 0) = b(x, 0) = c(x, 0) = 0$, Diffusionskonstanten $D_{\mathcal{A}} = D_{\mathcal{B}} = 5000 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, $D_{\mathcal{C}} = 0 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$; $\Delta x = 10 \mu\text{m}$; Produktion der \mathcal{A}-Moleküle in Bin 3 und 4 mit der Produktionsrate $\alpha_{\mathcal{A}} = 10 \mu\text{M s}^{-1}$ und Produktion der \mathcal{B}-Moleküle in Bin 5 und 6 mit $\alpha_{\mathcal{B}} = 10 \mu\text{M s}^{-1}$. Referenzverteilungen wurden mit dem expliziten Eulerverfahren mit Zeitschritten von $\Delta t = 10^{-6}$ s berechnet und sind als graue Linien dargestellt. Weitere Parameter siehe Anhang Tabelle A.6.</p>	19
3.1.	<p>Schematische Darstellung eines Biochips entnommen aus Heyman u. a. [70]. Lange DNA-Stränge, die das zu untersuchende Protein codieren, werden an der Oberfläche befestigt. Antikörper (blaue Y-Formen), die nur spezielle Proteine binden können, sind neben der DNA immobilisiert. Die DNA wird durch eine RNA-Polymerase (braunes Ellipsoid) in mRNA (rote Spirale) transkribiert und durch ein <i>E. coli</i> Ribosom (doppelte orange Ellipsoide) in naszierende Polypeptide (grüne Kette) übersetzt. Das gefaltete Protein (grüne gefaltete Kette) diffundiert und bindet an die Antikörperfalle. [39]</p>	23
3.2.	<p>Messung der gebundenen Moleküle. Schematische Darstellung des Designs eines Biochips. Die an der Oberfläche befestigten Antikörper (altrosa Trichter) binden freie Moleküle (blaue Kugeln) an die Oberfläche. Die an die Oberfläche gebundenen Partikel (dunkelrote Kugeln mit blauem Rand) erzeugen ein Fluoreszenzsignal. Das mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops und einer Kamera aufgenommene Bild wird mittels Binning (c) des Chips in x-Richtung in eine Verteilung von gebundenen Molekülen (d) entlang der x-Richtung umgewandelt.</p>	24
4.1.	<p>Schema eines Synthesenchips mit Höhe h und einer Länge l [i.V. 74]. Der Chip ist mit einer Lösung gefüllt, die Moleküle (orange Kugeln) enthält. Diese können an molekulare Fallen (gelbe Kegel) binden, um Molekül-Fallen-Komplexe zu bilden. Die Fallen sind der Unterseite des Chips befestigt, der Prozess der Komplexbildung findet daher an der Oberfläche statt.</p>	27

- 4.2. **Zeitabhängigkeit der Konzentration gebundener Moleküle $C_b(t)$ und deren Fallen-Effizienz $f_b(t)$.** Die erste Spalte (a-b) zeigt die Konzentration gebundener Moleküle und die Fallen-Effizienz gebundener Moleküle in Abhängigkeit von der Zeit für gleiche Parametersätze (Legende links). Einteilung der Fallen-Effizienz in Binderregime (I) und Produktionsregime (II). Die zweite Spalte (c-d) vergleicht die Fallen-Effizienz in Abhängigkeit von der Zeit für gleiche Produktionsraten α_{prod} (Legende rechts) und unterschiedliche Bindeaffinitäten: (c) schwache Bindung $\kappa_{\text{bin}} = 0.001 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, (d) starke Bindung $\kappa_{\text{bin}} = 0.1 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ 31
- 4.3. **Maximal erreichbare Fallen-Effizienz** (a) Maximum der Fallen-Effizienz f_b^{max} sowie zeitgleich, d.h. zum Zeitpunkt t^* , auftretende (b) Konzentration der gebundenen Moleküle $C_b(t^*)$ als Funktion des Verhältnisses aus Produktionsrate und Binderate $\frac{\alpha_{\text{prod}}}{\kappa_{\text{bin}}}$ 32
- 4.4. **Schema eines Zwei-Boxensystems mit Boxhöhe h , Boxlänge l [i.V. 74].** Die Moleküle (orange Kugeln) können zwischen beiden Boxen frei diffundieren und an Fallen (gelbe Kegel) binden. Neue Moleküle werden nur in der linken (blauen) Box produziert. 33
- 4.5. **Bindedynamik des Zwei-Boxensystems.** (a, d) Konzentrationen $C_{1,b}(t)$ und $C_{2,b}(t)$ der gebundenen Moleküle in Box 1 (durchgezogene Linie) und Box 2 (gestrichelte Linie). (b, e) Fallen-Effizienz des Gesamtsystems $f_b(t)$. (c, f) Fallen-Effizienz $f_{1,b}(t)$ und $f_{2,b}(t)$ in Box 1 (gestrichelte Linie) und Box 2 (durchgezogene Linie). Der Vergleich unterschiedlicher Diffusionsraten der Moleküle erfolgt mittels der Spalten, wobei die linke Spalte (a-c) eine langsame Diffusionsrate mit $\tilde{D} = 0.001 \text{ s}^{-1}$ und die rechte Spalte (d-f) eine schnell Diffusionsrate mit $\tilde{D} = 0.1 \text{ s}^{-1}$ zeigt. Die mit Doppelpfeilen hervorgehobenen Bereiche in Abbildung (a, b) kennzeichnen die Zeitspanne (t_A bis t_B) vom Zeitpunkt der maximalen Fallen-Effizienz bis zum reinen produktionsdominierten Regime. Die Unterscheidung der Regime erfolgt durch die Betrachtung der Fallen-Effizienzen in den einzelnen Boxen. Die maximale Fallen-Effizienz in Box 1 findet zum Zeitpunkt t_I statt und kennzeichnet das Ende des reinen bindedominierten Regimes. Die maximale Fallen-Effizienz in Box 2 zum Zeitpunkt t_{II} beschreibt den Beginn des reinen produktionsdominierten Regimes. Die entsprechenden Regime sind am Beispiel des Datensatzes $\alpha_{\text{prod}} = 0.001 \mu\text{M} \Delta t^{-1}$, $\kappa_{\text{bin}} = 0.1 \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ (cyan blau) eingezeichnet. Die sich somit ergebenden unterschiedlichen Regime ist durch die unterschiedlichen Schraffuren gekennzeichnet, dessen Schnittmenge das Mischregime kennzeichnet. Die entsprechenden Parameterkombinationen sind farblich codiert und befinden sich in der Legende. 35

- 4.6. **Charakteristika und Regimeaufteilung der Fallen-Effizienz** (a) Gesamt-Fallen-Effizienz in Abhängigkeit von der Zeit. Die charakteristischen Punkte entsprechen folgende Zeitpunkten: (\circ) Zeit der maximalen Gesamt-Fallen-Effizienz, (\diamond) der Wendepunkt Fallen-Effizienz in der N -ten Box und ($*$) dem Maximum der Fallen-Effizienz in der N -ten Box (d). (b) Ortsabhängigkeit der gebundenen Moleküle zu den charakteristischen Zeitpunkten (vgl. (a)). Das graue Rechteck kennzeichnet den Ort der Quelle. (c) Fallen-Effizienz in der jeweiligen Box i als Funktion der Zeit. Unterscheidung der Fallen-Effizienz in den Boxen im Quellbereich (rot), links vom Quellbereich (blau) und rechts vom Quellbereich (grau). Die Einteilung der Summe der Fallen-Effizienz in Box i erfolgt in drei Regime (Schattierung). Regime **I** ist das bindedominierte Regime, das endet, sobald die Fallen-Effizienz der ersten Box maximal ist. In Regime **II** finden sich sowohl steigende als auch sinkende Fallen-Effizienzen. Regime **III** ist der Bereich, in dem alle Boxen ihre maximale Fallen-Effizienz überschritten haben und somit die Produktion dominiert. (d) Dargestellt ist die Fallen-Effizienz in der N -ten Box in Abhängigkeit von der Zeit, wobei Wendepunkt \diamond und Maximum $*$ markiert sind. 41
- 4.7. **Bindedynamik im 100-Boxensystem.** Erste Zeile (a, e, i) zeigt die Fallen-Effizienz unter Variation der Parameter entsprechend der jeweiligen Legende. Sofern nicht explizit in der Legende erwähnt, gelten folgende Parameter: Produktionsrate $\alpha_{\text{prod}} = 2 \cdot 10^{-4} \mu\text{M} \Delta t^{-1}$, Bindeaffinität $\kappa_{\text{bin}} = 2 \cdot 10^{-2} \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ und Diffusionsrate $\tilde{D} = 8.3 \cdot 10^{-2} \Delta t^{-1}$. Zeilen zwei bis vier (b-d, f-h, j-l) zeigen die Ortsabhängigkeit der gebundenen Moleküle zu charakteristischen Zeiten, durch die Symbole \circ , \diamond und $*$ gekennzeichnet. Charakteristische Zeiten werden bestimmt aus dem Maximum der Gesamt-Fallen-Effizienz $f_b(t_\circ)$, dem Wendepunkt der Fallen-Effizienz $f_{N,b}(t_\diamond)$ in Box N und dem Maximum der Fallen-Effizienz $f_{N,b}(t_*)$ in Box N . In Spalte eins (a-d) wird die Bindeaffinität κ_{bin} , in Spalte zwei (e-h) die Diffusionsrate \tilde{D} und in Spalte drei (j-l) die Produktionsrate α_{prod} variiert. Das graue Rechteck kennzeichnet den Ort der Quelle. 44
- 4.8. **100-Boxensystem mit inhomogener Fallenverteilung.** Betrachtung zweier unterschiedlicher Fallenverteilungen (a; d) und deren Einfluss auf die Entwicklung der Anzahl der gebundenen Moleküle (b-c; e-f). Die beiden Spalten (b-c; e-f) zeigen die Entwicklung bei einer bestimmten Fallen-Effizienz (a; d) und verschiedene Bindeaffinitäten κ_{bin} (farbig gekennzeichnet in der Legende). Die zeitliche Entwicklung (siehe Legende der Zeitpunkte in c) wird durch die Linien dargestellt. Der Quellbereich ist grau gekennzeichnet. Weitere Parameter siehe Anhang Tabelle A.8. 46

- 4.9. **Einfluss von Diffusionsrate und Bindeaffinität bei inhomogener Fallenverteilung.** Zeile eins (a, d, g) zeigt die Gesamtkonzentration C_b der gebundenen Moleküle in Abhängigkeit vom Abstand zwischen Fallenbereich und Quelle (graues Rechteck). Die Zeitpunkte sind durch die Schattierung der Marker gekennzeichnet, wobei der Farbwechsel von rot nach blau den Übergang der Kurvenkrümmung von konkav zu konvex kennzeichnet. Zeilen zwei und drei (b, c, e; f, h, i) zeigen die räumliche Verteilung der gebundenen Moleküle $C_{i,b}$ für Zeitpunkte entsprechend der jeweiligen Legende. Dabei werden folgende Fälle unterschieden: langsame Diffusion bei starker Bindung (a-c; $\kappa_{\text{bin}} = 2 \cdot 10^{-3} \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, $\tilde{D} = 9.8 \cdot 10^{-3} \Delta t^{-1}$), schnelle Diffusion bei starker Bindung (d-f; $\kappa_{\text{bin}} = 2 \cdot 10^{-3} \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, $\tilde{D} = 8.3 \cdot 10^{-2} \Delta t^{-1}$), schnelle Diffusion bei geringer Bindung (g-i; $\kappa_{\text{bin}} = 2 \cdot 10^{-4} \Delta t^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, $\tilde{D} = 8.3 \cdot 10^{-2} \Delta t^{-1}$). Für weitere Parameterwerte siehe im Anhang Tabelle A.9. 49
- 4.10. **Eine Erhöhung der Fallen-Kapazität bewirkt eine Erhöhung der Fallen-Effizienz und eine Ausdehnung des bindedominierten Regimes und Mischregime.** Darstellung der Gesamt-Fallen-Effizienz $f_b(t)$ mit einer Fallen-Kapazität von (a) $C_b^{\text{max}} = 1 \mu\text{M}$ und (b) $C_b^{\text{max}} = 2 \mu\text{M}$. Charakteristische Punkte beschreiben den Zeitpunkt: (o) des Maximums der Fallen-Effizienz, (\diamond) Wendepunkt der Fallen-Effizienz in Box N . Die Darstellung der Verteilung der gebundenen Moleküle zu den für die Fallen-Effizienz charakteristischen Zeitpunkt befindet sich im Anhang Abbildung C.3 50
- 4.11. **Verteilung der gebundenen gp10 Proteine.** Fitting der experimentellen Daten mittels Simulationen vom Modell in Abschnitt 4.3; gebundene gp 10 Proteine an der Oberfläche für zwei unterschiedliche Konzentrationen an DNA-Bürsten 25% und 100 %; experimentelle Daten (o und \square). Simulationsdaten Fitting mit einem Datensatz Änderung der Produktionsrate α_{prod} der Moleküle zur Simulation der unterschiedlichen DNA-Bürsten Konzentration. Das graue Rechteck kennzeichnet den Ort der Quelle. Die Parameter sind im Anhang Tabelle A.12 zu finden. 52
- 4.12. **Theoretische Betrachtung des Einflusses der Fallenkapazität auf die Verteilung der freien und der an der Oberfläche gebundenen Proteine in Abhängigkeit vom Ort.** Die Spalten zeigen die unterschiedliche Fallenverteilungen (I): inhomogene Fallenverteilung, (II) mit einer Fallenkapazität von $C_{i,b}^{\text{max}} = 1 \mu\text{M}$. (III) $C_{i,b}^{\text{max}} = 2 \mu\text{M}$. Das graue Rechteck kennzeichnet den Ort der Quelle. Weitere Parameter siehe Anhang Tabelle A.11. 54

<p>4.13. Experimentelle Betrachtung des Einflusses der Fallenkapazität auf die Verteilung der freien und der an der Oberfläche gebundenen Proteine in Abhängigkeit vom Ort. Die Spalten zeigen die unterschiedlichen Fallenkapazitäten $C_{i,b}^{\max}$ (a-b): $C_{i,b}^{\max} \leq 1 \mu\text{M}$, (c-d) $C_{i,b}^{\max} = 1 \mu\text{M}$. (e-f) $C_{i,b}^{\max} = 2 \mu\text{M}$. Unterschiedlichen Zeitpunkte sind in der Legende dargestellt. $C_{b+u}^{\max}, C_{i,b+u}$</p>	<p>55</p>
<p>5.1. Schematische Darstellung der 2D Geometrie (x-y Ebene) des Biochips. Farblich eingezeichnet sind die Quellbereiche der Proteine \mathcal{A} (grün) und des Proteine \mathcal{B} (gelb). Der Chip hat in x-Richtung die Länge L.</p>	<p>59</p>
<p>5.2. Verteilung der an der Oberfläche gebundenen Komplexe (schwarz) und der in Lösung befindlichen freien \mathcal{A}- und \mathcal{B}-Proteine (blau). Die Rechtecke zeigen die Quellbereiche der Proteine \mathcal{A} (grün) und \mathcal{B} (gelb). Betrachtet werden verschiedene Parameterkombinationen: a) Die Diffusion der \mathcal{B}-Moleküle ist schneller als die der \mathcal{A}-Moleküle und die Bindung von \mathcal{A} an die Oberfläche ist im Vergleich zur Komplexbildung in Lösung begünstigt $\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}} \gg \kappa_1$. b) \mathcal{B}-Proteine diffundieren langsamer als \mathcal{A}-Proteine und die Bindeaffinität der Proteinuntereinheiten zu einem Komplex in Lösung ist stärker als die Bindung von \mathcal{A} an die Oberfläche $\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}} \ll \kappa_1$. c) Die Diffusion ist gleich und die Bindeaffinitäten von \mathcal{A} und \mathcal{B} sind gleich $\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}} = \kappa_1$.</p>	<p>62</p>
<p>5.4. Zeitliche Entwicklung der Dominanz der oberflächen- (rot) und lösungsassamblierten (blau) Komplexe. Die Stärke der Dominanz berechnet sich aus dem Verhältnis aus der Konzentration der an der Oberfläche gebundenen Komplexe durch die Gesamtanzahl der gebundenen Komplexe und ist durch den Farbgradienten dargestellt. Je dunkler die Farbe desto dominanter ist der jeweilige Assemblierungspfad, wobei weiß bedeutet, dass <i>Lösungs-</i> und <i>Oberflächenassemblierung</i> gleich stark sind. (a) Eine Reduzierung der Bindeaffinität zwischen \mathcal{A}-Protein und der Oberfläche $\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}}$ ($\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}} = \kappa_o/10 = \kappa_{\mathcal{F},\mathcal{AB}}/10 = \kappa_1/10$) bewirkt eine Verstärkung der in Lösung assemblierten Komplexe (blaue Fläche unter dem Graphen) (b) Gleiche Bindeaffinitäten ($\kappa_{\mathcal{F},\mathcal{A}} = \kappa_o = \kappa_{\mathcal{F},\mathcal{AB}} = \kappa_1$) bewirken eine Dominanz der <i>oberflächenassemblierten</i> Komplexe (rote Fläche unter dem Graphen)</p>	<p>66</p>

- 5.5. **Experimentelle Untersuchung der Komplexbildung durch Variation des Abstandes zwischen den Translationsorten.** Die Daten zeigen die Verteilung der Proteinkomplexe entlang des Biochips für verschiedene Distanzen zwischen den Translationsorten (siehe Legende). Das Fluoreszenzsignal ist normiert auf das Maximum des Signals der gemischten DNA-Bürsten. Die Schattierung zeigt die Standardabweichung. In dem Bereich zwischen 60 und 150 μm sind die Daten beschnitten, da durch das Aufbringen der DNA-Bürsten in dem Bereich in den mikroskopischen Bildaufnahmen Artefakte entstanden („spotting“ sichtbar). 68
- 5.6. **Theoretische Untersuchung des Einflusses des Abstandes der Translationsorte auf die Verteilung der gebundenen Komplexe** (a-f) zeigen die Konzentration $C_{b,Comp}$ der gebundenen Komplexe entlang des Biochips normiert über das Maximum der Konzentration $C_{b,Comp}^{max,mix}$ der gemischten DNA-Bürsten. Dabei werden die experimentellen Daten (durchgezogene Linien) und deren Standardabweichung (Schattierung) bestmöglich durch das in Abschnitt 5.1 beschriebene Modell mit einem Parametersatz für alle Abstände angenähert (gestrichelte Linien). Die Farben in den obigen Schemata entsprechen dem Abstand zwischen den Translationsorten: (a) gemischter Bürstenfall mit 0 μm und einen Abstand von (b) 100 μm (c) 200 μm (d) 300 μm (e) 400 μm (f) 500 μm . Parameter sind im Anhang in Tabelle A.16 zu finden. 69
- 5.7. **Unterscheidung der Assemblierungspfade in Abhängigkeit vom Abstand der Translationsorte** Gezeigt ist die Verteilung der Konzentrationen der an der Oberfläche gebundenen Spezies $C_{b,x}$, d. h. aller Komplexe, *oberflächen-* und *lösungsassemblierte* Komplexe. Der durch das Fitting in Abbildung 5.6 ermittelte Parametersatz erlaubt eine Unterscheidung zwischen *oberflächen-* und *lösungsassemblierten* (gepunktet und gestrichelt) Komplexen. Der Bereich der experimentellen Beobachtung (Schattierung, siehe auch Abbildung 5.6) dient zum Vergleich und zeigt die Konzentration $C_{b,Comp}$ der gebundenen Komplexe. Die Farben in den obigen Schemata entsprechen dem Abstand zwischen den Translationsorten: (a) gemischter Bürstenfall mit 0 μm und einen Abstand von (b) 100 μm (c) 200 μm (d) 300 μm (e) 400 μm (f) 500 μm . Parameter sind zu finden im Anhang in Tabelle A.16. 72

- 5.8. **Kurz- und Langzeitverhalten der Komplexbindungs-Effizienz im Vergleich zur Fallen-Effizienz.** Die Beeinflussung der Komplexbindungs-Effizienz durch die Limitierung der Fallen an der Oberfläche wird durch die Fallen-Effizienz beschrieben. Wie auch im Einproteinfall lässt sich der zeitliche Verlauf der Fallen-Effizienz in drei Regime einteilen I bindedominiertes Regime, II Mischregime, III produktionsdominiertes Regime. Die Effizienz der Komplexbindung hängt ab von dem Abstand zwischen den Translationsorten (wie in der Legende angegeben). Die experimentelle Beobachtung fand nach etwa $t = 2$ h (grau schattierter Bereich) statt, was im beginnenden Mischregime der Fallen-Effizienz liegt. Detailkurven zu den lösungs- und oberflächenassemblierten Komplexen in Abhängigkeit vom Abstand befinden sich im Anhang Abbildung D.7 75
- 6.1. **Illustration des Querschnitts einer *E. coli*-Zelle von Goodsell [76].** Gezeigt sind drei Regionen: Die Zellwand (grün), das Zytoplasma (magenta und blau) und das Kernäquivalent (gelb und orange), in dem sich die DNA (gelb) aufhält. 78
- 6.2. **Schematische Darstellung der Bewegung des Genlocus am Beispiel von *E. coli*, entnommen aus Yang u. a. [77].** (a) Schematische Darstellung der Zelle mit Kernäquivalent (grau) und Zytoplasma (weiß) (b-e) vergrößerter Zellausschnitt; (b) Beginn der Transkription durch Bindung der RNAP an den Promotor des zu synthetisierenden Gens (c) Erhöhung der Bewegung des Genlocus in Richtung der Peripherie auf Grund (d, e) von Bindung von Ribosomen an die noch zu transkribierende mRNA (co-transkriptionelle Translation). 78
- 6.3. **Co- vs. post-translationale-Assemblierung.** Räumlich voneinander getrennten Translationsorte, die durch mRNA (braun, Linie), Ribosomen (grün) und den naszierenden Polypeptidketten (rot bzw. blaue Ketten) dargestellt sind. Es werden zwei voneinander unterscheidbare Proteine (rot und blau) auf den entsprechenden Translationsorten synthetisiert. Ein fertig synthetisiertes rotes Protein (rot, Knäuel), kann auf zwei verschiedenen Wegen (Pfeile) durch die Bindung mit einem blauen Protein zu einem Komplex (rot und blau ineinander verknäult) werden. Entweder (a) post-translationale durch die Bindung mit einem freien blauen Protein (blau, Knäuel) oder (b) co-translationale durch die Bindung mit der blauen naszierenden Polypeptidkette (blaue Kette, entspricht dem noch nicht fertig synthetisierten blauen Protein, noch gebunden am Ribosom) und dessen Freilassung nach der Translation der mRNA. 80

- 6.4. **Abstand der Translationsorte ist bedingt durch monocistronische (a) und polycistronische (b) mRNA.** Räumlich voneinander getrennten Translationsorte, die durch mRNA (braun, Linie), Ribosomen (grün) und den naszierenden Polypeptidketten (rot oder blaue Ketten) dargestellt sind. Die für die Proteinsynthese benötigten Informationen für (a) genau ein Protein und (b) mehr als ein Protein befinden sich auf einer mRNA. 81
- 6.5. **Reaktionsschema für das *in vivo*-System.** Erzeugung von naszierenden Ketten $nascA$, $nascB$ (Initiation der Proteine); Umwandlung der naszierenden Kette in ein fertiges Protein A , B ; Assemblierung der Proteinuntereinheiten zu einem Proteinkomplex AB_{post} , AB_{co} 82
- 6.6. Schema des diskretisierten Modellbakteriums mit unterschiedlichen Translationsorten für Protein A (rot) und B (blau). Die farbigen Bereiche kennzeichnen die Boxen $[i = i_{ini}^{nascA}]$ und $[i = i_{ini}^{nascB}]$ 86
- 6.7. **Verteilungen von zwei Proteinuntereinheiten und Ort der Komplexbildung ohne (links) und mit (rechts) Degradation der Proteinuntereinheiten A und B .** Gezeigt werden die Verteilungen: (a, c) der freien Proteinuntereinheiten A , B und die naszierenden Ketten B ; (b, d) der Entstehungsorte der co- und post-translationalen Proteinkomplexe AB_{co} und AB_{post} 90
- 6.8. **Die Effizienz der Komplexbildung ist nur dann vom Abstand zwischen Translationsorten abhängig, wenn die Degradation der Proteinuntereinheiten nicht Null ist.** (a) und (c) zeigen die Dominanz der Assemblierung, definiert in Gleichung (6.6) (b) und (d) geben die Gesamtkonzentration an Komplexen ($C_{comp} = C_{AnascB}(t) + C_{AB_{co}}(t) + C_{AB_{post}}(t)$) im Lauf der Zeit an. 92
- 6.9. **Initiationsraten beeinflussen die Dominanz d_{Ass} der co-translationalen Assemblierung.** Initiationsraten α_{ini}^{nascA} und α_{ini}^{nascB} für $nascA$ und $nascB$: $\alpha_{ini}^{nascA} < \alpha_{ini}^{nascB}$ (orange), $\alpha_{ini}^{nascA} = \alpha_{ini}^{nascB}$ (blau), $\alpha_{ini}^{nascA} > \alpha_{ini}^{nascB}$ (magenta). Nur im ersten Fall dominiert die post-translationalen Assemblierung für hinreichend große Zeiten. 93
- 6.10. **Einfluss der Operonanordnung auf den Regimewechsel von post-(rot) und co-translationaler (blau) Assemblierung.** Die Spalten stehen für die unterschiedliche Operonanordnung (a-d) Operon AB , (e-h) Startpunkt der Initiation von A , B erfolgt zur gleichen Zeit, (i-j) Operon BA . Jede Zeile zeigt die Variation eines anderen Parameters (a, e, i) Bindeaffinität κ_{bin} der Proteine, (b, f, j) Breite des Translationsortes, (c, g, k) Abstand der Translationsorte, (d, h, j) Verhältnis $\alpha_{ini}^{nascA} / \alpha_{ini}^{nascB}$ aus der Initiationsrate des Proteins A und B 95

<p>A.1. Angenommene und simulierte Verteilungen an freien Fallen. Zu Beginn der Simulationen wird eine Startkonzentration an freien Fallen angenommen, die homogen (1) oder auch inhomogen verteilt sind. Dargestellt ist hier der angenommene Anteil an freien Fallen. In (7-12) wird der Anteil der freien Fallen simuliert in dem eine Startkonzentration von Schmutzpartikeln (Streptavidin) im Quellbereich existiert, die sich entlang des Biochips verteilen und somit bestimmt Bereiche des Chips belegt, was zu einer Verringerung der freien Fallen führt. Es wird für (7-12) von einer homogenen Verteilung (1) der freien Fallen ausgegangen, die durch die Verteilung der Schmutzpartikel zu einer inhomogenen Verteilung wird. Für (39-41) wird von einer inhomogenen Startkonzentrationsverteilung (38) an Fallen ausgegangen.</p>	<p>118</p>
<p>A.2. Anfangskonzentration an ungebundenen Molekülen im System.</p>	<p>119</p>
<p>C.1. Maximum der Fallen-Effizienz f_b^{\max} zum Zeitpunkt t^* in Abhängigkeit von der Binderate κ_{bin} und der Produktionsrate α_{prod}; Der Farbcode sowie die z-Achse geben den Wert der maximalen Fallen-Effizienz an</p>	<p>125</p>
<p>C.2. Konzentration der gebundenen Moleküle $C_b(t^*)$ zum Zeitpunkt t^*, wenn das maximale f_b^{\max} erreicht ist in Abhängigkeit von der Binderate κ_{bin} und der Produktionsrate α_{prod}</p>	<p>126</p>
<p>C.3. Eine Erhöhung der Fallen-Kapazität bewirkt eine Verschiebung der Verteilung der gebundenen Moleküle an der Oberfläche zu späteren Zeitskalen. Erste Spalte (a-c): Fallen-Kapazität $C_{i,b}^{\max} = 1 \mu\text{M}$, zweite Spalte (d-f) Fallen-Kapazität $C_{i,b}^{\max} = 1 \mu\text{M}$. (a,d) Darstellung der Fallen-Effizienz $f_b(t)$ (b,e) Anzahl an gebundenen und Gesamtanzahl an Molekülen im System (c,f) Darstellung der Verteilung der gebundenen Moleküle zu den für die Fallen-Effizienz charakteristischen Zeitpunkten</p>	<p>127</p>
<p>C.4. Bereich der Aktivierung der Oberfläche des Biochips [74] Gezeigt an einer mikroskopischen Aufnahme des experimentellen Biochips von oben. Farbig eingezeichnet sind die Bereiche für die DNA-Bürsten (rot) und die zu aktivierenden Bereiche der Oberfläche mittels lokaler Belichtung mit UV-Licht (hellorange). Die durch UV-Licht aktivierten Bereiche, sind die Bereiche in denen sich die Fallen befinden. Die Versuchsaufbaubeschreibung findet sich in Abschnitt 3.1 [54], [i.V. 74].</p>	<p>128</p>

- D.1. **Theoretische Untersuchung des Einflusses des Abstandes der Translationsorte auf die Verteilung der gebundenen Komplexe** (a-f) zeigen die Konzentration aller gebundenen Proteine ($\mathcal{F}(\mathcal{A}\mathcal{B})$, $\mathcal{F}\mathcal{A}$, $(\mathcal{F}\mathcal{A})\mathcal{B}$) entlang des Biochips. Dabei werden die experimentellen Daten (durchgezogene Linien) und deren Standardabweichung (Schattierung) bestmöglich durch das in Abschnitt 5.1 beschriebene Modell mit einem Parametersatz für alle Abstände angenähert (gestrichelte Linien). Der dargestellte Parametersatz entspricht dem in Abbildung 5.6. Die Farben in den obigen Schemata entsprechen dem Abstand zwischen den Translationsorten: (a) gemischter Bürstenfall und einen Abstand von (b) 100 μm (c) 200 μm (d) 300 μm (e) 400 μm (f) 500 μm Parameter können nachgelesen werden im Anhang in Tabelle A.16 131
- D.2. **Theoretische Untersuchung des Einflusses des Abstandes der Translationsorte auf die Verteilung der gebundenen Komplexe** (a-f) zeigen die Konzentration der gebundenen Komplexe entlang des Biochips. Dabei werden die experimentellen Daten (durchgezogene Linien) und deren Standardabweichung (Schattierung) bestmöglich durch das in Abschnitt 5.1 beschriebene Modell mit einem Parametersatz für alle Abstände angenähert (gestrichelte Linien). Die Farben in den obigen Schemata entsprechen dem Abstand zwischen den Translationsorten: (a) gemischter Bürstenfall und einen Abstand von (b) 100 μm (c) 200 μm (d) 300 μm (e) 400 μm (f) 500 μm Parameter können nachgelesen werden im Anhang in Tabelle A.24 132
- D.3. **Theoretische Untersuchung des Einflusses des Abstandes der Translationsorte auf die Verteilung der gebundenen Komplexe** (a-f) zeigen die Konzentration der gebundenen Komplexe entlang des Biochips. Dabei werden die experimentellen Daten (durchgezogene Linien) und deren Standardabweichung (Schattierung) bestmöglich durch das in Abschnitt 5.1 beschriebene Modell mit einem Parametersatz für alle Abstände angenähert (gestrichelte Linien). Die Farben in den obigen Schemata entsprechen dem Abstand zwischen den Translationsorten: (a) gemischter Bürstenfall und einen Abstand von (b) 100 μm (c) 200 μm (d) 300 μm (e) 400 μm (f) 500 μm . Parameter können nachgelesen werden im Anhang in Tabelle A.25 133
- D.5. **Unterscheidung der Assemblierungspfade in Abhängigkeit vom Abstand der Translationsorte** Dargestellt ist die Verteilung der Konzentration der an der Oberfläche gebundenen *oberflächen-* und *lösungsassemblierten* Komplexe. Der Ort des Maximums und die Breite der Verteilung der *oberflächen-* und *lösungsassemblierten* Komplexe (a und b) richtet sich nach dem Abstand der Translationsorte. 135

D.6. **Die Stärke der Dominanz von Lösungs- und Oberflächenassemblierung richtet sich nach dem Abstand der Translationsorte.** Dargestellt ist die zeitliche Entwicklung der Dominanz der *oberflächen-* (rot) und *lösungsassemblierten* (blau) Komplexe. Die Stärke der Dominanz berechnet sich aus dem Verhältnis aus der Konzentration der an der Oberfläche gebundenen Komplexe durch die Gesamtanzahl der gebundenen Komplexe und ist durch den Farbgradienten dargestellt. Je dunkler die Farbe desto dominanter ist der jeweilige Assemblierungspfad, wobei weiß bedeutet, dass *Lösungs-* und *Oberflächenassemblierung* gleich stark sind. Die Translationsorte der \mathcal{A} und \mathcal{B} haben einen Abstand von: (a) 100 μm (b) 500 μm 135

D.7. **Einfluss des Abstand der Translationsorte auf die Komplexbildung.** Dargestellt sind die Verteilungen von Proteinen zum Zeitpunkt $t = 34 \cdot 10^3 \Delta t$ für unterschiedliche Abstände zwischen den Translationsorten: (a-c) 0 μm , (d-f) 100 μm , (g-i) 500 μm . Unterschieden wird in den Zeilen zwischen den Spezies: (a, d, g) der besetzten Fallen, die der Gesamtheit aller gebundener Proteine im System entspricht, (b, e, h) der freien Proteinuntereinheiten \mathcal{A} (blau) und \mathcal{B} (orange), (c, f, i) der Gesamtkonzentration an gebundenen Komplexen (blau) die aus der Summe der *oberflächenassemblierten* Komplexe die an der Oberfläche gebunden (orange) sind und der *lösungsassemblierten* Komplexe (grün) bestehen. Die Quellbereiche der Proteinuntereinheiten \mathcal{A} (blau) und \mathcal{B} (orange) sind als farbige Rechtecke gekennzeichnet. 136

E.1. **Diffusionskonstante für Proteine in *E. coli* gemessen von Yu-Wei Shieh (Gruppe Günter Kramer) bei 30°** Fitting der experimentell bestimmten Diffusionskoeffizienten mittels des Modells in [95, Abbildung 4, S. 556] 138

E.2. **Initiationsraten haben einen geringen Einfluss auf die Gesamtkonzentration der Komplexe.** Gesamtkonzentration an Komplexen beinhaltet sowohl die freien Proteinkomplexe ($C_{\mathcal{A}\mathcal{B}\text{co}}(t) + C_{\mathcal{A}\mathcal{B}\text{post}}(t)$) als auch die noch gebundenen ($C_{\mathcal{A}\text{nasc}\mathcal{B}}(t)$). Initiationsraten $\alpha_{\text{ini}}^{\text{nasc}\mathcal{A}}$ und $\alpha_{\text{ini}}^{\text{nasc}\mathcal{B}}$ für *nascA* und *nascB*: $\alpha_{\text{ini}}^{\text{nasc}\mathcal{A}} < \alpha_{\text{ini}}^{\text{nasc}\mathcal{B}}$ (orange), $\alpha_{\text{ini}}^{\text{nasc}\mathcal{A}} = \alpha_{\text{ini}}^{\text{nasc}\mathcal{B}}$ (blau), $\alpha_{\text{ini}}^{\text{nasc}\mathcal{A}} > \alpha_{\text{ini}}^{\text{nasc}\mathcal{B}}$ (magenta). Nur im ersten Fall dominiert die post-translationale Assemblierung für hinreichend große Zeiten. 139

-
- F.1. **Proteinexpression im *in vitro* und in *in vivo*.** Konzentration der im Gesamtsystem befindlichen Proteine \mathcal{A} in Abhängigkeit von der Zeit. Unterschieden wird zwischen einem *in vivo* Modell mit Initiationsrate und Terminationsrate der Proteine \mathcal{A} und einem *in vitro* Modell mit einer Produktionsrate der Proteine \mathcal{A} 143
- F.2. **Summe aus gebundenen und freien grün fluoreszierenden Proteinen (GFP) im *in vitro* System.** Experimentell von der Gruppe Roy Bar-Ziv ermittelte zeitliche Entwicklung der Erzeugung eines Proteintyps (GFP). Die Erzeugung der Protein wird in Systemen mit drei unterschiedlichen Fallenverteilungen betrachtet. Die zeitliche Entwicklung verläuft zwischen (30 bis 90) min annähernd linear, wohingegen für lange Zeitskalen eine leichte Sättigung eintritt. 143

Literatur

- [1] W. Magnus und F. Oberhettinger, „Die konfluente hypergeometrische Funktion und ihre Spezialfälle“, in *Formeln und Sätze für die Speziellen Funktionen der Mathematischen Physik*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1948, S. 111–127, ISBN: 978-3-662-01222-2.
- [2] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J. D. Watson, *Molecular Biology of the Cell*, 4th. Garland, 2002, ISBN: 0-8240-3695-6.
- [3] J. Stock und A. Pauli, „Self-organized cell migration across scales – from single cell movement to tissue formation“, *Development*, Bd. 148, Nr. 7, 2021, ISSN: 0950-1991. DOI: 10.1242/dev.191767.
- [4] D. A. Lauffenburger und A. F. Horwitz, „Cell migration: a physically integrated molecular process“, *Cell*, Bd. 84, Nr. 3, S. 359–369, 1996, ISSN: 0092-8674. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81280-5.
- [5] N. Buddelmeijer und J. Beckwith, „Assembly of cell division proteins at the E. coli cell center“, *Current Opinion in Microbiology*, Bd. 5, Nr. 6, S. 553–557, 2002, ISSN: 13695274. DOI: 10.1016/S1369-5274(02)00374-0.
- [6] J. Lutkenhaus, „Dynamic proteins in bacteria“, *Current Opinion in Microbiology*, Bd. 5, Nr. 6, S. 548–552, 2002, ISSN: 13695274. DOI: 10.1016/S1369-5274(02)00376-4.
- [7] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J. D. Watson, „An overview of the cell cycle“, in *Molecular Biology of the Cell*, New York: Garland Science, 2002, An Overview of the Cell Cycle, ISBN: 0-8240-3695-6.
- [8] J. B. Stock und M. G. Surette, „Chemotaxis“, in *ESCHERICHIA coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, F. C. Neidhardt, Hrsg., 2nd, American Society for Microbiology, 1996, Kap. Chemotaxis, S. 1103–1147, ISBN: 1555810845.

- [9] S. Mann, „Life as a nanoscale phenomenon“, *Angewandte Chemie International Edition*, Bd. 47, Nr. 29, S. 5306–5320, Juli 2008, ISSN: 1433-7851. DOI: 10.1002/anie.200705538.
- [10] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J. D. Watson, *Alberts - Molecular Biology Of The Cell*, 2th Editio. 1989, ISBN: 0824036956.
- [11] J. D. Wang und P. A. Levin, „Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle“, *Nature Reviews Microbiology*, Bd. 7, Nr. 11, S. 822–827, 2009, ISSN: 1740-1534. DOI: 10.1038/nrmicro2202.
- [12] G. Colombo, P. Soto und E. Gazit, „Peptide self-assembly at the nanoscale: a challenging target for computational and experimental biotechnology“, *Trends in Biotechnology*, Bd. 25, Nr. 5, S. 211–218, 2007, ISSN: 0167-7799. DOI: 10.1016/j.tibtech.2007.03.004.
- [13] V. Castelletto, J. Seitsonen, K. Tewari, A. Hasan, R. Edkins, J. Ruokolainen, L. Pandey, I. Hamley und K. H. A. Lau, „Self-assembly of minimal peptoid sequences“, *ACS Macro Letters*, Bd. 9, S. 494–499, 2020. DOI: 10.1021/acsmacrolett.9b01010.
- [14] A. Lampel, R. V. Ulijn und T. Tuttle, „Guiding principles for peptide nanotechnology through directed discovery“, *Chemical Society Reviews*, Bd. 47, Nr. 10, S. 3737–3758, 2018. DOI: 10.1039/C8CS00177D.
- [15] N. Kobayashi und R. Arai, „Design and construction of self-assembling supramolecular protein complexes using artificial and fusion proteins as nanoscale building blocks“, *Current Opinion in Biotechnology*, Bd. 46, S. 57–65, 2017, ISSN: 0958-1669. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.01.001.
- [16] A. Levin, T. A. Hakala, L. Schnaider, G. J. L. Bernardes, E. Gazit und T. P. J. Knowles, „Biomimetic peptide self-assembly for functional materials“, *Nature Reviews Chemistry*, Bd. 4, Nr. 11, S. 615–634, 2020, ISSN: 2397-3358. DOI: 10.1038/s41570-020-0215-y.
- [17] G. Bellapadrona, S. Sinkar, H. Sabanay, V. Liljeström, M. Kostianen und M. Elbaum, „Supramolecular assembly and coalescence of ferritin cages driven by designed protein–protein interactions“, *Biomacromolecules*, Bd. 16, Nr. 7, S. 2006–2011, Juli 2015, ISSN: 1525-7797. DOI: 10.1021/acs.biomac.5b00435.
- [18] S. Gonen, F. DiMaio, T. Gonen und D. Baker, „Design of ordered two-dimensional arrays mediated by noncovalent protein-protein interfaces“, *Science*, Bd. 348, Nr. 6241, S. 1365–1368, 2015, ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.aaa9897.

- [19] W. J. Song und F. A. Tezcan, „A designed supramolecular protein assembly with in vivo enzymatic activity“, *Science*, Bd. 346, Nr. 6216, S. 1525–1528, 2014, ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.1259680.
- [20] D. M. Raymond und B. L. Nilsson, „Multicomponent peptide assemblies“, *Chemical Society Reviews*, Bd. 47, Nr. 10, S. 3659–3720, 2018. DOI: 10.1039/C8CS00115D.
- [21] A. T. Blanchard und K. Salaita, „Emerging uses of DNA mechanical devices“, *Science*, Bd. 365, Nr. 6458, S. 1080–1081, 2019, ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.aax3343.
- [22] G. Zhang, S. P. Surwade, F. Zhou und H. Liu, „DNA nanostructure meets nanofabrication“, *Chem. Soc. Rev.*, Bd. 42, Nr. 7, S. 2488–2496, 2013. DOI: 10.1039/C2CS35302D.
- [23] M. Madsen und K. V. Gothelf, „Chemistries for DNA nanotechnology“, *Chemical Reviews*, Bd. 119, Nr. 10, S. 6384–6458, 2019. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00570.
- [24] N. C. Seeman und H. F. Sleiman, „DNA nanotechnology“, *Nature Reviews Materials*, Bd. 3, Nr. 1, S. 17 068, 2017, ISSN: 2058-8437. DOI: 10.1038/natrevmats.2017.68.
- [25] J. J. Keya, R. Suzuki, A. M. R. Kabir, D. Inoue, H. Asanuma, K. Sada, H. Hess, A. Kuzuya und A. Kakugo, „DNA-assisted swarm control in a biomolecular motor system“, *Nature Communications*, Bd. 9, Nr. 1, S. 453, 2018, ISSN: 2041-1723. DOI: 10.1038/s41467-017-02778-5.
- [26] E. Kopperger, J. List, S. Madhira, F. Rothfischer, D. C. Lamb und F. C. Simmel, „A self-assembled nanoscale robotic arm controlled by electric fields“, *Science*, Bd. 359, Nr. 6373, S. 296–301, 2018, ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.aao4284.
- [27] X. Feng, C. Du und J. Li, „Molecular assembly of polysaccharide-based microcapsules and their biomedical applications“, *The Chemical Record*, Bd. 16, Nr. 4, S. 1991–2004, 2016. DOI: 10.1002/tcr.201600051.
- [28] T. Miao, J. Wang, Y. Zeng, G. Liu und X. Chen, „Polysaccharide-based controlled release systems for therapeutics delivery and tissue engineering: from bench to bedside.“, eng, *Advanced science (Weinheim, Baden-Württemberg, Germany)*, Bd. 5, Nr. 4, S. 1 700 513, Apr. 2018, ISSN: 2198-3844 (Print). DOI: 10.1002/advs.201700513.

- [29] R. J. Mart, R. D. Osborne, M. M. Stevens und R. V. Ulijn, „Peptide-based stimuli-responsive biomaterials“, *Soft Matter*, Bd. 2, Nr. 10, S. 822–835, 2006. DOI: 10.1039/b607706d.
- [30] E. Ellis, S. Moorthy, W.-I. K. Chio und T.-C. Lee, „Artificial molecular and nanostructures for advanced nanomachinery“, *Chem. Commun.*, Bd. 54, Nr. 33, S. 4075–4090, 2018. DOI: 10.1039/C7CC09133H.
- [31] T. K. Nguyen und T. Ueno, „Engineering of protein assemblies within cells“, *Current Opinion in Structural Biology*, Bd. 51, S. 1–8, 2018, ISSN: 0959-440X. DOI: 10.1016/j.sbi.2017.12.005.
- [32] R. Phillips, J. Kondev und J. Theriot, *Physical Biology of the Cell*. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, Nov. 2008, ISBN: 978-0815341635.
- [33] P. G. Leiman, F. Arisaka, M. J. Van Raaij, V. A. Kostyuchenko, A. A. Akxyuk, S. Kanamaru und M. G. Rossmann, „Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers“, *Virology Journal*, 2010, ISSN: 1743422X. DOI: 10.1186/1743-422X-7-355.
- [34] E. S. Miller, E. Kutter, G. Mosig, F. Arisaka, T. Kunisawa und W. Ruger, „Bacteriophage T4 genome“, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, ISSN: 1092-2172. DOI: 10.1128/mubr.67.1.86-156.2003.
- [35] H. Hadas, M. Einav, I. Fishov und A. Zaritsky, „Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host Escherichia coli“, *Microbiology*, Bd. 143, Nr. 1, S. 179–185, 1997, ISSN: 1465-2080. DOI: 10.1099/00221287-143-1-179.
- [36] A. Schwarz und M. Beck, „The benefits of cotranslational assembly: a structural perspective“, *Trends in Cell Biology*, Bd. 29, Nr. 10, S. 791–803, 2019. DOI: 10.1016/j.tcb.2019.07.006.
- [37] J. N. Wells, L. T. Bergendahl und J. A. Marsh, „Operon gene order is optimized for ordered protein complex assembly“, eng, *Cell reports*, Bd. 14, Nr. 4, S. 679–685, Feb. 2016, ISSN: 2211-1247. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.12.085.
- [38] G. Chiesa, S. Kiriakov und A. S. Khalil, „Protein assembly systems in natural and synthetic biology“, eng, *BMC biology*, Bd. 18, Nr. 1, S. 35, Marz 2020, ISSN: 1741-7007. DOI: 10.1186/s12915-020-0751-4.
- [39] S. S. Daube und R. H. Bar-Ziv, „Protein nanomachines assembly modes: cell-free expression and biochip perspectives“, *Wiley Interdisciplinary*

- Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2013, ISSN: 19395116.
DOI: 10.1002/wnan.1234.
- [40] T. D. Pollard, W. C. Earnshaw, J. Lippincott-Schwartz und G. T. Johnson, *Cell Biology: Third Edition*. 2016, ISBN: 9780323341264.
- [41] D. Zipser, „Studies on the ribosome-bound β -galactosidase of *Escherichia coli*“, *Journal of Molecular Biology*, Bd. 7, Nr. 6, S. 739–751, 1963, ISSN: 0022-2836. DOI: 10.1016/S0022-2836(63)80120-5.
- [42] Y. KIHNO und A. RICH, „Induced enzyme formed on bacterial polyribosomes.“, eng, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 51, Nr. 1, S. 111–118, Jan. 1964, ISSN: 0027-8424 (Print). DOI: 10.1073/pnas.51.1.111.
- [43] E. Natan, J. N. Wells, S. A. Teichmann und J. A. Marsh, „Regulation, evolution and consequences of cotranslational protein complex assembly“, *Current Opinion in Structural Biology*, Bd. 42, S. 90–97, 2017, ISSN: 0959-440X. DOI: 10.1016/j.sbi.2016.11.023.
- [44] C. D. S. Duncan und J. Mata, „Widespread cotranslational formation of protein complexes.“, eng, *PLoS genetics*, Bd. 7, Nr. 12, e1002398, Dez. 2011, ISSN: 1553-7404 (Electronic). DOI: 10.1371/journal.pgen.1002398.
- [45] F. Edda, T. Domenico, J. Marie-Helene, K. Jean-Pierre und P. H. L., „Cotranslational endoplasmic reticulum assembly of fc ϵ ri controls the formation of functional IgE-binding receptors“, *Journal of Experimental Medicine*, Bd. 201, Nr. 2, S. 267–277, 2005, ISSN: 0022-1007. DOI: 10.1084/jem.20041384.
- [46] A. Halbach, H. Zhang, A. Wengi, Z. Jablonska, I. M. L. Gruber, R. E. Halbeisen, P.-M. Dehé, P. Kemmeren, F. Holstege, V. Géli, A. P. Gerber und B. Dichtl, „Cotranslational assembly of the yeast SET1C histone methyltransferase complex.“, *The EMBO journal*, Bd. 28, Nr. 19, S. 2959–70, 2009. DOI: 10.1038/emboj.2009.240.
- [47] L. Zhang, V. Paakkarinen, K. J. van Wijk und E. M. Aro, „Co-translational assembly of the D1 protein into photosystem II.“, eng, *The Journal of biological chemistry*, Bd. 274, Nr. 23, S. 16 062–16 067, Juni 1999, ISSN: 0021-9258 (Print). DOI: 10.1074/jbc.274.23.16062.
- [48] S. Dwane und P. A. Kiely, „Tools used to study how protein complexes are assembled in signaling cascades“, *Bioengineered Bugs*, Bd. 2, Nr. 5, S. 247–259, 2011, ISSN: 19491018. DOI: 10.4161/bbug.2.5.17844.

- [49] Y.-W. Shieh, P. Minguez, P. Bork, J. J. Auburger, D. L. Guilbride und B. Bukau, „Operon structure and cotranslational subunit association direct protein assembly in bacteria“, Bd. 350, Nr. 6261, S. 678–680, 2015. DOI: 10.1126/science.aac8171.
- [50] H. Asahara und S. Chong, „In vitro genetic reconstruction of bacterial transcription initiation by coupled synthesis and detection of RNA polymerase holoenzyme.“, eng, *Nucleic acids research*, Bd. 38, Nr. 13, e141, Juli 2010, ISSN: 1362-4962 (Electronic). DOI: 10.1093/nar/gkq377.
- [51] S. S. Daube, T. Arad und R. Bar-Ziv, „Cell-free co-synthesis of protein nanoassemblies: tubes, rings, and doughnuts“, *Nano Letters*, 2007, ISSN: 15306984. DOI: 10.1021/nl062560n.
- [52] D. Matthies, S. Haberstock, F. Joos, V. Dötsch, J. Vonck, F. Bernhard und T. Meier, „Cell-free expression and assembly of ATP synthase“, *Journal of Molecular Biology*, 2011, ISSN: 10898638. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.08.055.
- [53] M. Rustad, A. Eastlund, P. Jardine und V. Noireaux, „Cell-free TXTL synthesis of infectious bacteriophage T4 in a single test tube reaction.“, eng, *Synthetic biology (Oxford, England)*, Bd. 3, Nr. 1, ysy002, 2018, ISSN: 2397-7000 (Electronic). DOI: 10.1093/synbio/ysy002.
- [54] O. Vonshak, Y. Divon, S. Förste, D. Garenne, V. Noireaux, R. Lipowsky, S. Rudolf, S. S. Daube und R. H. Bar-Ziv, „Programming multi-protein assembly by gene-brush patterns and two-dimensional compartment geometry“, *Nature Nanotechnology*, Bd. 15, Nr. 9, S. 783–791, 2020, ISSN: 1748-3395. DOI: 10.1038/s41565-020-0720-7.
- [55] E. D. Levy, E. B. Erba, C. V. Robinson und S. A. Teichmann, „Assembly reflects evolution of protein complexes“, *Nature*, Bd. 453, Nr. 7199, S. 1262–1265, 2008, ISSN: 1476-4687. DOI: 10.1038/nature06942.
- [56] J. A. Marsh, H. Hernández, Z. Hall, S. E. Ahnert, T. Perica, C. V. Robinson und S. A. Teichmann, „Protein complexes are under evolutionary selection to assemble via ordered pathways“, *Cell*, 2013, ISSN: 00928674. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.044.
- [57] N. Banterle, A. P. Nievergelt, S. de Buhr, G. N. Hatzopoulos, C. Brillard, S. Andany, T. Hübscher, F. Sorgenfrei, U. S. Schwarz, F. Gräter, G. E. Fantner und P. Gönczy, „Surface-catalyzed SAS-6 self-assembly directs centriole formation through kinetic and structural mechanisms“, *BioRxiv*, Bd. preprint, 2020. DOI: 10.1101/2020.09.04.283184.
- [58] A. P. Nievergelt, N. Banterle, S. H. Andany, P. Gönczy und G. E. Fantner, „High-speed photothermal off-resonance atomic force microscopy reveals

- assembly routes of centriolar scaffold protein SAS-6“, *Nature nanotechnology*, Bd. 13, Nr. 8, S. 696–701, Aug. 2018, ISSN: 1748-3387. DOI: 10.1038/s41565-018-0149-4.
- [59] E. N. Moriyama und J. R. Powell, „Gene length and codon usage bias in *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*“, *Nucleic Acids Research*, Bd. 26, Nr. 13, S. 3188–3193, 1998, ISSN: 0305-1048. DOI: 10.1093/nar/26.13.3188.
- [60] K. Bentele, „Mechanisms of translational regulation in bacteria“, Diss., Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.18452/16839>.
- [61] A. B. Sahakyan und S. Balasubramanian, „Long genes and genes with multiple splice variants are enriched in pathways linked to cancer and other multigenic diseases“, *BMC Genomics*, Bd. 17, Nr. 1, S. 225, 2016, ISSN: 1471-2164. DOI: 10.1186/s12864-016-2582-9.
- [62] P. W. Atkins, A. Höpfner und A. Schleitzer, *Physikalische Chemie*, 3. Aufl. Wiley-VCH, 2001, ISBN: 3527302360.
- [63] A. Einstein, „Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen“, *Annalen der Physik*, Bd. 322, Nr. 8, S. 549–560, 1905. DOI: 10.1002/andp.19053220806.
- [64] M. von Smoluchowski, „Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen“, *Annalen der Physik*, Bd. 326, Nr. 14, S. 756–780, 1906. DOI: 10.1002/andp.19063261405.
- [65] I. Laurenzi, „An analytical solution of the stochastic master equation for reversible bimolecular reaction kinetics“, *Journal of Chemical Physics*, Bd. 113, Nr. 8, S. 3315–3322, Aug. 2000. DOI: 10.1063/1.1287273.
- [66] H. R. Schwarz und N. Köckler, *Numerische Mathematik*. Vieweg+Teubner Verlag, 2011. DOI: 10.1007/978-3-8348-8166-3.
- [67] E. Hairer, S. P. Nørsett und G. Wanner, *Solving Ordinary Differential Equations I: Nonstiff Problems*, 2. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, 1993, ISBN: 978-3-540-56670-0. DOI: 10.1007/978-3-540-78862-1.
- [68] E. Behrends, *Analysis Band 1: Ein Lernbuch für den sanften Wechsel von der Schule zur Uni*, Ser. Vieweg-Studium. Vieweg+Teubner Verlag, 2007, S. 288–292, ISBN: 9783834891785.

- [69] T. Petrilu und D. Trif, „Basics of fluid mechanics and introduction to computational fluid dynamics“, Bd. 3, 2005. DOI: 10.1007/b102528.
- [70] Y. Heyman, A. Buxboim, S. G. Wolf, S. S. Daube und R. H. Bar-Ziv, „Cell-free protein synthesis and assembly on a biochip“, *Nature Nanotechnology*, Bd. 7, Nr. 6, S. 374–378, 2012, ISSN: 1748-3387. DOI: 10.1038/nnano.2012.65.
- [71] A. Buxboim, M. Bar-Dagan, V. Frydman, D. Zbaida, M. Morpurgo und R. Bar-Ziv, „A single-step photolithographic interface for cell-free gene expression and active biochips“, *Small*, Bd. 3, Nr. 3, S. 500–510, 2007, ISSN: 16136810. DOI: 10.1002/smll.200600489.
- [72] J. Field, J. Nikawa, D. Broek, B. MacDonald, L. Rodgers, I. A. Wilson, R. A. Lerner und M. Wigler, „Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method.“, *Molecular and cellular biology*, Bd. 8, Nr. 5, S. 2159–2165, Mai 1988. DOI: 10.1128/mcb.8.5.2159-2165.1988.
- [73] M. L. Yap, T. Klose, F. Arisaka, J. A. Speir, D. Veessler, A. Fokine und M. G. Rossmann, „Role of bacteriophage T4 baseplate in regulating assembly and infection“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Bd. 113, Nr. 10, S. 2654–2659, 2016, ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.1601654113.
- [74] S. Förste, O. Vonshak, S. S. Daube, R. Bar-Ziv, R. Lipowsky und S. Rudolf, „Characterization of constrained reaction-diffusion systems“, Bd. in Vorbereitung.
- [75] H. N. Lim, Y. Lee und R. Hussein, „Fundamental relationship between operon organization and gene expression“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 108, Nr. 26, S. 10 626–10 631, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1105692108.
- [76] D. S. Goodsell, „*Escherichia coli*“, *Biochemistry and Molecular Biology Education*, Bd. 37, Nr. 6, S. 325–332, 2009, ISSN: 14708175. DOI: 10.1002/bmb.20345.
- [77] S. Yang, S. Kim, D.-k. Kim, H. Jeon An, J. Bae Son, A. Hedén Gynnå und N. Ki Lee, „Transcription and translation contribute to gene locus relocation to the nucleoid periphery in *E. coli*“, *Nature Communications*, Bd. 10, Nr. 1, S. 5131, 2019, ISSN: 2041-1723. DOI: 10.1038/s41467-019-13152-y.
- [78] Y. Xiang, I. V. Surovtsev, Y. Chang, S. K. Govers, B. R. Parry, J. Liu und C. Jacobs-Wagner, „Interconnecting solvent quality, transcription, and chromosome folding in *Escherichia coli*.“, eng, *Cell*, Bd. 184, Nr. 14,

- 3626–3642.e14, Juli 2021, ISSN: 1097-4172 (Electronic). DOI: 10.1016/j.cell.2021.05.037.
- [79] N. T. Ingolia, „Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale.“, *Nature reviews. Genetics*, Bd. 15, Nr. 3, S. 205–13, 2014, ISSN: 1471-0064. DOI: 10.1038/nrg3645.
- [80] R. Jackson und N. Standart, „The awesome power of ribosome profiling.“, *RNA (New York, N.Y.)*, Bd. 21, Nr. 4, S. 652–654, 2015. DOI: 10.1261/rna.049908.115.
- [81] N. T. Ingolia, „Ribosome footprint profiling of translation throughout the genome“, *Cell*, Bd. 165, Nr. 1, S. 22–33, 2016, ISSN: 0092-8674. DOI: 10.1016/j.cell.2016.02.066.
- [82] G. Zhang und Z. Ignatova, „Folding at the birth of the nascent chain: coordinating translation with co-translational folding.“, eng, *Current opinion in structural biology*, Bd. 21, Nr. 1, S. 25–31, Feb. 2011, ISSN: 1879-033X (Electronic). DOI: 10.1016/j.sbi.2010.10.008.
- [83] D. V. Fedyukina und S. Cavagnero, „Protein folding at the exit tunnel.“, eng, *Annual review of biophysics*, Bd. 40, S. 337–359, 2011, ISSN: 1936-1238 (Electronic). DOI: 10.1146/annurev-biophys-042910-155338.
- [84] J. Lu, W. R. Kobertz und C. Deutsch, „Mapping the electrostatic potential within the ribosomal exit tunnel.“, eng, *Journal of molecular biology*, Bd. 371, Nr. 5, S. 1378–1391, Aug. 2007, ISSN: 0022-2836 (Print). DOI: 10.1016/j.jmb.2007.06.038.
- [85] N. R. Voss, M. Gerstein, T. A. Steitz und P. B. Moore, „The geometry of the ribosomal polypeptide exit tunnel.“, eng, *Journal of molecular biology*, Bd. 360, Nr. 4, S. 893–906, Juli 2006, ISSN: 0022-2836 (Print). DOI: 10.1016/j.jmb.2006.05.023.
- [86] M. Joiret, F. Rapino, P. Close und L. Geris, „Ribosome exit tunnel electrostatics“, *BioRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.10.20.346684.
- [87] K. Dao Duc, S. S. Batra, N. Bhattacharya, J. H. D. Cate und Y. S. Song, „Differences in the path to exit the ribosome across the three domains of life“, *Nucleic Acids Research*, Bd. 47, Nr. 8, S. 4198–4210, 2019, ISSN: 0305-1048. DOI: 10.1093/nar/gkz106.
- [88] C. Dobson, „Protein folding and misfolding“, *Nature*, Bd. 426, Nr. 6968, S. 884–890, 2003. DOI: 10.1038/nature02261.

- [89] T. P. J. Knowles, M. Vendruscolo und C. M. Dobson, „The amyloid state and its association with protein misfolding diseases“, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Bd. 15, Nr. 6, S. 384–396, 2014, ISSN: 1471-0080. DOI: 10.1038/nrm3810.
- [90] A. L. Goldberg, „Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins.“, eng, *Nature*, Bd. 426, Nr. 6968, S. 895–899, Dez. 2003, ISSN: 1476-4687 (Electronic). DOI: 10.1038/nature02263.
- [91] H. P. Erickson, „Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy“, *Biological Procedures Online*, Bd. 11, Nr. 1, S. 32–51, 2009, ISSN: 14809222. DOI: 10.1007/s12575-009-9008-x.
- [92] R. R. Kroe und T. M. Laue, „Nuts and bolts: applications of fluorescence-detected sedimentation.“, eng, *Analytical biochemistry*, Bd. 390, Nr. 1, S. 1–13, Juli 2009, ISSN: 1096-0309 (Electronic). DOI: 10.1016/j.ab.2008.11.033.
- [93] J. Lebowitz, M. S. Lewis und P. Schuck, „Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review.“, eng, *Protein science : A publication of the Protein Society*, Bd. 11, Nr. 9, S. 2067–2079, Sep. 2002, ISSN: 0961-8368 (Print). DOI: 10.1110/ps.0207702.
- [94] N. Bilgin, F. Claesens, H. Pahverk und M. Ehrenberg, „Kinetic properties of Escherichia coli ribosomes with altered forms of S12.“, eng, *Journal of molecular biology*, Bd. 224, Nr. 4, S. 1011–1027, Apr. 1992, ISSN: 0022-2836 (Print). DOI: 10.1016/0022-2836(92)90466-w.
- [95] M. Kumar, M. S. Mommer und V. Sourjik, „Mobility of cytoplasmic, membrane, and DNA-binding proteins in Escherichia coli“, *Biophysical Journal*, Bd. 98, Nr. 4, S. 552–559, 2010, ISSN: 00063495. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.11.002.
- [96] R. Milo, R. Phillips und N. Orme, *Cell Biology by the Numbers*. Garland Science, Taylor & Francis Group, 2015, ISBN: 978-0-8153-4537-4.