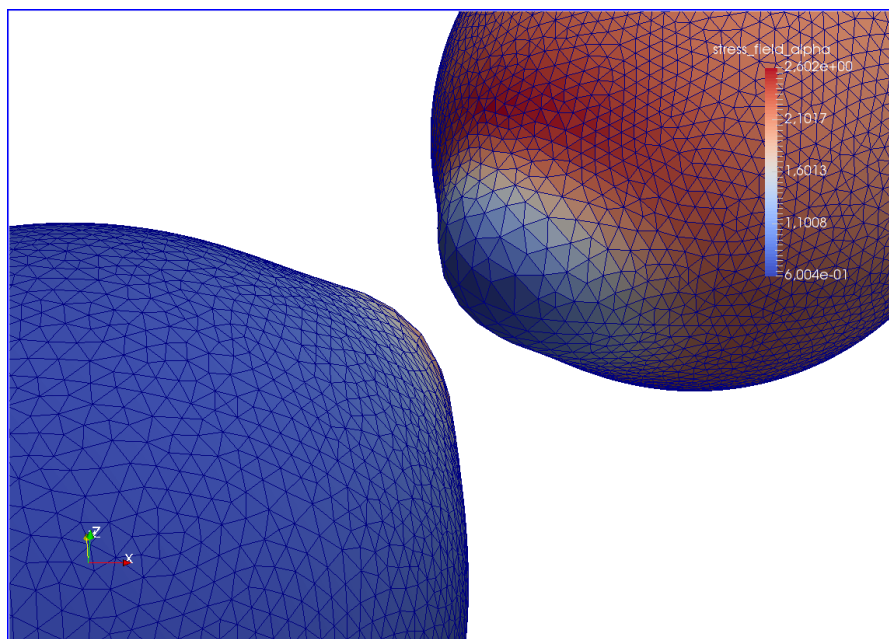


MASTERARBEIT

STUDIENGANG BIOINFORMATIK

FREIE UNIVERSITÄT BERLIN

RÄUMLICHE MODELLIERUNG DER ZELLWANDMECHANIK UND SIGNALÜBERTRAGUNG AM BEISPIEL DER PHEROMONANTWORT VON SACCHAROMYCES CEREVISIAE



1. Gutachter:

Prof. Dr. Edda KLIPP

HU-BERLIN

Verfasser:

Stefan FORGÓ

Matrikel-Nr: 4360068

stefan.forgo@fu-berlin.de

2. Gutachter:

Prof. Dr. Carsten GRÄSER

FU-BERLIN

Berlin, 22. April 2017

ZUSAMMENFASSUNG

Die Einfachheit von Hefezellen, sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrer Handhabung im Labor, machen diese Spezies zum beliebtesten Modellorganismus in der Zellbiologie. Viele wichtige Prozesse, wie Zellzyklus, Zellwachstum und Zellteilung ähneln den Abläufen in komplexeren eukaryotischen Zellen. Das Erforschen dieser Prozesse lässt Rückschlüsse auf den menschlichen Organismus zu. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Paarung von Hefezellen. Dabei kommunizieren die Zellen über Pheromone miteinander. Die Antwort auf einen extrazellulären Pheromongradienten ist die Orientierung (Polarisierung) und das Wachstum (Deformation der Zellwand) der Zelle. Mit dieser Arbeit soll ein Novum geschaffen werden: Die Simulation der Zellpaarung im dreidimensionalen Raum. Die Grundlagen dafür wurden bereits geschaffen und werden in Kapitel 2 vorgestellt. Für den Paarungs-Prozess werden Reaktion-Diffusionsgleichungen herangezogen (Kapitel 3), die mit Hilfe des DUNE- Frameworks - eine Bibliothek für das numerische Lösen partieller Differentialgleichungen auf der Basis der Finite-Elemente Methode (FEM) - berechnet werden (Kapitel 4 und 5). Die plastische Verformung der Zellwand bei der Bildung des Shmoos ist ein fertiges Modul aus [13]. Die Kommunikation der Zellen geschieht über einen Random-Walk der Signalquellen auf der Zelloberfläche mittels einer Adaption des Gillespie-SSA-Algorithmus (Kapitel 5), dabei folgen die Signale einem Konzentrationsgradienten aktiver Cdc42-Moleküle an der Zelloberfläche. Es kann gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Signalkopplung die Wachstumszonen anregt und bei einer bestimmten Intensität der Stimuli, der Shmoo gebildet wird (Kapitel 6), ferner ist der Zeitpunkt der Shmoo-Bildung abhängig vom Zellvolumen und wird bei kleinen Zellen $< 2\mu\text{m}$ überhaupt nicht gebildet.

ABSTRACT

The simplicity of budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) make this species as one of the most popular model organism in cell biology research. Many essential processes like cell cycle, cell growth or cell division are similar to other, more complex eukaryotic cells. The study of those mechanism gives a better understanding of molecular processes in humans. This work is about the mating process in yeast. Yeast cells communicate via pheromones. The response to an extracellular pheromone-gradient is the orientation (polarization) and growth (deformation of the cell wall) of the cell. This work comes with something new: the simulation of the yeast mating process in a three dimensional environment. The basic research for this approach is already done and will be introduced in chapter 2. For the mating, reaction-diffusion equations have to be solved. This can be done by the DUNE-Framework, a numerical library that provide solutions for solving partial differential equations, based on the finite element method (FEM) (chapter 4 and 5). The deformation of the cell wall and the construction of the shmoo is already done by [13]. The cell-cell communication is realized by an adaption of the Gillespie SSA-algorithm (chapter 5). The signals follow a concentration gradient of active cdc42 molecules at the cell surface. It can be shown that the coupled signals are stimulating a growth-zone on each other surfaces (chapter 6). The shmoo is build after reaching a specific threshold of cdc42 concentration. This event depends on the cell volume. small cells which radius is $< 2\mu\text{m}$ have no shmoos.

INHALTSVERZEICHNIS

I	BIOLOGIE	1
1	HEFE ALS MODELLORGANISMUS	3
1.1	Lebenszyklus	3
1.2	Finden des Partners	4
1.3	Polarisierung der Zelle	5
1.4	Lokale Pheromonsekretion	6
1.5	Zellwanddeformation - Ausprägung des Shmoos . . .	8
1.6	Zusammenfassung	8
II	MODELLIERUNG	11
2	ANSÄTZE	13
2.1	Reaktion-Diffusionsmodelle	13
2.2	Modelle für Zell-Zell-Interaktion	14
2.3	Modelle für Zellwanddeformation	14
2.4	Ganzheitlicher Ansatz	15
3	ANALYSE	17
3.1	Diffusionsgleichungen	17
3.2	Das Pheromonsignal	18
3.3	Die Aktivierung von Cdc42	19
3.4	Der Cdc42-Pool	21
3.5	Die Pheromonantwort	23
3.6	Die Zell-Zell Kommunikation	23
4	DISKRETISIERUNG	25
4.1	Methodenüberblick	25
4.2	Die Finite Elemente Methode	26
4.3	Schwache Formulierung	27
III	SIMULATION	29
5	UMSETZUNG	31
5.1	Zellgitter	31
5.2	Positionierung der Zellen	32
5.3	Transporterbewegung	32
5.4	gerichtete Transporterbewegung	33
5.5	DUNE-Framework	34
5.5.1	Gitter	34
5.5.2	Ini-Datei	35
5.5.3	Vektor	35
5.5.4	Deformation	35
5.5.5	Zellgitter	36
5.5.6	Signalgitter	36
5.5.7	Problem	36
5.5.8	Löser	36

5.5.9	Evaluator	36
5.5.10	Kräftefeld	36
5.5.11	Driver	37
5.5.12	Output	37
6	ERGEBNISSE	39
6.1	Parameter	39
6.2	Signalkopplung	39
6.3	Konzentrationsprofil und Signalspur	40
6.4	Szenario variable Zellgröße	43
6.5	Szenario variable Gittergröße	45
6.6	Szenario Variable Menge an Cdc42 im Cytosol	46
7	DISKUSSION	49
7.0.1	Polarisierung	49
7.0.2	Signalbewegung	50
7.0.3	Deformation	51
8	AUSBLICK	53
	LITERATUR	55

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC-Transporter	ATP-Binding Cassette Transporter
ALU-Grid	Adaptive Loadbalancing Unstructured-Grid
API	Application Programming Interface
CSV	Comma-Separated Values
FEM	Finite Element Map
GAP	GTPase Activating Protein - GTPase Aktivierendes Protein
GEF	Guanin Exchange Factor - Guanin Austausch Faktor
MAT	Mating ZellTyp
MSD	Mean Square Displacement
SSA	Stochastic Simulation Algorithm
STD	Standard Template Library
UML	Unified Modeling Language
VTK	Visualization Toolkit
WP	Wave Pinning

Teil I

BIOLOGIE

Die Modellierung des Signalwegs bei der Paarung von haploiden Hefezellen ist Gegenstand dieser Arbeit. In diesem Abschnitt wird erläutert welche biologischen Prozesse dabei in Gang gesetzt werden und welche Protagonisten eine Schlüsselrolle einnehmen.

HEFE ALS MODELLORGANISMUS

LEBENSZYKLUS

Hefen sind in der Abteilung der echten Pilze anzusiedeln. Allen Hefen gemein ist die ungeschlechtliche Vermehrung. Bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt die ungeschlechtliche Vermehrung über Sprossung oder Knospung. Die Bäckerhefe gehört zu den Hefen die sich auch geschlechtlich fortpflanzen können. Das geschieht meist unter ungünstigen Umweltbedingungen, wie z.B. Nährstoffmangel. Dabei wird aus der vegetativen Zelle ein Ascus gebildet, der dann durch meiotische Zellteilung der Zygote vier haploide Ascosporen enthält. Beim Aufbrechen des Ascus kopulieren 2 Sporen miteinander und bilden erneut eine Zygote. Die Kopulation findet in der Regel zwischen unterschiedlichen haploiden Zelltypen statt: Zwischen den sogenannten MATa- und MAT α Zellen (Ausnahmen wurden untersucht von Huberman et al. [19]). Die einzelnen Phasen der Vermehrung und die Schaltvorgänge zwischen den Phasen sind in Abbildung 1 illustriert.

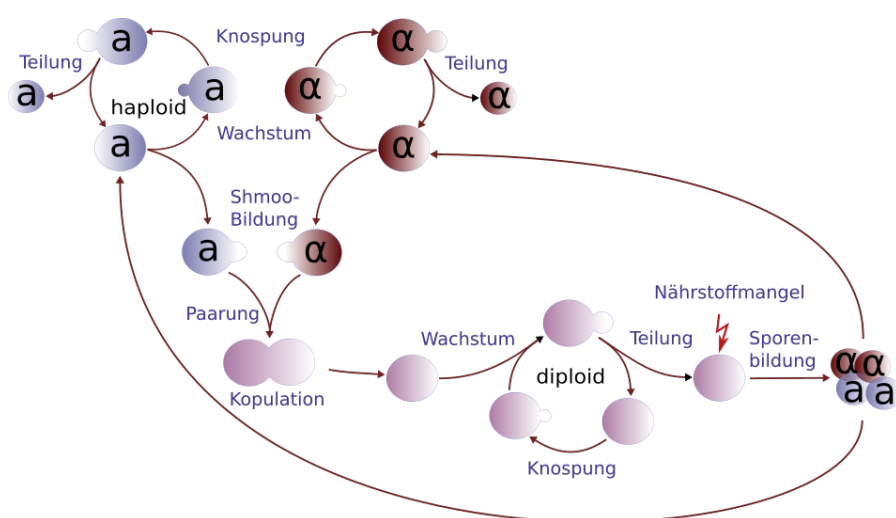


Abbildung 1: Lebenszyklus von *Saccharomyces cerevisiae*.

Vor der Paarung entsteht an einer bestimmten Stelle der Zellwand durch Materialeinbau ein Fortsatz. Durch die charakteristische Form dieser Deformation wird die Zelle in dieser Phase auch *Shmoo* genannt [5]. Begegnen sich die Shmoos einer MATa- und einer MAT α -Zelle, so kommt es zur Verschmelzung beider Zellen.

HINWEIS: Der Paarungs-Prozess über die Shmoo-Bildung bis hin zur Kopulation ist in dieser Arbeit von besonderem Interesse.

FINDEN DES PARTNERS

Die Suche nach einem geeigneten Paarungs-Partner wird über die Ausschüttung von Pheromonen vermittelt. Dabei geben MAT α -Zellen α -Faktor in den extrazellulären Raum ab, die von MAT a Zellen erkannt werden können und umgekehrt. Hefezellen praktizieren keine aktive Zellmigration. Die Suche nach einem Paarungs-Partner via Chemotaxis entfällt daher. Das Suchgebiet beschränkt sich auf die unmittelbare Umgebung einer Zelle. Das Wachstum des Shmoos erfolgt dann in Richtung des höchsten Pheromongradienten (siehe auch Abbildung 2a). In einer größeren Population von haploiden Hefezellen überlagern sich die Pheromongradienten, wodurch das Pheromonsignal mehrdeutig sein kann (Abbildung 2b). Diesem Widerspruch kann die MAT a -Zelle über die Sekretion einer Protease namens Bar1 begegnen. Bar1 baut α -Faktor um die MAT a -Zelle herum ab. Das erscheint auf dem ersten Blick paradox, da die Zelle auf eben dieses Signal angewiesen ist, es erweist sich aber als hilfreich. Nach einer gewissen Zeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen sekretierten und degradierten α -Faktor ein. Übrig bleiben Pheromongradienten die um die MAT α -Zellen herum schärfer abgegrenzt sind. Diese wirken umso stärker auf die MAT a -Zelle ein, je näher sich die MAT α -Zellen im Bereich der MAT a -Zelle befindet. Durch den Ausstoß von Bar1 werden also die Pheromonsignale gefiltert und erleichtern die Auswahl des Partners für die Paarung.

Bisher wurde nur vom Abbau von α -Faktor durch Bar1 gesprochen.

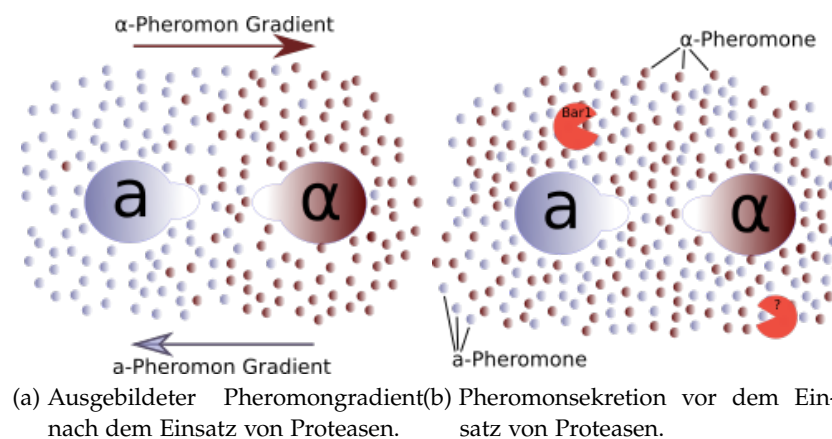


Abbildung 2: Entstehung der Pheromongradienten durch extrazelluläre Proteasen.

Wie sieht es mit dem Abbau von a -Faktor seitens der MAT α -Zellen aus?. In der Tat gibt es bisher noch wenige Aussagen darüber. Ein

Kandidat ist das Protein Afb1, wie aus der Arbeit von Huberman und Murray[19] hervorgeht. Allerdings wirkt Afb1 nicht als Protease, vielmehr bindet und blockiert es a-Faktor. In [19] geht man dennoch davon aus, dass die biologische Wirkung der von Bar1 entspricht. Für die Modellierung wird davon ausgegangen, dass die MAT α -Zelle ebenfalls ein Protein in den extrazellulären Raum sekretiert, welches a-Faktor abbaut.

HINWEIS: Die Annahme, dass auch a-Faktor durch ein Protein abgebaut wird ist Ausgangsbasis für die spätere Modellierung in Kapitel 3.

POLARISIERUNG DER ZELLE

Die Polarisierung der Zelle beschreibt deren räumliche Ausrichtung bezüglich einer Funktionalität (z.B. Sekretion von Signalmolekülen) oder einer Strukturveränderung (z.B. Wachstum oder Migration). Bei haploiden Hefezellen bedeutet das die Einrichtung einer Knospungs- oder Shmoo-Zone. Im weiteren Verlauf wird die Region in der der Shmoo ausgebildet wird auch *Wachstumszone* genannt.

Der Shmoo wird ausschließlich über externe Signale angeregt und kann in der Knospungs-Zone oder an einer anderen Stelle der Zellmembran erfolgen. Dabei wird die Position der Shmoo-Region über einen Pheromongradienten im extrazellulären Raum bestimmt. Reguliert wird die Polarisierung von Cdc42, welches in der Zellmembran verankert, aber auch frei im Cytosol anzutreffen ist. Dabei entscheidet die lokale Konzentration von aktiven Cdc42 Molekülen an der Zellmembran über die Bildung einer Wachstumszone. Bei Bindung von a- bzw. α -Faktor an den Pheromonrezeptor Ste2 (respektive an Ste3), löst sich die G $\beta\gamma$ -Einheit von der α -Untereinheit des Rezeptors. Die G β -Einheit dient als Effektor für die Signaltransduktion. Sie bindet und aktiviert den Guanin-Austauschfaktor Cdc24 (GEF) und dieser aktiviert Cdc42.

HINWEIS: Die direkte Kopplung zwischen gesättigten Pheromonrezeptoren und aktivierten Cdc42 in der Zellmembran und der schnelle Übertragungsweg von Signalen über G-Proteine lassen eine deutliche vereinfachte Sichtweise hinsichtlich der Modellierung der Wachstumszone zu.

Die Qualität des Pheromonsignals spielt bei der Polarisierung eine untergeordnete Rolle. Aktivierte Cdc42 Proteine verstärken sich selbst, in dem sie:

- zusätzliche Cdc42-Moleküle aus dem Cytosol rekrutieren
- sich selbst aktivieren durch eine positive Feedbackschleife

Dabei ist zu erwähnen, dass der Cdc42-Pool im Cytosol begrenzt ist. Auf diese Weise bleiben die Wachstumszonen stabil, wenn sie es einmal geschafft haben sich zu etablieren. Neu entstehende Zonen haben es dann schwerer Cdc42-Moleküle zu rekrutieren. Für dichte Zellpopulationen, in denen um die betreffende Zelle herum- trotz Pheromondegradation mittels Bar1 - keine klaren Signalgradienten auszumachen sind, eine wichtige Eigenschaft.

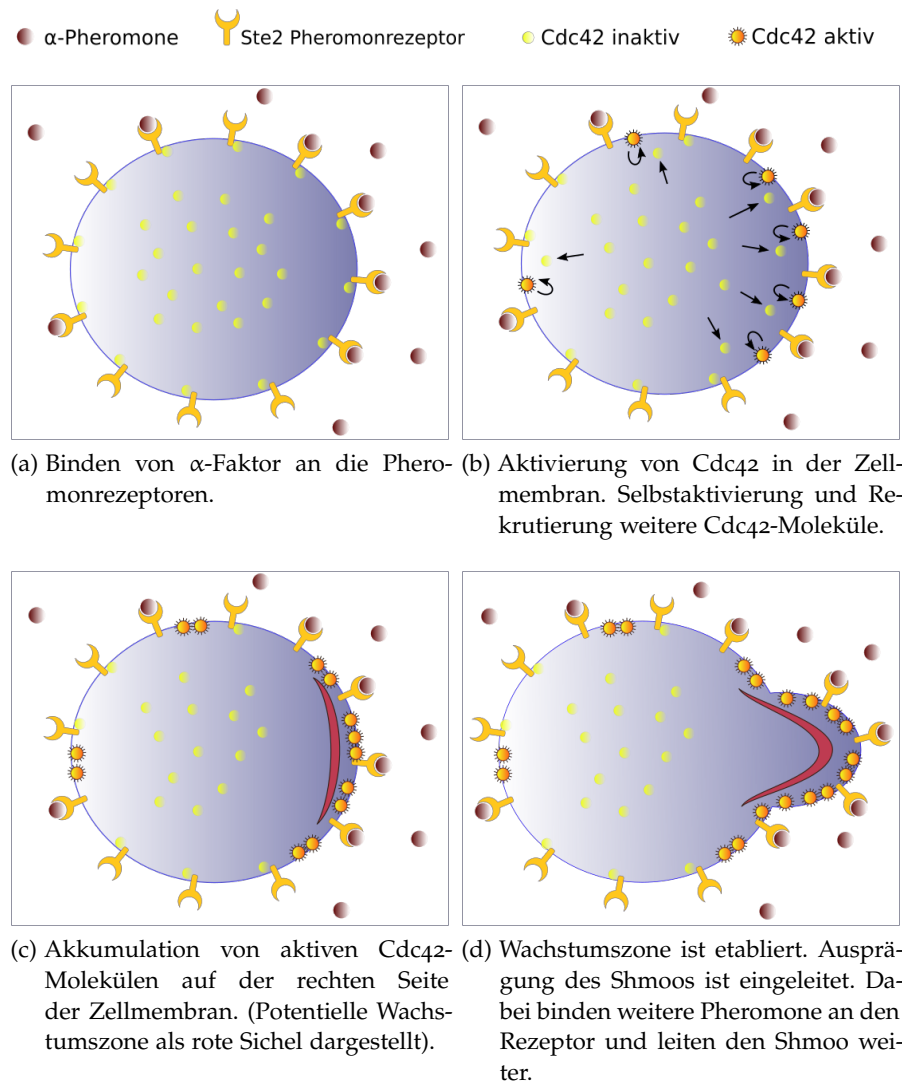


Abbildung 3: Ablauf der Polarisierung einer MATa-Zelle vom Typ *Saccharomyces cerevisiae* entlang eines Gradienten von α -Faktoren.

LOKALE PHEROMONSEKRETION

Bei der Polarisierung der Zellmembran (Kapitel 1.3) wurden die Signalwege untersucht, die bei der Antwort auf externe Pheromonsignale aktiviert werden. Wie aber entlässt die Zelle eigene Pheromone

in den extrazellulären Raum? Das wird von den MATa- und MAT α -Zellen unterschiedlich geregelt [26]. MATa-Zellen besitzen membranständige ABC-Transporterproteine. Sie gehören zu der Gruppe der aktiven Transporter. Die Aktivierung und Freisetzung von α -Faktor erfolgt durch Bindung von ATP auf der cytosolischen Seite des Transporters. MAT α -Zellen dagegen setzen auf den intrazellulären Vesikeltransport [26]. Bei der Exozytose wird α -Faktor in den extrazellulären Raum sekretiert (Abbildung 4). In früheren Untersuchungen ging man davon aus, dass die freigesetzten Pheromone um die Zelle herum gleichmässig verteilt sind [3]. Neuere Beobachtungen bei der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* unterstützen eine andere Vermutung [25],[14], nämlich dass die Freisetzung der Pheromone lokal begrenzt ist und zwar dort, wo die Zelle polarisiert ist, sich also die Wachstumszone befindet. Die Polarisierung kann sich jederzeit ändern, wenn sich der Pheromongradient außerhalb der Zelle verschiebt: die Wachstumszone wandert. Damit wandert auch das lokale Pheromonsignal auf der Zellmembran. Bei den MATa-Zellen lässt sich diese "Wanderung" durch laterale Diffusion der Transporterproteine erklären.

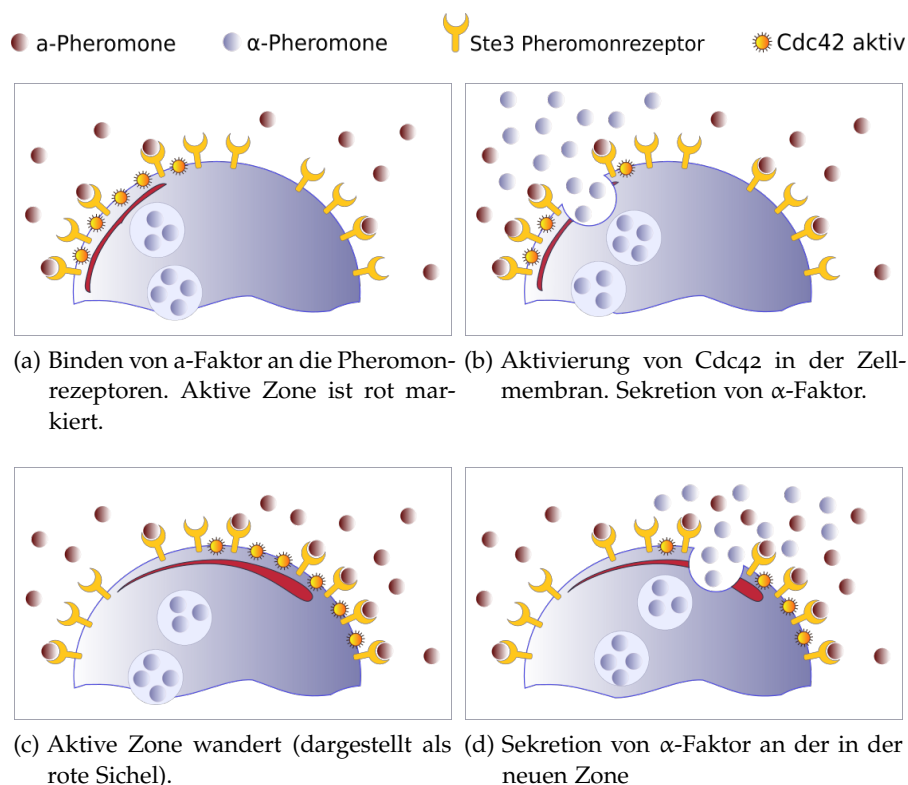


Abbildung 4: Bewegung des Pheromonsignals auf der MAT α -Zelle über die lokale Sekretion von α -Faktor in der Polarisationszone.

Bei den MAT α -Zellen könnte die Bewegung des Signals durch die unterschiedlichen Strukturen der Zellmembran hervorgerufen sein. Um die Wachstumszone herum sind Zellmembran und Zellwand auf-

geweicht und somit durchlässiger, was die Exozytose an dieser Stelle erleichtert. Die Bildfolge in Abbildung 4 zeigt die mögliche Bewegung des Pheromon-Signals auf der MAT α -Zelle.

HINWEIS: Zur Vereinfachung wird sowohl bei MAT α - als auch bei MAT α -Zellen eine zielgerichtete laterale Diffusion der Pheromon-Signalquellen als Basis für die Modellierung des Signalwegs angenommen.

ZELLWANDDEFORMATION - AUSPRÄGUNG DES SHMOOS

Aktivierte Cdc42 Proteine bestimmen nicht nur die Wachstumszone, sie stoßen auch eine MAP-Kinase-Kaskade an, an deren Ende die Aktinpolymerisation steht und die Genexpression von Material für die Zellwanddeformation über den Transkriptionsfaktor Ste12. Der detaillierte Ablauf dieser Prozesse wird hier nicht näher untersucht. Im vorigen Kapitel wurde erwähnt, dass für die Polarisierung die Stärke des Pheromonsignals und somit die Konzentration aktivierter Cdc42-Moleküle auf der Zellmembran eine untergeordnete Rolle spielt. Das gilt nicht für die Aktinpolymerisation und die Materialbeschaffung für die Zellwand. Diese unterliegen auch natürlichen Abbauprozessen. Hier muss ein bestimmter Schwellwert aktivierter Cdc42-Moleküle erreicht sein, damit das Aufbau/Abbau Verhältnis bei der Aktinpolymerisation des Zytoskeletts und die Materialbeschaffung zugunsten der Shmoo-Entstehung kippt.

HINWEIS: Die Ausrichtung der Wachstumszone geschieht sehr schnell. Zu welchem Zeitpunkt der Shmoo ausgebildet wird hängt von vielen biologischen Faktoren ab. Zur Vereinfachung für das Modell wird nur der Schwellwert der Konzentration aktiver Cdc42-Moleküle in der Zellmembran herangezogen, welcher die Zellwanddeformation auslöst.

ZUSAMMENFASSUNG

Cdc42 ist der Hauptregulator der Zellpaarung. Wann und wo ein Shmoo ausgebildet wird hängt ausschließlich von Ort und Konzentration aktiver Cdc42-Proteine an der Zellmembran ab. Die Signalkaskade, welche über aktive Cdc42-Moleküle angestoßen wird, entscheidet über den Zeitpunkt der Zelldeformation an der Wachstumszone und wird ebenfalls vom Aktivitätsgrad der Cdc42-Moleküle beeinflusst. Kurz:

- Die Wachstumszone wird durch die Mehrheit von aktiven Cdc42 an der Zellmembran bestimmt.
- Der Shmoo wird von einer ganz bestimmten Anzahl an aktiven Cdc42 in der Wachstumszone getriggert.

Der zweite Protagonist ist das Pheromonsignal. Wie schnell die Rezeptoren auf der Zelloberfläche a- und α -Faktor binden können, hängt von der Anzahl der Pheromone im extrazellulären Raum ab und diese ist abhängig von der Entfernung der Pheromonquelle und damit abhängig vom Abstand der Zellen untereinander [29].

Teil II

MODELLIERUNG

Nach dem die Hauptakteure im Paarungs-Prozess bekannt sind, kann die Modellierung beginnen. Dieser Abschnitt ist in mehreren Kapitel unterteilt. Im zweiten Kapitel werden zunächst verschiedene Modellierungsansätze betrachtet und einige, bereits existierende Publikationen aus den jeweiligen Bereichen vorgestellt. Im dritten Kapitel erfolgt die mathematische Analyse des Modells, das mit dieser Arbeit angestrebt wird. Das vierte Kapitel ist der numerischen Methode geschuldet, die bei der programmiertechnischen Realisierung Anwendung findet. Hierfür muss das Problem aus dem dritten Kapitel diskretisiert werden.

ANSÄTZE

REAKTION-DIFFUSIONSMODELLE

Um Signaltransduktion und die damit verbundenen molekularen Bewegungen mathematisch beschreiben zu können verwendet man häufig Reaktion-Diffusionsgleichungen, welche die Konzentrationsverläufe von Spezies in Abhängigkeit von Ort und Zeit angeben. Wenn es allgemein um die Polarisierung von Zellmembranen geht, haben sich 2 unterschiedliche Modellierungsansätze herauskristallisiert, die von Wissenschaftlern zu gleichen Teilen favorisiert werden.

Der erste Ansatz ist das Wave Pinning Modell (WP) das insbesondere an der University of British Columbia in Vancouver, Canada intensiv untersucht wurde [27]. In dieser Annahme geht man von einem bistabilen System zweier Spezies mit unterschiedlichen Kinetiken aus. Durch einen oder mehrerer externer Stimuli lässt sich dieses System in einen monostabilen Zustand überführen. 3 Bedingungen müssen für WP erfüllt sein:

1. Massenerhaltung.
2. Gleichverteilung von inaktiven Spezies im Cytosol.
3. Spezies im Cytosol diffundieren schneller als aktive Spezies an der Zellmembran.

Ein anderer Modellansatz basiert auf einem Turing Mechanismus [15]. Dieser Ansatz geht von der umgekehrten Annahme aus, dass sich das System aus aktiven und inaktiven Spezies zu Beginn einer externen Stimulation im Gleichgewicht befindet (ein stabiler stationärer Zustand) und erst durch den Stimulus kippt (geht in einen Grenzzyklus über). Dieses Verhalten bezeichnet man auch bei der Analyse von nicht linearen Differentialgleichungen als Turing- oder Hopf-Bifurkation¹.

Je nach System geht man von folgende biologischen Annahmen aus:

- WP: Die Polarisation der Zellmembran kann spontan und an einer beliebigen Stelle erfolgen. Ein externer Stimulus, wie z.B. die Bindung von Pheromonen an den Rezeptor stimuliert die Wachstumszone in der entsprechenden Region.
- Turing: Ein externer Stimulus löst einen Symmetriebruch aus. Dadurch kann die Polarisierung der Zelle erfolgen. Im Unterschied zum WP-Modell reicht eine kleine Störung. Allerdings

¹ <http://www.alexanderrack.eu/bifurkation/7.Hopf.html>

verändert sich nach der Polarisierung die Wachstumszone nur geringfügig, bei sich veränderten Gradienten.

Die Beschreibung im biologischen Teil (Kapitel 1) hat es schon vorweggenommen: Im Paarungs-Prozess geht es um zielgerichtetes Aufeinanderzuwachsen von MAT α - und MAT α -Zellen. Eine stabile Wachstumszone, die sich nach einem Pheromongradienten ausrichtet ist essentiell. Die WP-Methode scheint daher am geeignetsten.

MODELLE FÜR ZELL-ZELL-INTERAKTION

Es existiert eine große Anzahl von mathematischen Modellen, die sich mit Signaltransduktion und Polarisierung von Zellen befassen [27],[28],[12],[2],[21]. Diese Modelle stehen meistens für sich und treten nicht mit anderen benachbarten Zellen in Verbindung.

Echte Zell-Zell Interaktionsmodelle, welche über die Signale gekoppelt sind und deren Zellen eine räumliche Ausdehnung beschreiben, sind aufgrund des hohen Aufwands und Komplexität bisher kaum anzutreffen. Eine der ersten bedeutsamen Arbeiten über Signalgekoppelte Zellen wurde von Weitao Chen et al.[6] publiziert. Hier wird ein Framework vorgestellt, das die Kommunikation von Hefezellen während des Paarungs-Prozesses innerhalb einer größeren Zellpopulation zulässt. Der dadurch verbundene numerische Aufwand lässt allerdings nur eine geringe Anzahl von Zellen für die Simulation zu.

MODELLE FÜR ZELLWANDDEFORMATION

Auf dem Gebiet der räumlichen Modellierung von Zellen und Zellstrukturen in 3D sind schon einige Erfahrungen gemacht worden. So existieren beispielsweise Modelle für die Chemotaxis und die damit verbundene Zellmigration [9], Modelle von wachsenden pflanzlichem Gewebe am Beispiel von Blütenknospen [4] bis hin zu detailgetreuen Modellen von Lipid-Schichten, inklusive Struktur und Interaktion der membranständigen Proteine [10].

Modelle die physikalische Eigenschaften von Zellmembranen hinsichtlich des Zellwachstums beschreiben sind schon etwas rarer gesät. So ist die mathematische Modellierung der Dehnungs- und Krümmungsenergie von Zellmembranen [16] Gegenstand der aktuellen Forschung. Eine Kombination von beiden Eigenschaften ist hier [9] zu finden. Für die Hefezellen ist die Zellwand ausschlaggebend, welche um ein vielfaches dicker ist als die Zellmembran. Dort findet elastische und irreversible plastische Verformungen statt. Eine ausführliche Arbeit über die Elastizität und Verformung von Hefezellen während der Ausbildung eines Shmoos wurde von Goldenbogen et al.[13] vorgelegt.

GANZHEITLICHER ANSATZ

Motiviert durch die Arbeit von Goldenbogen et al.[13] wird mit dieser Masterarbeit der Versuch unternommen ein ganzheitliches Modell zu entwerfen, dass sowohl die wesentlichen biologischen Aspekte der Kommunikation und Polarisation von Zellen berücksichtigt, als auch die physikalischen Eigenschaften der Zellwand bei der Ausbildung des Shmoos ins Spiel bringt und dabei Methoden verwendet, die es einfacher machen dynamische Veränderungen von Zellstrukturen in einem dreidimensionalen Raum zu simulieren. Zunächst reduziert auf die Paarung zweier Hefezellen wird in zukünftigen Projekten, der Aufbau eines Simulations-Frameworks für die Zell-Zell Kommunikation in einem größeren Zellverbund angestrebt. Wie bereits erwähnt können die Simulationszeiten für große Zellpopulationen sehr hohe Dimensionen annehmen. Für die Realisierung des Projekts fällt die Wahl auf das DUNE-Framework², welches in C++ geschrieben wurde und auch paralleles Rechnen unterstützt.

² <https://dune-project.org/>

ANALYSE

Für das Modell müssen pro Zelle 2 partielle Differentialgleichungen gelöst werden:

1. die Verteilung aktiver Cdc42-Proteine auf der Zellmembran über die Zeit im 2D-Raum
2. die Verteilung der Pheromone in der extrazellulären Umgebung über die Zeit im 3D-Raum

HINWEIS: Die Spezies *Saccharomyces cerevisiae* besitzt sowohl eine Zellmembran, als auch eine Zellwand. Die Zellwand dient als Schutzhülle und Druckbehälter für osmotische Schwankungen. Zellmembran und Zellwand sind dreidimensionale Objekte mit unterschiedlicher struktureller Ausprägung. Für die folgenden Betrachtungen werden die geometrischen Strukturen ignoriert. Zellmembran und Zellwand werden als eine Einheit betrachtet und als eine zweidimensionale Oberfläche angesehen. Die biologischen Eigenschaften wie Permeabilität und laterale Diffusion werden beibehalten. Ab jetzt wird immer von Konzentrationen auf der *Zelloberfläche* gesprochen.

DIFFUSIONSGLEICHUNGEN

Die Basis für die Verteilung aktiver Cdc42-Proteine auf der Zelloberfläche liefert die allgemeine Diffusionsgleichung inklusive eines Reaktionsterms, wie sie für viele Reaktions-Diffusionsmodelle Verwendung findet:

$$u_t - D_m \Delta u + R(u) = f, \quad f: \Omega \rightarrow \mathbb{R} \quad (1)$$

Wobei die Lösung u die Konzentration von aktiven Cdc42-Molekülen auf der Zelloberfläche beschreibt. D_m ist die laterale Diffusion von Cdc42 auf der Zelloberfläche. Der Reaktionsterm $R(u)$ fasst alles zusammen, was die Konzentration von Cdc42 maßgeblich beeinflusst. Darum wird es in den folgenden Abschnitten gehen.

DAS PHEROMONSIGNAL

Für das Pheromonsignal muss die inhomogene Diffusionsgleichung gelöst werden:

$$p_t - D_s \Delta p = s \quad (2)$$

mit s als Pheromonquelle, D_s als Diffusionskonstante für α - und α -Faktor und k_B als Kinetik für die Pheromondegradation katalysiert durch Proteasen. Laut Kapitel 1.2 stellt sich durch den Abbau der Pheromone durch Proteasen ein Gleichgewicht zwischen sekretierten und degradierten Pheromonen ein. Dieser stationäre Zustand führt dazu, dass für die Modellierung des Signals der Zeitterm gegen null geht und somit entfällt.

Überlegungen zum stationären Zustand lassen weitere Vereinfachungen zu, wenn man die Signalquelle als elektrostatische Punktquelle im Raum betrachtet [3]. Damit ist s auf einen unendlich kleinen Punkt im Raum reduziert. Man erhält die Poisson-Gleichung

$$-D_s \Delta p = 0 \quad (3)$$

Die Ausdehnung im Raum ist unendlich. Die Pheromonkonzentration im Unendlichen ist Null. Die Lösung dieser Gleichung - durch Anwendung der Greenschen Formel für Poisson-Gleichung im 3D-Raum - ist:

$$p = \frac{1}{4\pi r} \quad \lim_{r \rightarrow \infty} p(r) = 0 \quad (4)$$

Wobei sich r ergibt aus

$$r = \sqrt{(x - x_s)^2 + (y - y_s)^2 + (z - z_s)^2} \quad (5)$$

(x_s, y_s, z_s) ist die Position der Signalquelle, (x, y, z) beschreibt einen Punkt auf der Zelloberfläche in globalen Koordinaten. Der Ausdruck $\frac{1}{4\pi}$ aus 4 wird als k_α für die Signalstärke zusammengefasst. Die Lösung von 4 ergibt dann

$$\frac{k_\alpha}{r} \quad (6)$$

In der Lösung (6) wird über den stationären Zustand die Rolle der Proteasen berücksichtigt, aber noch nicht deren Wirkung. Die Pheromondegradation erfolgt über die Kinetik

$$k_{pDeg} p$$

Analog zur Annahme einer elektrostatischen Punktquelle im Raum schließt Barkai et al. [3] beim Abbau der Pheromone auf den Effekt

der Dämpfung von elektrischen Feldern¹. Dabei wird in Gleichung (3) eine konstante λ als Dämpfungsmaß eingeführt.

$$-D_s [\Delta - \lambda^2] p = 0 \quad (7)$$

Mit $\lambda^2 = k_{pDeg}$ und $k_{pDeg} = \frac{D_s}{k_B}$ ergibt die Lösung von (7) das Signal f aus Gleichung (1)

$$f = \frac{k_\alpha}{r} \cdot e^{-\frac{r}{\sqrt{\frac{D_s}{k_B}}}} \quad (8)$$

Die Abbildung 5 veranschaulicht die Signaleinwirkung einer Pheromonesekretierenden MAT α -Zelle auf die MAT α -Zelle.

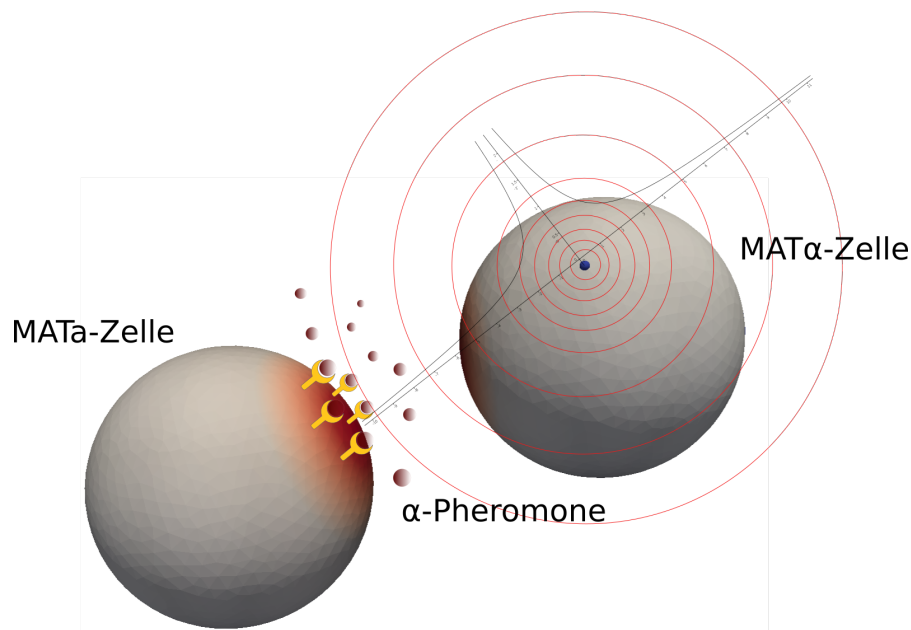


Abbildung 5: Radialsymmetrische Ausbreitung des Pheromonsignals auf der MAT α -Zelle (dargestellt durch einen blauen Punkt). Der Abstand der konzentrischen Kreise illustriert den abfallenden Gradienten in Richtung MAT α -Zelle.

DIE AKTIVIERUNG VON CDC42

An der Aktivierung von Cdc42 sind mehrere Reaktionen beteiligt (siehe auch Kapitel 1.2)

- Selbstverstärkung (Autoaktivierung) durch Aktivierung von GEF
- Rekrutierung von cytosolischen Cdc42 durch GEF
- Deaktivierung von aktiven Cdc42 durch GAP

¹ http://www.thefullwiki.org/Screened_Poisson_equation

Gesucht sind die entsprechenden Kinetiken für die Modellierung. Im Zentrum steht hier die Auto-Aktivierung über GEF. Der Parameter hierfür ist k . Des weiteren gibt es die basale Aktivierung von Cdc42 (Rekrutierung aus dem Cytosol) ohne Stimulus. Dieser Parameter wird mit k_0 angegeben. Zu guter Letzt unterliegt Cdc42 auch dem Abbau und dem damit verbundenen Rücktransport ins Cytosol. Die Abbaurrate wird mit η angegeben (Siehe auch Abbildung 6). Die laterale Diffusion (D_m im Bild 6) entspricht der Diffusionskonstante in der Grundgleichung 1.

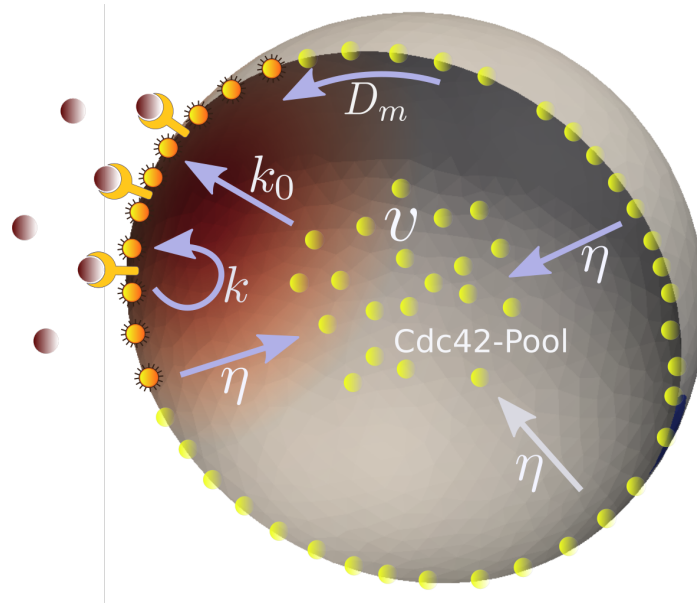


Abbildung 6: Schnitt durch eine Hefezelle: Cdc42 ist sowohl im Cytosol (Pool) als auch verteilt an der Zelloberfläche anzutreffen. Die Menge von cytosolischen Cdc42 entspricht der Anfangskonzentration v_0 . Die Konzentration v kann ansteigen, wenn nicht aktivierte Cdc42-Moleküle von der Zelloberfläche (auf der rechten Seite im Bild) in das Cytosol wandern. Dadurch steht mehr Cdc42 für die Aktivierungsstelle auf der linken Seite zur Verfügung.

Der Zusammenhang dieser Kinetiken lässt sich wie folgt beschreiben:

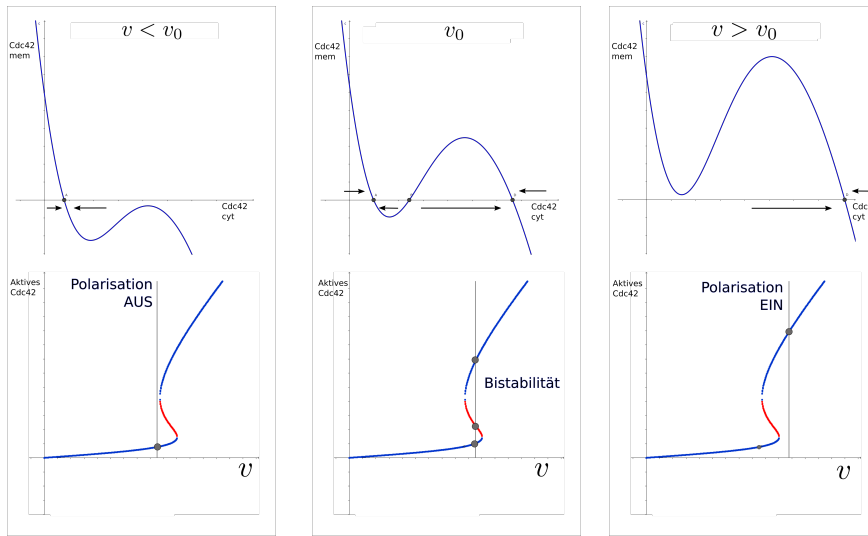
$$k_0 + \frac{ku^2}{k_m^2 + u^2} - \eta u \quad (9)$$

Der WP-Ansatz geht hier von einer Bistabilität für eine Cdc42- Konzentration v_0 im Cytosol aus. Ein Anstieg dieser Konzentration, hervorgerufen durch das Abwandern von Cdc42 von der Zelloberfläche ins Cytosol, erhöht v und überführt das System in einen stabilen Zustand, da mehr Cdc42 für die Aktivierung zur Verfügung steht. Diese Aktivierung läuft wesentlich schneller ab als die Deaktivierung (siehe auch Bedingung für das WP-Modell in 2.1). Die Gleichung 9 wird

mit dem zusätzlichen Verstärkungsfaktor v für die Aktivierung von Cdc42 ergänzt.

$$v \cdot \left[k_0 + \frac{ku^2}{K_m^2 + u^2} \right] - \eta u \quad (10)$$

Die Bedeutung von v für die Aktivierung von Cdc42 zeigt auch Abbildung 7. Die Schnittpunkte der Nullkline im Phasenplot von cytosolischem Cdc42 und aktiven Cdc42 an der Zelloberfläche ergeben für ein bestimmtes v_0 drei Fixpunkte, von denen zwei stabil und einer instabil ist. Eine Änderung von v bewirkt die Reduzierung auf einen stabilen Fixpunkt.



- (a) $v < v_0$: ein stabiler Fixpunkt. Lokale Konzentration von Cdc42 auf der Zelloberfläche ist niedrig.
- (b) v_0 : Bistabiler Zustand, drei Fixpunkte. Position der Wachstumszone kann sich ändern.
- (c) $v > v_0$: ein stabiler Fixpunkt. Lokale Konzentration von Cdc42 auf der Zelloberfläche ist hoch.

Abbildung 7: Bifurkationsanalyse von v

HINWEIS: Bei konstanten v_0 zu Beginn der Simulation (Abbildung 7b) wird das System vom Anstieg der Pheromonrezeptor-Aktivität, also über $u(x, t)$ in einen stabilen Zustand überführt.

DER CDC42-POOL

Gemäß dem WP-Modell(2.1) ist die Anzahl der Cdc42 Moleküle konstant, wenn das Volumen konstant bleibt. Das heißt, es tritt nach einer bestimmten Zeit eine Sättigung von Cdc42 auf der Zelloberfläche ein. Die Konzentration von Cdc42 darf dann nicht mehr oder nur unwesentlich ansteigen. Laut [12] geht man von einer maximalen Anzahl

von 1000 inaktiven Cdc42 im Cytosol aus, bei einem Zelldurchmesser von 5 μm . Daraus berechnet sich das Referenzvolumen

$$V_{\text{ref}} = \frac{4}{3}\pi \cdot r^3 \quad (11)$$

nach der Formel für das Kugelvolumen.

Bei der Ausbildung des Shmoos ändert sich das Volumen und es wird mehr cytosolisches Cdc42 zur Verfügung gestellt. Durch die komplexe, gekrümmte Form, die eine deformierte Zelle darstellt, wird das neue, veränderte Volumen V_{act} über den Gaußschen Integralsatz bestimmt.

$$V_{\text{act}} = \oint \vec{x} \cdot \vec{n} \cdot dA \quad (12)$$

\vec{x} zeigt auf einen Punkt auf der Zelloberfläche, \vec{n} ist die Flächennormale und A die Fläche der Tangentialebenen, um den Punkt \vec{x} , wobei man später sieht, dass A die Fläche eines Gitterelements ist (Kapitel 5). Die Beziehung zwischen den Volumina V_{ref} und V_{act} veranschaulicht Abbildung 8.

Es wird eine proportionale Änderung von Cdc42 zum Volumen angenommen, so dass sich folgende Relation ergibt:

$$N_{\text{Cdc42}} = \frac{V_{\text{act}}}{V_{\text{ref}}} \cdot h_{\text{vol}} \quad (13)$$

mit $h_{\text{vol}} = 1000$. Gemäß nach (13) geht man bei der Simulation von kleineren Zellen von einer geringeren Anzahl an Cdc42 aus. Ein weite-

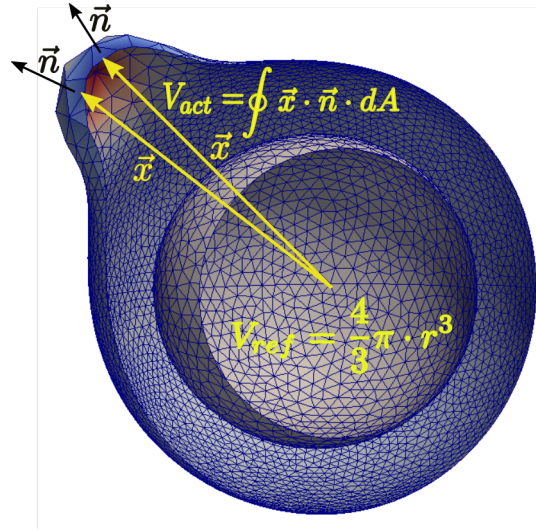


Abbildung 8: Berechnung der Volumina V_{ref} und V_{act} .

rer Parameter h_{mem} bestimmt die Anzahl bereits aktivierter Cdc42-Moleküle an der Zelloberfläche. Ist das Verhältnis

$$h = \frac{h_{\text{mem}}}{h_{\text{vol}}} = 1 \quad (14)$$

dann befindet sich kein Cdc42 mehr im Cytosol und die Cdc42-Aktivierung wird inhibiert. Um diesen Effekt zu erzielen erhalten alle Aktivierungsterme der Gleichung (10) den zusätzlichen Faktor $(1-h)$:

$$(1-h) \cdot \left[vk_0 + v \frac{ku^2}{K_m^2 + u^2} - \eta u \right] \quad (15)$$

für die intrazelluläre Aktivierung und Gleichung (8)

$$(1-h) \cdot \left[\frac{k_\alpha}{r} \cdot e^{-\frac{r}{\sqrt{\frac{D_s}{k_B}}}} \right] \quad (16)$$

für die extrazelluläre Aktivierung.

DIE PHEROMONANTWORT

Zusammenfassend ergibt sich für die Pheromonantwort und somit für die Verteilung aktiver Cdc42-Moleküle auf der Zelloberfläche nach (1) die Gleichung:

$$u_t - \underbrace{D_m \Delta u}_{\text{Diffusion}} + \underbrace{(1-h)}_{\text{Pool}} \cdot \underbrace{\left[vk_0 + v \frac{ku^2}{K_m^2 + u^2} - \eta u \right]}_{\text{Cdc42-Aktivierung}} = \underbrace{(1-h)}_{\text{Pool}} \cdot \underbrace{\left[\frac{k_\alpha}{r} \cdot e^{-\frac{r}{\sqrt{\frac{D_s}{k_B}}}} \right]}_{\text{Signal}} \quad (17)$$

Zu lösen für die MATa- und MAT α Zelle.

DIE ZELL-ZELL KOMMUNIKATION

Die Gleichungen (17) der MATa- und MAT α -Zellen sind gekoppelt. Die Kopplung erfolgt über die Diffusion der Pheromonsignal-Transporter auf den Zelloberflächen. Diese bewegen sich in Richtung der höchsten Konzentration aktiver Cdc42-Moleküle auf der Zelloberfläche (Kapitel 1.4).

Diese Diffusion auf komplexen Zelloberflächen zu beschreiben ist nicht trivial [11]. Prinzipiell ist stochastischer Reaktion-Diffusionsprozess zu simulieren. Vereinfacht betrachtet bewegt sich die Signalquelle auf dem Cdc42-Konzentrationsgradienten auf der Zelloberfläche, plus einer Brownschen Bewegung, die mit einer zufälligen Richtung und Wegstrecke die Bewegungsrichtung umlenkt. Beispielhaft für die MATa-Zelle ist das die Gleichung

$$\frac{\delta}{\delta t} p_a(t) = \rho(t) + \nabla u_a(p_a(t), t) = G(\rho(t), \nabla u_a(p_a(t), t)) \quad (18)$$

Mit p_a als Position auf der Zelloberfläche, $\rho(t)$ als stochastischen Term. ∇u_a ist der Konzentrationsgradient auf der Zelloberfläche. Die Position im nächsten Zeitschritt kann dann über das explizite Euler-Verfahren [18] bestimmt werden.

$$p_a(t + \Delta t) = p_a(t) + \Delta t G(\rho, \nabla u_a(p_a(t), t)) \quad (19)$$

DISKRETISIERUNG

METHODENÜBERBLICK

Analytische Lösungen sind nur für ganz bestimmte, wenige PDEs zu finden, die spezifische Anfangs- und Randbedingungen aufweisen. Für beliebige Randbedingungen ist es fast unmöglich. Die allgemeine Vorgehensweise besteht in der Aufteilung eines komplexen Problems in einfache Teilprobleme. Für die Teilprobleme wählt man dann einen numerischen Ansatz. Eine numerische Lösung ist immer eine Näherungslösung. Es gilt

$$u(x, t) = u_D(x, t) + u_R(x, t) \quad (20)$$

Wobei die analytische Lösung u sich zusammensetzt aus der diskreten Lösung u_D und einem Rest (Residuum). Das Ziel ist es den Restterm so klein wie möglich zu halten. Es gibt in der Numerik einige Verfahren, die dieses Ziel auf unterschiedlichste Weise anstreben. Sie gehören zu den Methoden der gewichteten Residuen. Die drei bekanntesten seien hier genannt:

- Finite Differenzen Methode (FDM)
- Finite Volumen Methode (FVM)
- Finite Elemente Methode (FEM)

Die Wahl der Methode richtet sich nach der Art des Problems und wie gut sich dieses diskretisieren lässt. Diskretisieren bedeutet: Ich lege ein Gitter auf mein Gebiet Ω und löse das Problem nur an den Knotenpunkten. Der Raum dazwischen wird interpoliert. Das Residuum $u_R(x, t)$ in (20) setzt sich somit aus zwei Fehlern zusammen:

- dem Diskretisierungsfehler (Wahl und Größe des Gitters)
- dem Interpolationsfehler

Eine Abschätzung bzw. Auswertung dieser Fehler erfolgt im Rahmen dieses Projektes nicht.

Die FDM zwingt den Anwender das Problem mit einem gleichmäßigen, quadratischen Gitter zu diskretisieren. Dadurch erhöht sich bei gekrümmten Strukturen der Fehler im Randgebiet. Beliebte ist diese Methode in der Strömungsmechanik [24] und wegen ihrer vergleichsweise Einfachheit, auch zu Lehrzwecken.

Die FEM kommt mit Krümmungen besser zurecht. Diese Methode

erlaubt die Verwendung von Dreiecksgittern, die sogar unregelmäßig sein können. Dadurch sind auch Strukturveränderungen (Verformungen) möglich. Der Nachteil ist die damit verbundene gesteigerte Komplexität der Näherungslösung, was sich in Speicherkapazität und Rechenzeit niederschlägt.

Eine weiterer Aspekt, der bei der Wahl der Methode eine Rolle spielt, ist der Problemtyp. Partielle Differentialgleichungen lassen sich in 3 Klassen einteilen. Sie sind entweder:

- elliptisch → beschreibt zeitunabhängige, stationäre Probleme
- hyperbolisch → beschreibt Transportprozesse (Wellenausbreitung)
- parabolisch → beschreibt Evolutionsprobleme mit einer Zeit-Variable.

Die Bezeichnungen stellen nicht den Kurvenverlauf der Lösungen dar. Der Ursprung der Namensgebung liegt in der Klassifizierung von Kegelschnitten [23]. Demnach ist die Gleichung aus (17) als parabolisch einzustufen. Die FEM kommt gut mit elliptischen und parabolischen Problemen zurecht.

Zusammenfassend fällt Die Wahl auf die Finite-Elemente-Methode, um das Problem (17) numerisch zu lösen.

DIE FINITE ELEMENTE METHODE

Die FEM wird hier nicht im Detail abgehandelt. Eine gute Einführung in die Thematik bietet [20] Im Prinzip geht es darum eine Differentialgleichung oder ein Differentialgleichungssystem in ein lineares Gleichungssystem zu überführen. Dieses kann dann an einem numerischen Gleichungssystem-Löser übergeben werden. Das folgende Kochrezept beschreibt die Vorgehensweise:

1. Formulierung des Problems.
2. Das Problem in eine schwache Formulierung umschreiben.
3. Diskretisierung des Gebiets.
4. Basisfunktion wählen.
5. Lineares Gleichungssystem aufstellen
6. Das Gleichungssystem numerisch lösen

Die Abarbeitung der Schritte 1-3 steht im Fokus dieser Arbeit. Die Analyse für Schritt 1 erfolgte im Kapitel 2. Schritt 2 kommt im Anschluss und die Festlegung der Gitterstruktur für Schritt 3 findet

sich im Kapitel 5, wenn es um die Umsetzung geht. Das DUNE-Framework¹ implementiert die Schritte 4-6 und bietet die entsprechende Schnittstelle für die Parametrisierung (siehe ebenfalls Kapitel 5).

SCHWACHE FORMULIERUNG

Die Lösung der Gleichung 1 muss in Ω zweimal differenzierbar sein. Mit der schwachen Formulierung will man erreichen, dass u nur einmal schwach differenzierbar sein muss und somit eine *schwächere* Anforderung an u stellt. Der erste Schritt um das zu erreichen, ist die Multiplikation der Gleichung 1 mit einer Testfunktion v und die Integration beider Seiten nach x über das Gebiet Ω .

$$\frac{d}{dt} \int_{\Omega} u v dx - \underbrace{D_m \int_{\Omega} \Delta u v dx}_{\text{partielle Integration}} - \int_{\Omega} R(u) v dx = \int_{\Omega} f v dx \quad (21)$$

Da die Zelloberfläche eine geschlossene Fläche ohne Rand ist, entsteht bei der partiellen Integration kein Randterm. Man erhält die schwache Form von 1

$$\frac{d}{dt} \int_{\Omega} u v dx + D_m \int_{\Omega} \nabla u \nabla v dx - \int_{\Omega} R(u) v dx = \int_{\Omega} f v dx \quad (22)$$

Neben der einmaligen schwachen Differenzierbarkeit von u ist jetzt die Integrierbarkeit der partiellen Ableitungen von u und v eine weitere Anforderung an die schwache Form.

Die eigentliche Diskretisierung beginnt mit der Definition von u und v . Die Lösung u soll nun stückweise aus einer Summe von linearen Funktionen angenähert werden. Der Raum den diese linearen Funktionen aufspannen nennt sich *Ansatzraum* U , eine Funktion daraus *Ansatzfunktion*. Diese Ansatzfunktionen werden zwischen 2 Gitterpunkten mit Hilfe des Lagrangen Ansatzes interpoliert.

Mit v wird genauso verfahren. Der Raum für v nennt sich *Testraum* V , Funktionen aus V sind Testfunktionen.

Für FEM wird die Galerkin-Methode [22] angewendet, was bedeutet das (22) für beliebige Testfunktionen gilt. Der Einfachheit halber werden Ansatz- und Testraum als gleich angesehen. Die Funktionen aus beiden Räumen nennt man auch *Knotenbasisfunktionen* Φ_i . Somit ergibt die Näherungslösung für u und v :

$$u_h(t) = \sum_{i=1}^N u_i(t) \Phi_i, \quad v_h = \sum_{j=1}^N v_j \Phi_j \quad (23)$$

¹ <https://dune-project.org/>

Einsetzen ergibt

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \sum_{i,j}^N u_i v_j \underbrace{\int_{\Omega} \Phi_i \Phi_j dx}_{A_1} + D_m \sum_{i,j}^N u_i v_j \underbrace{\int_{\Omega} \nabla \Phi_i \nabla \Phi_j dx}_{A_S} - \sum_j^N v_j \underbrace{\int_{\Omega} R(\sum_i^N u_i \Phi_i) \Phi_j dx}_{A_2} \\ = \underbrace{\sum_j^N v_j \int_{\Omega} f \Phi_j dx}_{\mathbf{b}} \quad (24) \end{aligned}$$

Der Koeffizientenvektor \vec{v} wird so gewählt, dass v_j nur einer Basisfunktion entspricht. Durch diesen Trick erhält man ein Matrixsystem

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \sum_i^N u_i \underbrace{\int_{\Omega} \Phi_i \Phi_j dx}_{A_1} + D_m \sum_i^N u_i \underbrace{\int_{\Omega} \nabla \Phi_i \nabla \Phi_j dx}_{A_S} - \underbrace{\int_{\Omega} R(\sum_i^N u_i \Phi_i) \Phi_j dx}_{A_2} \\ = \underbrace{\int_{\Omega} f \Phi_j dx}_{\mathbf{b}} \quad (25) \end{aligned}$$

für $j = 1, \dots, N$. Dieses Gleichungssystem muss für die Koeffizienten $u_i(t)$ gelöst werden.

- N ist die Anzahl der Knoten auf dem Gitter
- A_1 ist der Speicher (Storage) und hält die Lösungen des letzten Zeitschritts.
- A_S ist die Steifigkeitsmatrix. Diese enthält nur Ableitungen der Basisfunktionen und wird zu Beginn einmalig berechnet.
- A_2 ist der nichtlineare Anteil
- \mathbf{b} ist der Lastvektor und enthält das Signal
- \mathbf{u} der Koeffizientenvektor

Dieses System kann dann mit Hilfe von DUNE-PDELab mit Wahl eines geeigneten Zeitschrittverfahrens integriert werden (Kapitel 5.5)

Teil III

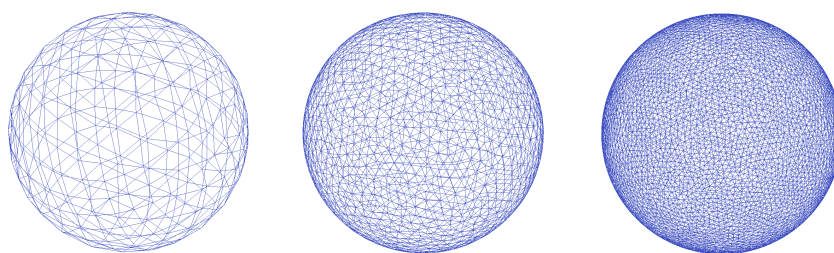
SIMULATION

Der letzte Abschnitt beschäftigt sich mit der programmier-technischen Realisierung, sowie der Ausführung der Simulation. Im fünften Kapitel werden Software- Design-Aspekte beleuchtet. Es folgt die Präsentation der Simulationsergebnisse im sechsten Kapitel. Datenanalyse und anschließende Diskussion sind im siebten Kapitel zu erwarten und das letzte Kapitel gibt einen Ausblick auf zukünftige Fragestellungen und die damit verbundenen Erweiterungsmöglichkeiten.

UMSETZUNG

ZELLGITTER

Für die numerische Berechnung der Oberflächenkonzentrationen von Cdc42 werden 3 verschiedene Gitterauflösungen verwendet. Diese Gitter wurden mit dem Finite-Elemente Generator gmsh¹ generiert und haben unterschiedliche Aufgaben.



- | | | |
|---|--|--|
| <p>(a) Gitter A: 786 Elemente und 384 Knoten. Diese Gittergröße dient als zusätzliches Testgitter für die Signalbewegung auf der Zelloberfläche (siehe auch Kapitel 5.4). Schnelle Simulationszeiten ermöglichen außerdem eine schnelle Überprüfung neuer Funktionen oder Parametereinstellungen.</p> | <p>(b) Gitter B: 3026 und 1531 Knoten. Mit diesem Gitter werden alle Simulationsergebnisse für die Polarisierung erzielt. Die Rechenzeit pro simulierter Sekunde beträgt ca 2 min.</p> | <p>(c) Gitter C: 12110 Elemente und 6057 Knoten. Dieses Gitter liefert die besten Ergebnisse bei der Ausbildung des Shmoos. Die Simulationszeit pro Sekunde ist mit 5 min pro simulierter Sekunde sehr lang.</p> |
|---|--|--|

Abbildung 9: Die 3 Gittertypen, die bei der Modellsimulation Verwendung finden. Die Angaben für die Simulationszeiten beziehen sich auf folgende Systemkonfiguration: CPU 3.4GHz, 8 Kerne; 16GB Ram.

¹ <http://gmsh.info/>

POSITIONIERUNG DER ZELLEN

Die Skalierung und Positionierung der Zell-Gitter im Raum geschieht über die Angabe von Polarkoordinaten. Die MATa-Zelle dient dabei als Referenz und ist im Koordinatenursprung angesiedelt.

$$p_a = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (26)$$

Die Position der MAT α -Zelle wird über den Vektor \vec{p}_α vom Punkt p_a aus in Kugelkoordinaten angegeben, mit den Azimut φ und die Inklination θ . Der Punkt p_α wird dann bestimmt durch

$$p_\alpha = \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \|\vec{p}_\alpha\|_2 \cdot \sin(\theta) \cdot \cos(\varphi) \\ \|\vec{p}_\alpha\|_2 \cdot \sin(\theta) \cdot \sin(\varphi) \\ \|\vec{p}_\alpha\|_2 \cdot \cos(\theta) \end{pmatrix} + p_a \quad (27)$$

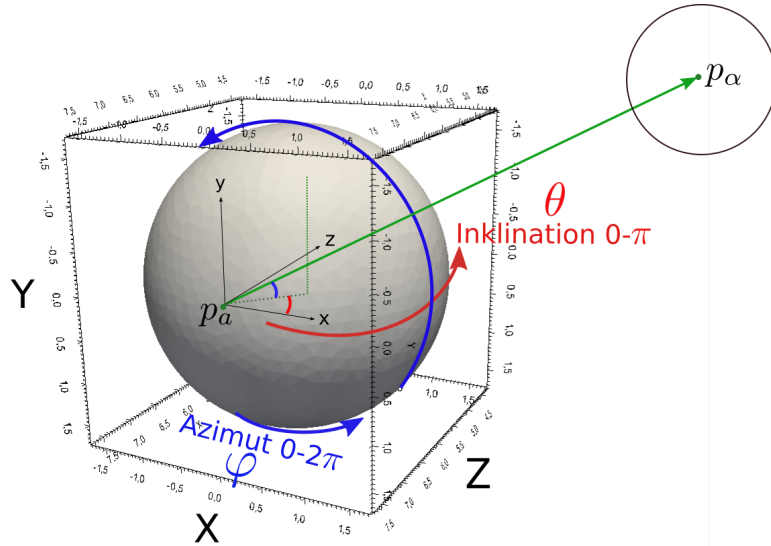


Abbildung 10: Positionierung der Zellen im 3D-Koordinatensystem.

TRANSPORTERBEWEGUNG

Im Kapitel 3.6 wird die laterale Diffusion der Pheromontransporter in der Zellwand durch eine Diffusionsgleichung + Brownsche Bewegung interpretiert. Aus Zeit- und Verfahrensgründen wird dieser Schritt im diskreten Raum umgesetzt. Die Bewegung der Pheromonquelle findet nun auf dem Gitter der Zelloberfläche statt. Beschrieben wird diese Bewegung über die mittlere quadratische Verschiebung (MSD) über einen Zeitraum Δt

$$r^2 = 2n \cdot D_m \cdot \Delta t \quad (28)$$

Das hat den Vorteil, dass die neue Position der Pheromonquelle nicht aufwendig errechnet werden muss. Die Neuberechnung könnte insbesondere dann zum Problem werden, wenn aus der idealisierten Kugelform der Zelle ein Shmoo wird. Die Positionen der Elemente können aus dem DUNE-Framework abgefragt werden. Da jetzt aber pro Zeitschritt Δt der zurückgelegte Weg vorgegeben wird, da Elementweise gesprungen wird, ist dieser Weg von der Auflösung des Gitters abhängig. Die Konsequenz daraus ist, dass die Bewegung der Pheromontransporter umso schneller ist, je grobmaschiger das Gitter ist. Dieser Effekt muss kompensiert werden. Die Antwort darauf lautet: Je länger der zurückgelegte Weg im letzten Zeitschritt war, desto länger dauert es bis der nächste Sprung vollzogen wird. Der Transporter soll sich also nicht mehr nach jedem Zeitschritt bewegen. Das wird erreicht, in dem man die Sprungzeiten nach einer Exponentialverteilung zieht.

$$t_s = \lambda \cdot e^{-\lambda x} \quad (29)$$

t_s ist der Zeitpunkt des nächsten Sprungs der Signalquelle und λ ist die Ereignisrate. Die Ereignisrate λ berechnet sich aus:

$$\frac{r^2}{2n \cdot D_m} = \Delta t = \frac{1}{\lambda} \quad (30)$$

$$\frac{2n \cdot D_m}{r^2} = \frac{1}{\Delta t} = \lambda$$

Das zeitliche Intervall auf dem die Zufallszahlen der exponentiellen Verteilung gezogen werden, ist unbegrenzt.

Diese Simulationmethode entspricht dem stochastischen Simulationsalgorithmus von Gillespie (SSA)[1]

GERICHTETE TRANSPORTERBEWEGUNG

Da sich der Pheromontransporter auf einem Dreiecksgitter bewegt und jedes Dreieck drei Nachbarfelder hat, muss dieser sich für eine von drei Bewegungsrichtungen entscheiden. Dabei folgt er dem Konzentrationsgradienten aktiver Cdc42-Moleküle. Das heißt die Sprungrichtung ist gewichtet. Die Übergangswahrscheinlichkeiten werden ermittelt und normiert durch

$$P_i = \frac{C_i}{\sum_{j=1}^n C_i} \quad n, j \in \{1, 2, 3\} \quad p_i \in [0, 1] \quad (31)$$

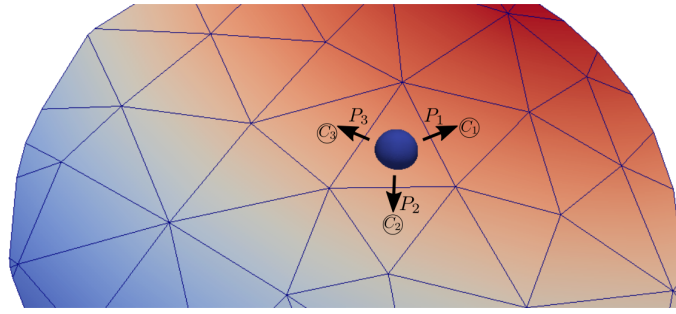


Abbildung 11: Die Wege über die Kanten eines Gitterelements sind gewichtet. Laut Abbildung ist die Übergangswahrscheinlichkeit P_1 höher als P_2 und P_3 . Der Konzentrationsgradient geht aufsteigend von blau nach rot.

DUNE-FRAMEWORK

Die programmiertechnische Umsetzung der Simulation erfolgt in C++. Die Bibliothek für die Numerik ist DUNE 2.4.1. Dune folgt dem Paradigma der generischen Programmierung und basiert auf Templates. Für die Implementierung des Modells ist es aus Gründen der Kompatibilität ratsam dieser Strategie zu folgen, um Fehler bei der Programmausführung zu minimieren. Als Entwicklungsumgebung kommt Qt-Creator zum Einsatz. Alle Programmmodule mit ihren Kommunikationsschnittstellen sind in Abbildung 12 zu finden. Die unterschiedliche Farbgebung deutet auf die Quelle der Entstehung hin. Die hellblauen Module sind Teil der Pheromon abhängigen Signaltransduktion und Cdc42-Aktivierung auf der Zelloberfläche. Die orangefarbene Einheit ist die physikalische Umsetzung des Shmoos und wurde von Goldenbogen et al.[13] implementiert. Das gelbe Modul stammt aus dem Dune-Pdelab Tutorial für nichtlineare Wärmeleitungsgleichung² und dient als Basis für die Problemstellung.

Im Folgenden sind die einzelnen Module aus Abbildung 12 beschrieben

Gitter

Das Gitter wird aus einer Gmsh-Datei eingelesen. Der diskretisierte Bereich stellt für das Modell eine Besonderheit dar. Die Kugel (Kapitel 5.2) ist ein dreidimensionales Objekt. Die Zelloberfläche, auf der die Diffusionsgleichung gelöst wird, ist zweidimensional. DUNE bietet einen Gittertyp an, der mit gemappten Dreiecksgittern auf dreidimensionale Strukturen umzugehen weiß: das ALU-Gitter, implementiert von Alkämper et al. [7]

² <https://gitlab.dune-project.org/pdelab/dune-pdelab-tutorials>

Zellgitter

Das Zellgitter ist das Ergebnis nach der Skalierung und ist der diskrete Raum für alle Zellen.

Signalgitter

Das Signalgitter dient nur zur Visualisierung der Pheromon-Transporter auf den Zelloberflächen.

Problem

Die Klasse Problem implementiert die Ausdrücke A_2 und b aus (25), sowie den Anfangswert u_0 . Neben dem aktuellen Zeitschritt t werden sämtliche Parameter für die Cdc42-Aktivierung und Signalgebung gehalten. Bei Übergabe des aktuellen Volumens V_{act} findet hier auch die Berechnung von (13) statt.

Löser

Das Löser-Modul wird aus dem PDE-Tutorial übernommen. Es besteht aus 2 Template-Klassen. Die erste Klasse implementiert die nicht-lineare Poisson-Gleichung. Die zweite Klasse erbt von der ersten und erweitert diese mit dem Zeitterm. Der Löser selbst arbeitet mit dem impliziten Runge-Kutta Einschrittverfahren nach Roger Alexander[1] unter Verwendung von Newton-Cotes Quadraturformeln.

Evaluator

Der Evaluator bekommt nach jedem Zeitschritt den Koeffizientenvektor u_i aus (25) übergeben und ermittelt daraus für alle Knotenpunkte die Lösung u . Hier wird auch die Transporterbewegung (5.4) gesteuert und der λ -Wert aus dem MSD an den Driver übergeben.

Kräftefeld

Das Kräftefeld beschreibt die physikalische Ausprägung des Shmoo. Dieser Prozess ist unabhängig von einer externen Signalgebung und kann vom Driver über einen Schwellwert von aktiven Cdc42 gestartet werden.

Driver

Der Driver ist der Datenbus für alle Module. Hier laufen die Informationen zusammen, werden aufbereitet und delegiert. Der Driver startet die Zeitschleife für die Simulation.

Output

Output ist eine Kollektion von Funktionen, die den Speicherort verwalten, Vtk-Dateien für die grafische Ausgabe des Ergebnisses anlegen und Csv-Dateien für die Datenauswertung generieren. Nach welchen Zeitschritten die Ausgabe erfolgen soll, kann über die Ini-Datei konfiguriert werden.

ERGEBNISSE

PARAMETER

Die Parametereinstellungen in Tabelle 1 beziehen sich bei allen Simulationen auf die MAT α - und MAT α -Zelle.

Parameter	Beschreibung	Modellwert	Referenz
<i>Polarisierung</i>			
v_0	Cdc42 _{cyt} Startkonzentration	0.02 μM	[12]
k_0	Basale Aktivierung	0.067 μms^{-1}	[12]
k	Autoaktivierung	1.0 μms^{-1}	[12]
K_m	Michaeliskonstante	0.1 $\mu\text{m} \cdot \mu\text{M}$	[12]
η	Basale Deaktivierung	1.0 s^{-1}	[12]
<i>Pheromonsignal</i>			
D_s	Diffusion	300 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$	[8]
k_B	Degradation	0.6 s^{-1}	[8]
k_α	Signalstärke	0.1 [1]	angenommen
<i>Pheromonantwort</i>			
D_m	Diffusion	0.001 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$	angenommen
<i>Cdc42 Pool</i>			
h	Max Cdc42	1000 [1]	[12],[28]

Tabelle 1: Parametereinstellungen für die Simulation

SIGNALKOPPLUNG

Die Bildsequenz in Abbildung 13 zeigt die Signalkopplung zwischen MAT α - und MAT α -Zelle, von links nach rechts und von oben nach unten. Zu Beginn stehen die Signale entgegengesetzt zueinander. Dann suchen sie sich ihren Weg auf dem Konzentrationsgradienten (Im Bild nicht zu sehen) in Richtung der Nachbarzelle. Am Ziel angekommen wachsen die Signale aufeinander zu. Das letzte Bild in der Sequenz deutet die Paarung nur an. Die Zelloberflächen kopulieren nicht.

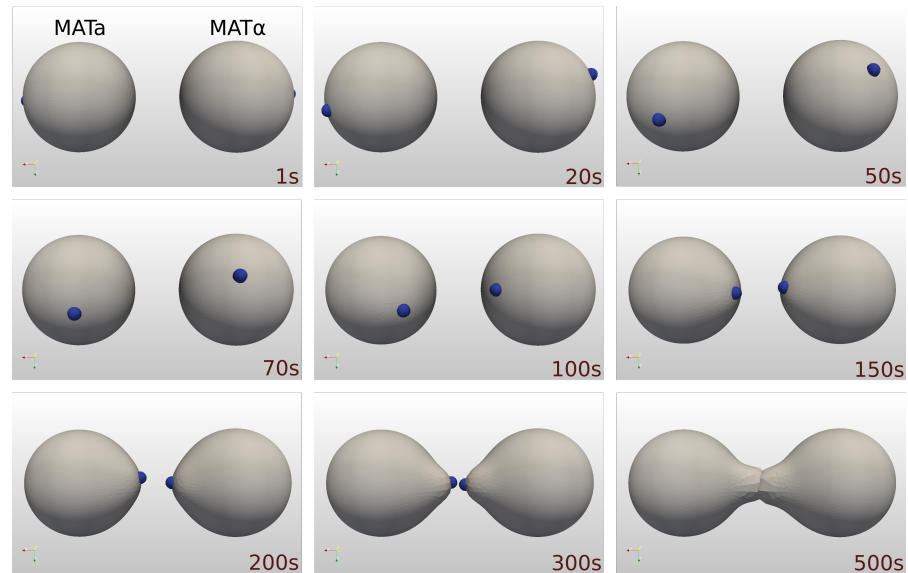


Abbildung 13: Signalkopplung und Paarung vom MATa und MAT α während einer Simulationsdauer von 500s (von links nach rechts, von oben nach unten). Die Signalpositionen sind blau markiert. In der letzten Darstellung werden sie von den Shmoos verdeckt.

KONZENTRATIONSPROFIL UND SIGNALSPUR

Die Simulation in Abbildung 14 zeigt in der linken Spalte das Konzentrationsprofil aktiver Cdc42-Moleküle und in der rechten Spalte den Pfad, den die Pheromonsignale auf den Zelloberflächen dabei zurücklegen. Die Simulationsdauer beträgt 400s. Der Zelldurchmesser beträgt 5 μm . Die Diskretisierung basiert auf Gitter C (5.1).

In den Bildsequenzen von Abbildung 15a ist der Ablauf der Shmoo-Bildung bei der Zell-Zell-Kommunikation von MATa-Zelle (links im Bild) und MAT α -Zelle (rechts im Bild) zu sehen. Die Zellen haben einen Durchmesser von 5 μm . Die Simulationszeit beträgt 1000 Sekunden. Zur besseren Visualisierung der Shmoos zeigen die Einfärbungen beider Zellen das Spannungsfeld aus dem Kräftefeldmodul an (rot: hohe Druckbelastung, blau: niedrige Druckbelastung). Nach einer anfänglichen Zeitverzögerung (Abbildung 15a) von 300s, in der die Signalquellen aufeinander zuwandern (in Abbildung 15a nicht zu sehen), erreicht die Cdc42-Konzentration auf der Oberfläche der MAT α Zelle den Schwellwert von $0.02 \mu\text{m} \mu\text{M}$ → Die MAT α Zelle beginnt den Materialeinbau für den Shmoo (Bild 15b, 15c). Dieser Shmoo ist zunächst nicht auf die MATa Zelle ausgerichtet, da das Signal der MAT α Zelle den Punkt der höchsten Konzentration noch nicht erreicht hat. Nach 500s beginnt auch die MATa Zelle mit dem Materialeinbau (Bild 15d). Nach 700s korrigiert die MAT α Zelle die Ausrichtung (Bild 15e). Die Korrektur erfolgt zu einem Zeitpunkt,

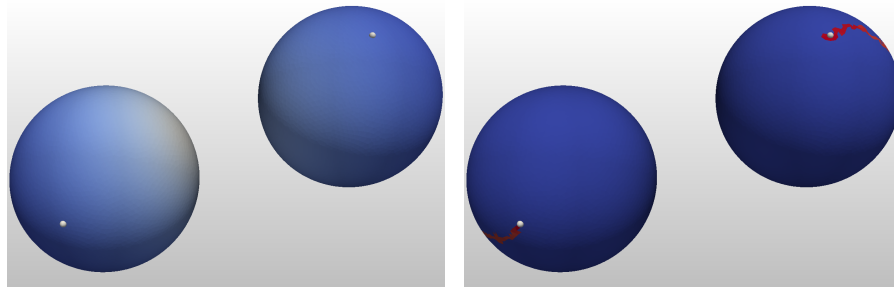
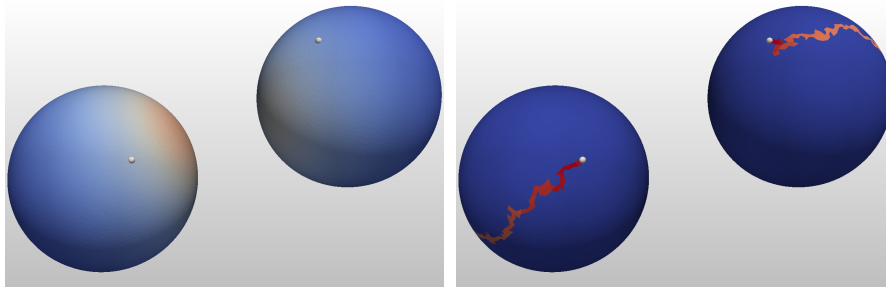
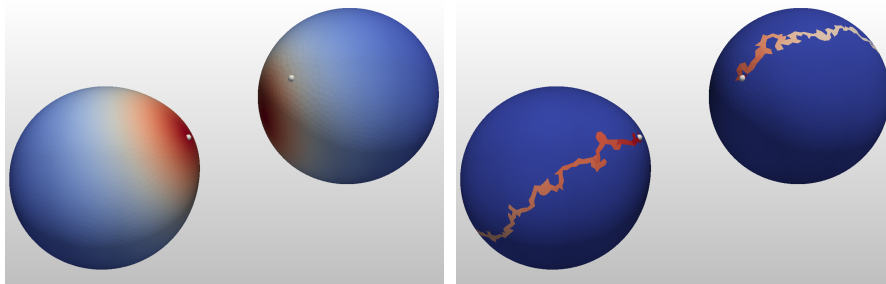
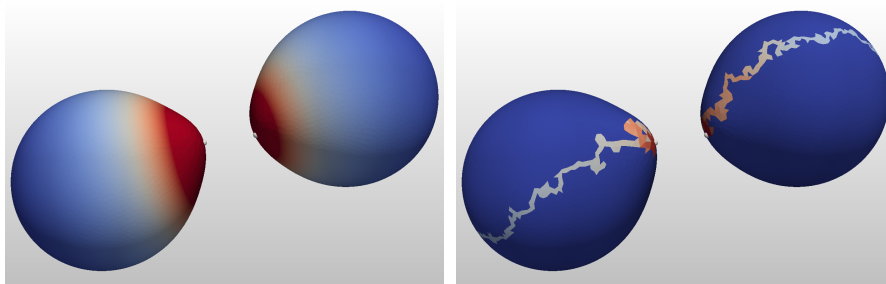
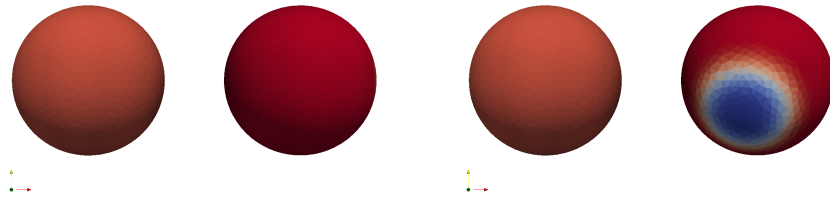
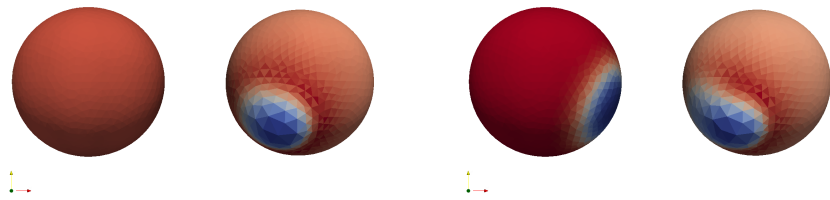
(a) $t = 100s$ (c) bei $t = 160s$ (e) $t = 220s$ (g) $t = 400s$

Abbildung 14: Simulation zeigt das Konzentrationsprofil (linke Spalte) und die Signalbewegung (rechte Spalte) zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Simulationszeit beträgt 400s

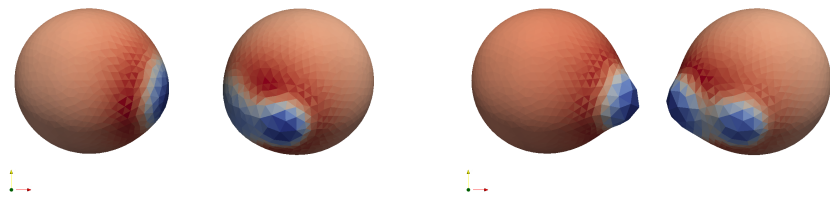
an dem die Zelloberflächenspannung des ersten Shmoo-Tips bereits plastisch verformt ist. Das Diagramm in [Abbildung 15g](#) zeigt den zeitlichen Verlauf der Cdc42-Konzentrationen auf der Zelloberfläche.



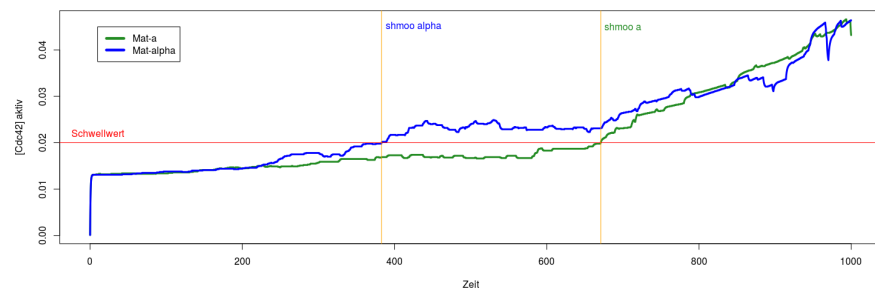
(a) Zeitverzögerung von 300s (Signalwanderung und Anstieg der Konzentration auf den Zelloberflächen. (b) Beginn des Materialeinbaus für den Shmoo in der MAT α -Zelle.



(c) Wachstum des Shmoos der MAT α -Zelle. (d) MAT α -Zelle beginnt den Materialeinbau für den Shmoo.



(e) Der Shmoo der MAT α -Zelle wird korrigiert. (f) Beide Shmoos wandern aufeinander zu.




(g) Zeitverlauf der Simulation mit dem Schwellwert, bei dem der Materialeinbau beginnt (horizontale Linie). Die Vertikalen Linien markieren die Zeitpunkte für den MAT α -Shmoo und den MAT α -Shmoo.

Abbildung 15: Bildfolge zeigt die Paarung von MAT α - und MAT α -Zelle. Die MAT α -Zelle bildet dabei eine irreversible Deformation aus, die über eine Richtungskorrektur abgebrochen wird.

SZENARIO VARIABLE ZELLGRÖSSE

Konzentrationsverlauf von Cdc42 und Polarisation auf der Zelloberfläche in Abhängigkeit des Zellradius. Einstellungen:

Radius MATa Zelle [μm]	{1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0}
Radius MAT α Zelle [μm]	{1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0}
Distanz [μm]	2
Zell- und Signalposition	
Gitterelemente	3026
Gitterknoten	1515
Simulationszeit [s]	750

Bis zum Zeitpunkt des Materialeinbaus bleibt die Menge an gebun-

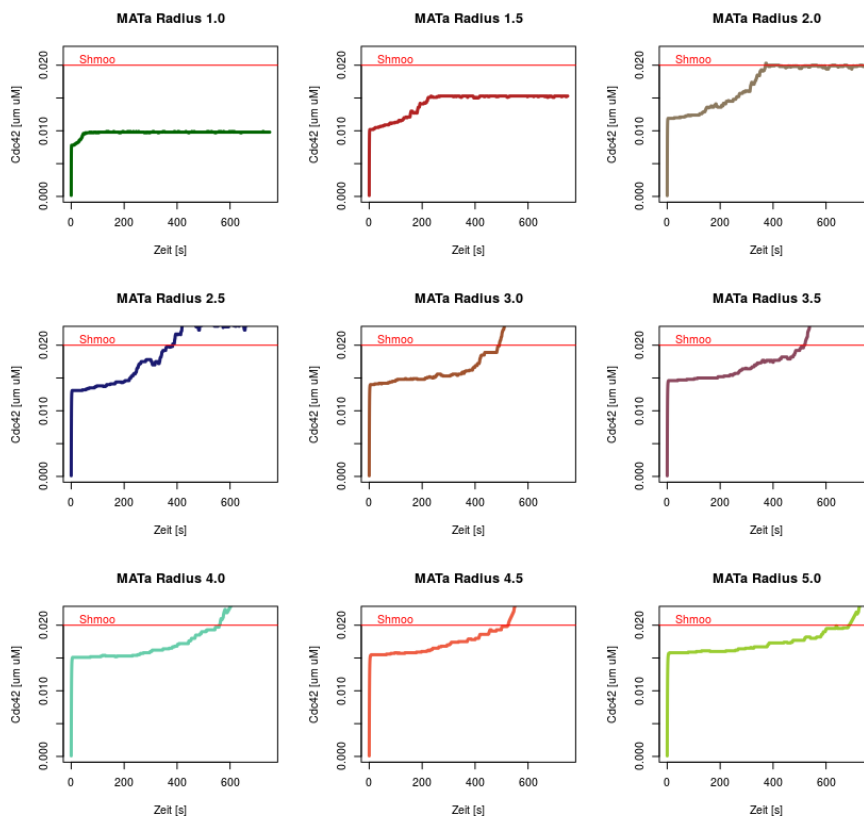


Abbildung 16: Zeitpunkt der Shmoo-Bildung in Abhängigkeit des Zellvolumens, gesteuert über den Zellradius.

denen Cdc42 nahezu konstant, während die Konzentration stetig ansteigt. Erst beim Erreichen des Schwellwerts für den Shmoo, steigen beide Kurven drastisch, bedingt durch den geringeren Abstand der Pheromonquellen. Zellen deren Radius $< 2 \mu\text{m}$ ist haben den Kon-

zentrationsschwellwert nicht erreicht und dadurch keinen Shmoo gebildet. Bei den Zellen mit einem Radius $\geq 2 \mu\text{m}$ verzögert sich der Zeitpunkt des Materialeinbaus mit ansteigender Zellgröße (Abbildung 16).

Bei allen Fällen tritt nach wenigen Sekunden bereits eine Cdc42-Sättigung der Zelloberfläche ein (Abbildung 17). Die Kurvencharakteristik und der Zeitpunkt der Sättigung ist sowohl für die Konzentration als auch für die Anzahl der aktiven Cdc42-Moleküle identisch.

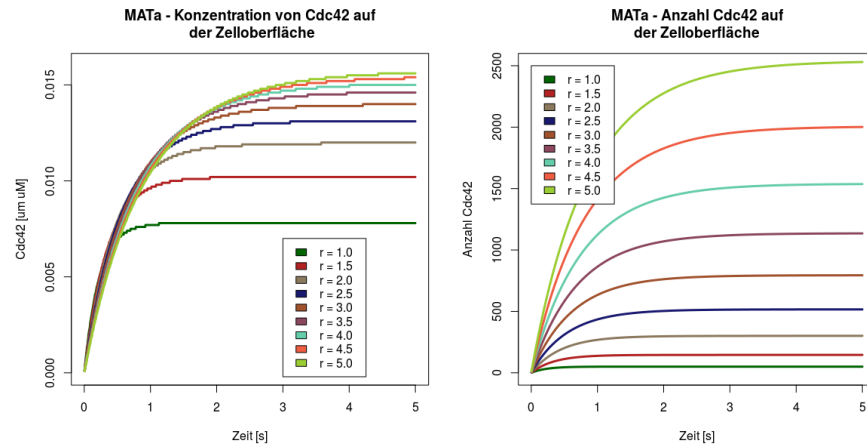


Abbildung 17: Sättigung von aktiven Cdc42 auf der Zelloberfläche in Abhängigkeit des Zellradius.

HINWEIS: Die Bilder zeigen nur den Kurvenverlauf der MAT α Zelle. Die MAT α Zelle zeigt hier ein identisches Verhalten.

Radius [μm]	Volumen [μm^3]	Ccd42 _{cyt} [1]	Cdc42 _{mem} [1]	Cdc42 _{mem} [%]	Shmoo Start [s]
1.0	4.19	63	50	79	-
1.5	14.13	215	146	68	-
2.0	33,51	510	346	67	336
2.5	65,45	1000	586	58	382
3.0	113,1	1720	793	46	491
3.5	179,6	2720	1135	41	516
4.0	268,08	4100	1536	37	574
4.5	381,7	5800	2182	37	523
5.0	523,6	7980	2744	34	686

Tabelle 2: Beziehung zwischen Zellvolumen und Verfügbarkeit von Cdc42

Bei konstanter Gittergröße vergrößern sich die Elementflächen bei anstiegenderem Zellvolumen. Das hat Konsequenzen für die Bewegung der Signalquellen. Der Plot in Abbildung 18 zeigt die Beziehung zwi-

schen Zellvolumen und generierter Ereignisrate λ . Die λ -Verteilung ist zur Besseren Übersicht auf das Intervall $[0 - 3]$ reduziert. Die Häufigkeit von höheren Ereignisraten überwiegt bei kleinen Zellradien, respektive niedrige Ereignisraten bei größeren Zellradien, was zu erwarten ist.

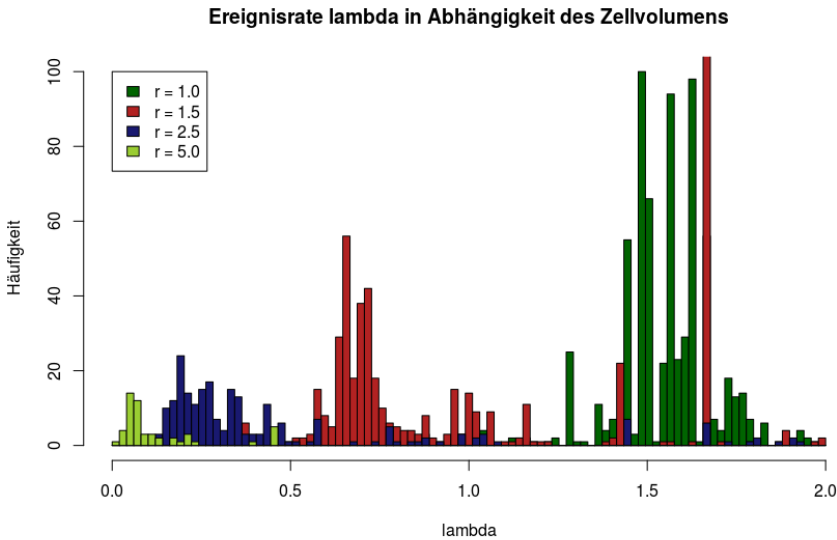
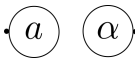


Abbildung 18: Häufigkeit von Ereignisraten am Beispiel von 4 Zellradien

SZENARIO VARIABLE GITTERGRÖSSE

Dieses Szenario dient dazu, die laterale Diffusion auf der Zelloberfläche zu untersuchen. Das Signal legt bei Gitter 1 (Gitter A [5.1](#)) pro Ereignis einen längeren Weg zurück als bei Gitter 3 (Gitter C). Die Kompensation erfolgt dadurch, dass bei Gitter 1 dieses Ereignis seltener stattfindet. Gemessen wird die Ereignisrate λ . Je größer λ ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass der zeitliche Abstand zwischen 2 Signalbewegungen klein ist. Settings:

Radius MATa Zelle [μm]	2.5
Radius MAT α Zelle [μm]	2.5
Distanz (Rand zu Rand) [μm]	2
Zell- und Signalposition	
Gitterelemente	{764, 3026, 12110}
Gitterknoten	{384, 1515, 6057}
Simulationszeit [s]	750

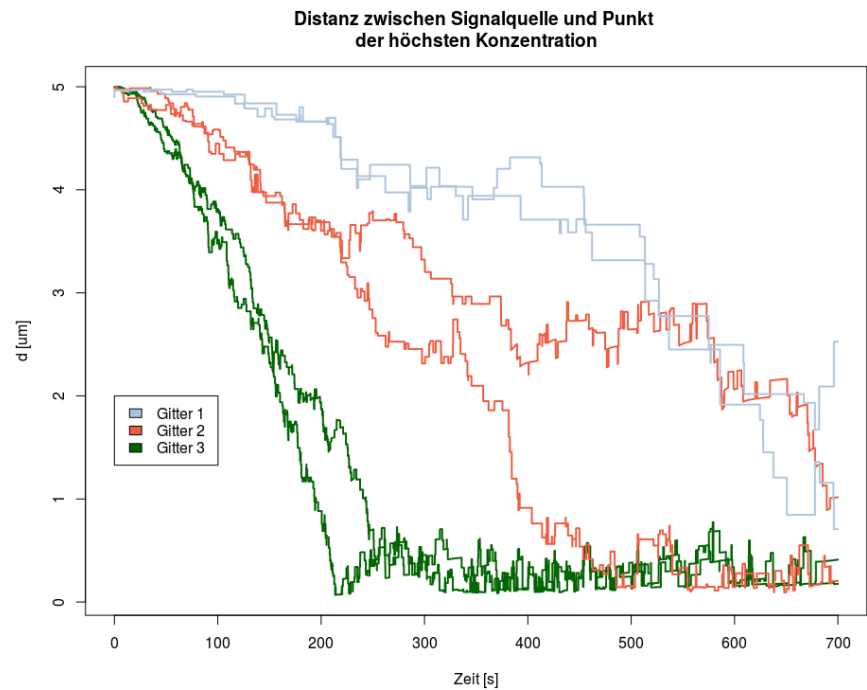


Abbildung 19: Distanz der Signalquelle zum Punkt der höchsten Konzen-
tration in Abhängigkeit der Zeit für alle 3 Gittertypen und
jeweils für beide Zellen (MATa- und MAT α). Beginnend
auf der gegenüberliegenden Seite der Zelle, beträgt die Distanz
2 Zellradien (hier $2 \cdot 2.5\mu\text{m}$). Die Kurven zeigen die stochas-
tische Bewegung in Richtung des Zielpunkts. Je feiner das
Gitter, desto häufiger sind die Bewegungssprünge, desto klei-
ner die zurückgelegte Distanz. Die Signale erreichen das Ziel
nicht zum gleichen Zeitpunkt.

SZENARIO VARIABLE MENGE AN CDC42 IM CYTOSOL

Über den Bifurkationsparameter v lässt sich die verfügbare Menge an
cytosolischen Cdc42 steuern. Hier wird v_0 zu Beginn der Simulation
verändert und der Konzentrationsverlauf von aktivierten Cdc42 an
der Zelloberfläche aufgezeichnet.

Radius MATa Zelle [μm]	2.5
Radius MAT α Zelle [μm]	2.5
Distanz (Rand zu Rand) [μm]	2
Zell- und Signalposition	$\odot a$ $\odot \alpha$
Gitterelemente	3026
Gitterknoten	1515
v	0.15, 0.2, 0.25
Simulationszeit [s]	30s

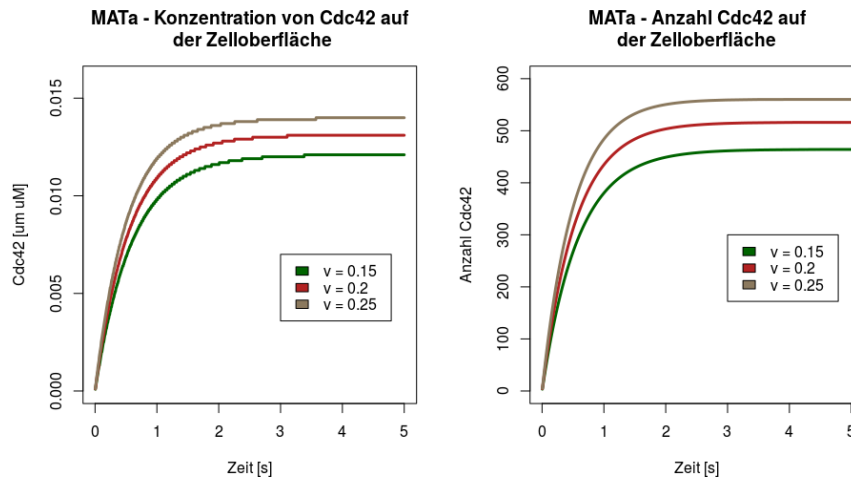


Abbildung 20: Sättigung von aktiven Cdc42 auf der Zelloberfläche in Abhängigkeit von v .

Die Auswertung in Abbildung 20 zeigen das gleiche Verhalten für den Cdc42-Konzentrationsverlauf (linkes Diagramm) und Anzahl auf der Zelloberfläche (rechtes Diagramm) wie bei (6.4). Bei der variablen Zellgröße errechnete das Programm die Menge an cytosolischen Cdc42 (3.4). In 6.6 wird über v die Cdc42-Menge festgelegt. Bei dem unteren Wert von $v = 0.15$ steht weniger Cdc42 zur Verfügung und somit wird auch weniger Cdc42 rekrutiert (grüner Kurvenverlauf). Analog dazu sind die anderen Kurvenverläufe zu interpretieren.

DISKUSSION

Polarisierung

Mit diesem Modell ist es erstmals gelungen Pheromonsignalgebung, Zellpolarisation und Zelldeformation bei Hefezellen des Typs *Saccharomyces cerevisiae* zu vereinen und diese Abläufe im dreidimensionalen Raum zu simulieren. Obwohl des hohen Abstraktionsgrades, bei dem nur die Schalt- und Verbindungsstellen aller oben genannten Prozesse modelliert sind, zeigen die Simulationsergebnisse das zu erwartende Verhalten, wenn auch die gewonnenen Daten von den bisherigen Erkenntnissen aus anderen Teilmodellen teilweise deutlich abweichen können. Ein Vergleich ist auch insofern schwierig, als es keine ganzheitlichen Ansätze gibt, sondern nur viele Teilmodelle mit unterschiedlichen Herangehensweisen.

Das Modell in dieser Arbeit unterscheidet zwischen Polarisation und Deformation. Während die Polarisation extrem schnell abläuft und im Sekundenbereich liegt (6.4), können bis zur Deformation der Zellmembran und der Zellwand einige Minuten vergehen. Als Modellreferenz wurde die Arbeit von [12] herangezogen, aus dem auch alle Parameter für die Cdc42- Aktivierung in das Modell aufgenommen wurden. Dort geht auch hervor, dass die Diffusion D_{cyt} von cytosolischen Cdc42 durch eine Zelle mit einem Durchmesser von $3\mu\text{m}$ in etwa 1s dauert. Der Zeitpunkt der Sättigung von aktiven Cdc42 auf der Zelloberfläche in der Simulation 6.4 bestätigen diese Beobachtung. Mit D_{cyt} wird Cdc42 aus dem Cytosol rekrutiert und an der Zelloberfläche verankert. Diese Zeit verlängert sich, je größer der Durchmesser der Zelle ist (Abbildung 15). Der Wert für die Diffusion an der Zelloberfläche D_m ist angenommen und basiert auf der Annahme, dass die Diffusion von Cdc42 im Cytosol sehr schnell abläuft ($D_{\text{cyt}} \rightarrow \infty$) und Cdc42 auf der Zelloberfläche sehr langsam diffundiert ($D_m \rightarrow 0$). Gewonnene Erkenntnisse über D_m variieren sehr stark. So wurde bei [12] der Wert auf $0.1\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ festgesetzt, bei Klunder et al.[21] beträgt der Wert für D_m $0.03\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, ebenso bei [28]. Versuche mit diesen Werten hatten eine extrem schnelle Polarisation zu Folge ($< 0.005\text{s}$), vermutlich verursacht durch das Pheromonsignal, dessen Diffusion mit $D_s = 300\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ geschätzt wurde [8]. Versuche mit $D_m = 0.001\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ in Verbindung mit dem Signal ergab ein zufriedenstellendes Verhalten für die Polarisation.

Im Krätemodul aus [13] entsteht der Shmoo über den Tugordruck, unabhängig von getriggerten Signalen. Die Zelldeformation beginnt dort nach ca 50s in der Wachstumszone. Das Signal aus dem Modell

braucht für das Durchwandern einer Hemisphäre, bei einem Zelldurchmesser von $5\mu\text{m}$, ca 500s. Die Definition eines Schwellwertes für den Shmoo ist daher unerlässlich, damit es in dem Modell überhaupt zu einer gezielten Paarung kommt und der Shmoo nicht unkontrolliert wächst. Auch wenn der gewählte Wert von $0,02\mu\text{m uM}$ nur angenommen wurde und auf der Annahme beruht, dass mindestens die Hälfte aller Cdc42-Moleküle aktiviert sein müssen, so trägt er doch dem Umstand Rechnung, dass zwischen dem externen Stimulus und der Aktinpolymerisation, respektive der Genexpression eine gewisse Zeit vergehen muss, bis der Shmoo entstehen kann, was hier aber nicht näher untersucht wurde.

Signalbewegung

Die Entscheidung Bewegungen der Signalquellen auf einem diskreten Gitter zu simulieren war zunächst umstritten und zwar aus folgenden Gründen:

- Bei einem mathematischen Modell geht man grundsätzlich immer von einem kontinuierlichen Problem aus. Die Bewegung des Signals auf der Zelloberfläche hätte mit einer zusätzlichen Differentialgleichung gelöst werden müssen, bei der die Richtung der Bewegung ein stochastisch Ereignis darstellt (Kapitel 3.6). Die numerische Lösung dieser Gleichung entspräche dann der Signalposition im nächsten Zeitschritt.
- Wie in 5.3 bereits angeführt ist die diskrete Bewegung über die Gitterelemente stark von der Elementgröße abhängig und wird somit über die Wahl der Simulationsumgebung beeinflusst und nicht über die Modellparameter, was ungünstig ist.

Gegenargumente sind, wenn man die Gitterelemente ausreichend klein wählt, so dass der $\text{MSD} \rightarrow 0$ geht, nähert man sich der kontinuierlichen Lösung an. Des weiteren ist die Umsetzung über das MSD praktikabler, da zum einen das DUNE-Framework viele Daten über die Elemente während einer Simulation liefert und zum anderen die Positionen auf einer inhomogenen Oberfläche im 3D-Raum aufwendig zu berechnen sind. Abbildung 19 zeigt die Validierung des MSD für die 3 verschiedenen Gittertypen (5.1). Es ist zu erwarten, dass sich alle Kurven zum gleichen Zeitpunkt am Ort der höchsten Konzentration treffen, da Ort und Strecke konstant sind. Dies ist nicht der Fall. Die Abweichungen sind erheblich, so erreicht z.B das Signal auf Gitter C seinen Zielort bereits nach 200s, während es bei Gitter A 700s sind. Durch den stochastischen Prozess sind Schwankungen zu erwarten (wie bei Gitter C zwischen MATa und MAT α Zelle), aber nicht in dem hohen Ausmass.

Wenn man sich die Lambda-Werte in den generierten Daten anschaut,

so fallen einem teilweise extrem hohe Ausreißer auf. Ein Nachrechnen hat aufgezeigt, dass der Ausdruck (31) aus der geringen Diffusionskonstante D_m im Zähler (Größenordnung 10^{-3}) und der sehr kleinen MSD im Nenner (Größenordnung $10^{-4} - 10^{-7}$) einer hohen Instabilität unterworfen ist. Kleinste Schwankungen in den Nachkommastellen verursachen sehr große Schwankungen in der Ereignisrate. Diese Ausreißer können eine Größenordnung von 10^6 aufweisen, so dass auch die Ereignisrate bei kleinen Gittern sehr groß sein kann und demzufolge auch der zeitliche Abstand. So ist die große Diskrepanz zwischen den Bewegungsabläufen in Abbildung 19 vermutlich dieser numerisch instabilen Situation geschuldet und weniger dem Konzept. Abhilfe könnte das Rechnen mit logarithmischen Zahlen sein mit anschließender Rückumwandlung des Ergebnisses. Es ist auch möglich, dass der stochastische Prozess noch nicht konvergiert und die richtige Gittergröße noch nicht gefunden ist. Hier sind weitere Tests mit feineren Gittertypen notwendig.

In den Versuchen werden die Signalquellen zum Zeitpunkt t_0 bereits positioniert und zwar wurde die weiteste Entfernung voneinander gewählt, so dass jedes Signal eine Hemisphäre durchwandern muss. Ebenso wurde angenommen, dass der Ort der Polarisierung und der Signalquelle identisch sind. Es ist gar nicht sicher, ob dieses Setting der Realität entspricht. Für das Modell wurde nicht untersucht, zu welchem Zeitpunkt die Transporter (bei MAT α Zellen) und der Vesikeltransport (bei MAT α Zellen) aktiv sind und wo sich befinden.

Deformation

Das Kräfte-Modul ist in die Signalkopplung erfolgreich integriert. Ein Problem gibt es noch bei der Verfeinerung des Gitters während der Shmoo-Entstehung. Durch das Wachstum vergrößern sich die Gitterelemente. Dem kann durch den Einbau weiterer Untergitter in den betreffenden Elementen begegnet werden, so dass eine gleichbleibende Gitterstruktur gewährleistet ist. Es ist nicht gelungen diesen Vorgang in Kombination mit der Signalkopplung zu aktivieren. Bei der Verfeinerung entstehen neue Elemente und Knotenpunkte. Das muss dem Löser mitgeteilt werden, über eine Update-Funktion auf den diskreten Ansatzraum.

Die Kopulation der Oberflächen beider Zellen wird bewusst weggelassen, weil durch das Aufbrechen der Zelloberfläche zu Beginn der Kopulation ein neues mathematisches Problem entstehen würde.

Die Modellierung und Programmierung der Signalübertragung von Hefezellen zielte auf eine generelle Machbarkeit ab. Das Verhalten der Polarisation wurde untersucht (7) und entspricht im Wesentlichen der Erwartungshaltung. Eine Anpassung der Parametereinstellungen hätte möglicherweise noch genauere Übereinstimmungen zu Tage gebracht. Die Validierung der Modelldaten über eine biologische Fragestellung steht noch aus. Das könnte die Bestimmung des Zeitpunktes der Shmoo-Ausprägung in einer größeren Zellpopulation sein unter Zugabe von α - bzw. alpha-Faktor. Die Validierung könnte dann über mikroskopische Aufnahmen mit anschließender Bilderkennung geschehen [17].

Generell ist das Verfahren bei rastermikroskopischen Aufnahmen von Paarungs-Prozessen sehr aufwendig. Wie in Kapitel 2 angesprochen könnte der Ausbau des Modells für Simulation in einem Zellverbund ein lohnenswertes Ziel sein, um bildgebende Verfahren bei der Untersuchung von Hefe- oder andere Zellen zu unterstützen, bzw. zu ersetzen. Mit der vorliegenden Arbeit wurde dafür der Grundstein gelegt. Um diesem Ziel ein Stück näher zu kommen, sind als nächstes zwei wichtige Schritte notwendig:

1. Simulation der Signalübertragung von drei Zellen: Zwei Zellen des einen Typs senden Signale an eine Zelle des anderen Typs (z.B. $2xMAT\alpha + 1xMAT\alpha$). Mit dieser Einstellung liese sich das Verhalten bei der Polarisation noch genauer Untersuchen. Für welche $MAT\alpha$ -Zelle entscheidet sich die $MAT\alpha$ -Zelle? Welchen Einfluss hat jetzt der Bifurkationsparameter v ? Auch die Variation der Signalstärke k_α ist hier interessant. Dieser Wert würde die Intensität von α - Faktor ausdrücken. Dann könnte man fragen: Wie viel α -Faktor muss ich zugeben, um bei den Zellen einen Shmoo auszulösen? Für diese Simulationsreihe muss die Problemklasse aus 5.5 mit einer Akkumulation von Signaltermen auf der rechten Seite der Gleichung (17) erweitert werden.
2. Verkürzung der Simulationszeiten: Für die Simulation weiterer Zellen muss über eine Parallelisierung der Prozesse nachgedacht werden. Schon jetzt dauert die Simulation zweier Zellen mit einem Radius von $2.5\ \mu m$ unter Verwendung des Gittertyps C, mehrere Tage, bei einer Simulationszeit von 1000s mit der Rechnerkonfiguration aus Abbildung 9. Das DUNE-Framework unterstützt paralleles Rechnen. Inwieweit auch Gra-

fikkarten mit eingebunden werden können, muss noch untersucht werden.

Auch sind weitere Analysen notwendig, um den genauen Umstand, bzw. Zeitpunkt der Shmoo-Ausprägung bestimmen zu können. Hierfür ist eine Betrachtung der Aktinpolymerisation und der Genexpression, die durch die Signaltransduktion via Pheromone ausgelöst werden, unerlässlich. Diese Informationen müssen dann in das Modell mit einfließen.

LITERATUR

- [1] Roger Alexander. “Diagonally Implicit Runge–Kutta Methods for Stiff O.D.E.’s”. In: *SIAM Journal on Numerical Analysis* 14.6 (1977), S. 1006–1021.
- [2] Steven J. Altschuler, Sigurd B. Angenent, Yanqin Wang und Lani F. Wu. “On the spontaneous emergence of cell polarity”. In: *nature letter* 454 (2008), S. 886–889.
- [3] Naama Barkai, Mark D. Rose und Ned S. Wingreen. “Protease helps yeast find mating partners”. In: *nature Scientific Correspondence* 396 (1998), S. 422–423.
- [4] Frédéric Boudon, Jérôme Chopard, Olivier Ali, Benjamin Gilles, Olivier Hamant, Arezki Boudaoud, Jan Traas und Christophe Godin. “A Computational Framework for 3D Mechanical Modeling of Plant Morphogenesis with Cellular Resolution.” In: *PLoS Computational Biology* 11.1 (2015). URL: <http://dblp.uni-trier.de/db/journals/ploscb/ploscb11.html#BoudonCAGHBTG15>.
- [5] Al Capp. In: *The Short Life and Happy Times of the Shmoo*. Overlook Books, 2003, S. 144. ISBN: 978-1585674626.
- [6] Weitao Chen, Qing Nie, Tau-Mu Yi und Ching-Shan Chou. “Modelling of Yeast Mating Reveals Robustness Strategies for Cell-Cell Interactions”. In: *PLoS Comput Biol* 12.7 (2016), e1004988.
- [7] Andreas Dedner, Robert Klöforn und Martin Nolte. “The DUNE-ALUGrid Module.” In: *CoRR abs/1407.6954* (2014). URL: <http://dblp.uni-trier.de/db/journals/corr/corr1407.html#DednerKN14>.
- [8] Christian Diener, Gabriele Schreiber, Wolfgang Giese, Gabriel del Rio, Andreas Schröder und Edda Klipp. “Yeast Mating and Image-Based Quantification of Spatial Pattern Formation.” In: *PLoS Computational Biology* 10.6 (2014). URL: <http://dblp.uni-trier.de/db/journals/ploscb/ploscb10.html#DienerSGRSK14>.
- [9] Charles M. Elliott, Björn Stinner und Chandrasekhar Venkataraman. “Modelling cell motility and chemotaxis with evolving surface finite elements”. In: *the royal society* 9.76 (2012).
- [10] Charles M. Elliott, Carsten Gräser, Graham Hobbs, Ralf Kornhuber und Maren-Wanda Wolf. *A Variational Approach to Particles in Lipid Membranes*. Mai 2016. DOI: [10.1007/s00205-016-1016-9](https://doi.org/10.1007/s00205-016-1016-9). arXiv: [1512.02375v2](https://arxiv.org/abs/1512.02375v2) [math.AP]. URL: <http://arxiv.org/abs/1512.02375v2>; <http://arxiv.org/pdf/1512.02375v2>.

- [11] Stefan Engblom, Lars Ferm, Andreas Hellander und Per LÅ¶tstedt. "Simulation of stochastic reaction-diffusion processes on unstructured meshes". In: *Revised version in SIAM J. Sci. Comput.* 31(3):1774-1797, 2009 (Apr. 2008). DOI: [10.1137/080721388](https://doi.org/10.1137/080721388). arXiv: [0804.3288v1](https://arxiv.org/abs/0804.3288v1) [math.NA]. URL: <http://arxiv.org/abs/0804.3288v1>; <http://arxiv.org/pdf/0804.3288v1>.
- [12] Wolfgang Giese, Martin Eigel, Sebastian Westerheide, Christian Engwer und Edda Klipp. "Influence of cell shape, inhomogeneities and diffusion barriers in cell polarization models". In: *Physical Biology* 12.6 (2015).
- [13] Björn Goldenbogen, Wolfgang Giese, Marie Hemmen, Jannis Uhlendorf, Andreas Herrmann und Edda Klipp. "Dynamics of cell wall elasticity pattern shapes the cell during yeast mating morphogenesis." In: *Open Biol* vol. 6.no. 9 (Sep. 2016). DOI: [10.1098/rsob.160136](https://doi.org/10.1098/rsob.160136).
- [14] Andrew B. Goryachev und Marcin Leda. "Gradient Sensing: Engineering the Yeast Love Affair". In: *Current Biology* 26 (2016), S. 461-465.
- [15] Andrew B. Goryachev und Alexandra V. Pokhilko. "Dynamics of Cdc42 network embodies a Turing-type mechanism of yeast cell polarity". In: *Science Direct FEBS Letters* 582.10 (2008), S. 1437-1443.
- [16] W. Helfrich. "Elastic Properties of Lipid Bilayers: Theory and Possible Experiments". In: *Zeitschrift für Naturforschung C* 28.11-12 (1973), S. 693-703.
- [17] Marie Hemmen. "Eine quantitative Beschreibung der Paarungsmorphologie von *Saccharomyces cerevisiae*". Masterarbeit. Theoretische Biophysik, 2017.
- [18] Martin Hermann. In: (2004).
- [19] Lori B. Huberman und Andrew W. Murray. "Genetically Engineered Transvestites Reveal Novel Mating Genes in Budding Yeast". In: *Genetics* vol. 195.no. 4 (Dez. 2013), S. 1277-1290.
- [20] Thomas Jenni. *Einführung in die Finite-Elemente-Methode - Mentorierte fachwissenschaftliche Arbeit mit pädagogischem Fokus*. 2011.
- [21] Ben Klünder, Tina Freisinger, Roland Wedlich-Söldner und Erwin Frey. "GDI-Mediated Cell Polarization in Yeast Provides Precise Spatial and Temporal Control of Cdc42 Signaling." In: *PLoS Computational Biology* 9.12 (2013). URL: <http://dblp.uni-trier.de/db/journals/ploscb/ploscb9.html#KlunderFWF13>.
- [22] Peter Knabner und Lutz Angermann. In: *Numerik partieller Differentialgleichungen*. Springer, 2000. ISBN: 978-3-642-57181-7.
- [23] Max Koecher und Aloys Krieg. In: *Ebene Geometrie*. Springer, 2007, S. 197-240. ISBN: 978-3-540-49327-3.

- [24] Helmut Martin. In: *Numerische Strömungssimulation in der Hydrodynamik*. Springer, 2011. Kap. 6, S. 73–132. ISBN: 978-3-642-17207-6.
- [25] Laura Merlini, Bitu Khalili, Felipe O. Bendezu, Daniel Hurwitz, Vincent Vincenzetti, Dimitrios Vavylonis und Sophie G. Martin. “Local pheromone release from dynamic polarity sites underlies cell-cell pairing during yeast mating”. In: *CellPress* (2016).
- [26] Susan Michaelis und Jemima Barrowman. “Biogenesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Pheromone α -Factor, from Yeast Mating to Human Disease”. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76.3 (Sep. 2012), S. 626–651.
- [27] Yoichiro Mori, Alexandra Jilkine und Leah Edelstein-Keshet. “Asymptotic and Bifurcation Analysis of Wave-Pinning in a Reaction-Diffusion Model for Cell Polarization.” In: *SIAM Journal of Applied Mathematics* 71.4 (2011), S. 1401–1427. URL: <http://dblp.uni-trier.de/db/journals/siamam/siamam71.html#MoriJE11>.
- [28] Nicolas Muller, Matthieu Piel, Vincent Calvez, Raphael Voituriez, Joana Goncalves-Sa, Chin-Lin Guo, Xingyu Jiang, Andrew Murray und Nicolas Meunier. “A Predictive Model for Yeast Cell Polarization in Pheromone Gradients”. In: (2016), S. 1–21.
- [29] Alejandra C. Ventura, Alan Bush, Gustavo Vasen, Matías A. Goldín, Brianne Burkinshaw, Nirveek Bhattacharjee, Albert Folch, Roger Brent, Ariel Chernomoretz und Alejandro Colman-Lerner. “Utilization of extracellular information before ligand-receptor binding reaches equilibrium expands and shifts the input dynamic range”. In: *PNAS* 111.37 (2014), S. 3860–3869.

EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich die vorliegende schriftliche Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, sind durch Quellenangaben im Text deutlich gemacht. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch in keinem anderen Studiengang als Prüfungsleistung eingereicht worden.

Berlin, April 2017

Stefan Forgó