

INAUGURAL – DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Math. Oliver Slaby
aus
Eberbach

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2008

**Einsatz von Methoden des Wissenschaftlichen
Rechnens zur Untersuchung dissipativer
Strukturen in Immunzellen**

Gutachter: PD Dr. Dirk Lebiedz
Prof. Dr. Rolf Rannacher

“You must believe what you see.”

Unbekannter indischer Doktorand

Zusammenfassung

Experimentelle Beobachtungen exotischer metabolischer Wellenphänomene zusammen mit gegenseitig phasengekoppelten NAD(P)H- und Calcium-Oszillationen in menschlichen Neutrophilen wurden publiziert. Da diese Phänomene Basis einer Kontroverse über ihre Charakteristiken und ihr Auftreten sind, stellt diese Arbeit eine mathematische Studie dieser Phänomene dar. Ziel des theoretischen raumzeitlichen Modellierungsansatzes ist es, einen plausiblen biochemischen Mechanismus zu entwickeln, der prinzipiell das Auftreten solcher Oszillationen und Wellenphänomene in Neutrophilen erklären kann. Das mathematische Modell schlägt dabei einen Calcium-kontrollierten Glucose-Einfluss in die Zelle als treibende Kraft der metabolischen Oszillationen vor und die reichhaltigen NAD(P)H-Wellenphänomene werden durch eine mögliche Rolle der Zellgeometrie und räumlich inhomogener Enzymverteilung erklärt. Die Modellierungsergebnisse sollen weitere Diskussionen zu den kontrovers diskutierten Phänomenen und experimentelle Bemühungen anregen, um die Existenz und die Charakteristiken von intrazellulären Dynamiken aber auch die biochemische Basis der zeitlichen und raumzeitlichen Calcium-Signalen und metabolischen Dynamiken in Neutrophilen aufzuklären. Unabhängig der experimentellen Beobachtungen in Neutrophilen stellt diese Arbeit eine generelle Studie zum Auftreten solcher Phänomene in Zellen dar, da keine Annahmen getroffen werden, die absolut spezifisch für Neutrophile sind.

Abstract

Recently, exotic metabolic wave phenomena together with mutually phase-coupled NAD(P)H- and calcium-oscillations have been observed in human neutrophils. Since these phenomena are the basis of a controversy about their characteristics and occurrence, this work presents a mathematical feasibility study concerning these phenomena. The aim of the theoretical spatiotemporal modeling approach is to propose a possible and plausible biochemical mechanism which would in principle be able to explain such oscillations and wave phenomena in neutrophils. Our modeling suggests the possibility of a calcium-controlled glucose influx as a driving force of metabolic oscillations and a potential role of polarized cell geometry and differential enzyme distribution for various NAD(P)H wave phenomena. The modeling results are supposed to stimulate further controversial discussions of the phenomena and experimental efforts to finally clarify the existence and characteristics of intracellular dynamics and the biochemical basis of any kind of temporal and spatiotemporal patterns of calcium signals and metabolic dynamics in neutrophils. Independent of experimental observations in neutrophils, they present a general feasibility study of such phenomena in cells since model assumptions are not exclusively neutrophil specific.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorandenzeit unterstützt und begleitet haben und somit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu Beginn möchte ich mich bei PD Dr. Dirk Lebiedz bedanken, auf dessen wissenschaftliche Betreuung aber auch auf dessen Freundschaft ich mich immer verlassen konnte.

Herzlich danke ich meinem ursprünglichen Doktorvater Prof. Dr. Dr. h.c Jürgen Warnatz, der Ende 2007 leider verstorben ist, und Prof. Dr. Rolf Rannacher vom Interdisziplinären Zentrum für Wissenschaftliches Rechnen (IWR) der Universität Heidelberg, die mir die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit gegeben haben.

Den Mitarbeitern der Forschungsgruppe „Reaktive Strömungen“ möchte ich mich herzlichst für ihr freundliches und konstruktives Arbeitsumfeld danken. Hier möchte ich besonders Dr. Julia Kammerer, Jochen Siehr, Volkmar Reinhard, Lavinia Ciossu und Dr. Mario Mommer danken, mit denen ich während dieser Zeit näher zusammenarbeiten durfte und die mir bei diversen Problemen geholfen haben. PD Dr. Uwe Riedel und Ingrid Hellwig möchte ich für die Unterstützung in verwaltungstechnischen Dingen danken, mit denen ich vollkommen überfordert war.

Beim Internationalen Graduiertenkolleg IGK 710 „Complex Processes: Modeling, Simulation and Optimization“ bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung, die ich während meiner Zeit in Heidelberg erhalten durfte.

Den Arbeitsgruppen „Simulation und Optimierung“ von Prof. Dr. Dr. h.c Hans Georg Bock und „Numerische Mathematik“ von Prof. Dr. Rolf Rannacher am IWR danke ich für die Bereitstellung ihrer Softwarepakete MUSCOD-II und GASCOIGNE. Hier möchte ich Dr. Sebastian Sager, Jan Albersmeier, Andreas Potschka, Dr. Thomas Dunne, Frederic Weller und Dr. Dominik Meidner besonders danken, da sie mir bei vielen Problemen bei der Verwendung der Software geholfen haben.

Der Freiburger Initiative für Systembiologie (FRISYS) danke ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Zeit in Freiburg.

Den beiden in Freiburg arbeitenden Doktoranden Marc Fein und Dominik Skanda danke ich für das Korrektur lesen von Teilen der Arbeit.

Abschließend möchte ich mich bei meiner zukünftigen Frau Patricia bedanken, auf deren Liebe und Unterstützung ich mich während meiner Promotionszeit immer verlassen konnte und die immer an mich geglaubt hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Überblick über die Arbeit	4
2	Selbstorganisation in der Natur	5
2.1	Strukturbildung in der Chemie und Biologie	5
2.1.1	Räumlich homogene Strukturbildung	5
2.1.2	Räumlich inhomogene Strukturbildung	8
2.2	Entwicklung der mathematischen Modellierung von Struktur- bildungsprozessen	17
3	Theorie der Nichtlinearen Dynamik	22
3.1	Nichtlineare dynamische Systeme	22
3.2	Phasenraumstrukturen	24
3.3	Bifurkationen	28
3.4	Auftreten von Wellenlösungen in erregbaren Medien	30
3.4.1	Einführung	30
3.4.2	Exotische Wellenlösung in Modellgleichungen	33
4	Mathematische Grundlagen	37
4.1	Theoretische Grundlagen für gewöhnliche Differentialgleichun- gen	37
4.1.1	Einführung	37
4.1.2	Existenz und Eindeutigkeit	38
4.2	Numerische Lösung von Anfangswertproblemen	39
4.2.1	Steife Differentialgleichungen	39
4.2.2	Extrapolationsverfahren	40
4.3	Theorie und numerische Lösung von Optimalsteuerungspro- blemen	46
4.3.1	Einführung in Optimalsteuerungsprobleme	47
4.3.2	Numerische Behandlung von Optimalsteuerungsproble- men	51

4.3.3	Sequentielle Quadratische Optimierung	51
4.4	Mathematische Behandlung von partiellen Differentialgleichungen	52
4.4.1	Charakterisierung	52
4.4.2	Numerische Lösung von partiellen Differentialgleichungen	54
5	Strukturbildung in Immunzellen	60
5.1	Immunabwehr durch neutrophile Granulozyten	60
5.1.1	Das Neutrophil	60
5.1.2	Aktivierung von Neutrophilen	66
5.2	Biochemischer Hintergrund	68
5.3	Experimentelle Beobachtungen	69
5.3.1	Oszillationen	69
5.3.2	Wellen	73
5.3.3	Andere theoretische Arbeiten	76
6	Grundlagen der Modellbildung	79
6.1	Glykolyse und Pentosephosphatweg	79
6.2	Kinetische und enzymkinetische Modellierung	83
6.2.1	Massenwirkungskinetik	84
6.2.2	Enzymkinetik	85
6.3	Darstellung des mathematischen Modells	87
6.3.1	Modellierung der Glykolyse	87
6.3.2	Modellierung der Calciumdynamik	90
6.3.3	Kopplung des metabolischen und des Calcium Modells	93
6.3.4	Diskussion der verwendeten Parameter	94
7	Numerische Ergebnisse	96
7.1	Modellierung der Wellenausbreitung	96
7.2	Geometrische Überlegungen	99
7.3	Wellenreflektion aufgrund von Enzymtranslokation	103
7.4	Analyse der Regulation der intrazellulären Glucosekonzentration	108
7.5	NAD(P)H-Oszillationen basierend auf einer dynamisch regulierten Glucosekonzentration	111
7.6	Kopplung von Metabolismus und Calciumdynamik	112
7.7	Diskussion der Ergebnisse	117
8	Zusammenfassung und Ausblick	119
8.1	Zusammenfassung der Arbeit	119
8.2	Ausblick	121

A	Modellgleichungen	123
A.1	Glykolyse	123
A.2	Calcium-Signaltransduktion	124
B	Modellparameter	125
C	Startwerte	126
D	Weitere Abbildungen	127
E	Index der Symbole und Akronyme	129
E.1	Symbole	129
E.2	Akronyme	130
	Literaturverzeichnis	131

Kapitel 1

Einleitung

Strukturbildung ist ein weit verbreitetes Phänomen in der Natur und seit einiger Zeit Gegenstand intensiver Forschung [13]. Durch thermodynamische Prinzipien, wie z.B. den zweiten Hauptsatz der Thermodynamik, lassen sich viele der Strukturbildungsprozesse erklären und vorhersagen. Spontane Strukturbildung tritt unter natürlichen oder Laborbedingungen auf und stellt ein spezielles Charakteristikum für Systeme dar, die sich weit entfernt vom thermodynamischen Gleichgewicht befinden. Diese Systeme sind typischerweise durch einen Fluss von Masse und Energie zwischen System und Umgebung charakterisiert und können als offene und „dissipative“ Systeme klassifiziert werden. Ein bekanntes offenes System in der Natur sind lebende Zellen [142]. Diese Bedingungen erlauben die Bildung von Oszillationen und Wellen, die „dissipative Strukturen“ genannt werden, da sie einen Teil der Energie für die Bildung von Strukturen im System selbst nutzen [111].

Da man bei lebenden Zellen häufig kaum oder nur sehr schwer Messungen und Manipulationen vornehmen kann, hat in jüngerer Zeit die mathematische Modellierung und Simulation von biochemischen Prozessen immer mehr an Gewicht gewonnen. Vor allem das interdisziplinäre Forschungsgebiet „Nichtlineare Dynamik“ [159] wurde mehr und mehr zu einem wichtigen Stützpfeiler bei der Untersuchung von intrazellulären biochemischen Strukturbildungsprozessen. Durch eine kinetische Modellierung werden mathematische Gleichungen formuliert, die für die Untersuchung dieser Phänomene theoretisch oder numerisch analysiert werden. Somit fordert dieses Arbeitsgebiet ein hohes Maß an Interdisziplinarität und für die Simulation und Analyse der Modelle ist deshalb eine enge Zusammenarbeit der Bereiche Biologie, Chemie und Mathematik erforderlich.

Fernziel dieser Modellierung ist es, ein möglichst gutes Modell von biologischen Systemen zu erhalten, um *in silico*, das heißt am Computer, die Zusammenhänge des Lebens zu verstehen und virtuelle Experimente durchzuführen.

So hofft man durch ein detailliertes Verständnis der Zusammenhänge zum Beispiel Medikamente mit geringeren oder keinen Nebenwirkungen entwickeln zu können. Dieser neue Forschungszweig wird seit kurzem mit dem Begriff der *Systembiologie* [75, 76] bezeichnet.

Ein spezieller Typ von lebenden Zellen, von dem in Publikationen berichtet wurde, dass er eine Vielzahl von strukturbildendem Verhalten zeigt, sind spezielle weiße Blutkörperchen (Leukozyten), die sogenannten neutrophilen Granulocyten [24]. Neutrophile bilden die erste zelluläre Schranke der Immunabwehr im Kampf gegen Mikroorganismen (Pathogene), die in den menschlichen Organismus eingedrungen sind. Normalerweise zirkulieren sie im Blutkreislauf und haben somit die Möglichkeit schnell zu jedem Infektionsherd im Körper zu gelangen. Sie verlassen das vaskuläre System am Ort der Entzündung, indem sie an der inneren Wand der Blutgefäße adhäreren, eine flache und polarisierte Gestalt annehmen und chemotaktisch in Richtung des Infektionsherd durch die extrazelluläre Matrix wandern. Nachdem die Pathogene durch Rezeptoren auf der zellulären Oberfläche erkannt wurden, werden sie durch Phagozytose aufgenommen und durch die Bildung von Phagosomen und die Produktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten getötet.

Vor kurzem wurde durch Petty et al. von experimentellen Beobachtungen von selbstorganisierenden Strukturen in Form von raumzeitlichen NAD(P)H Konzentrationswellen in Neutrophilen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie berichtet [123, 125]. NAD(P)H bezeichnet hier die Summe von Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und dessen 2-Phosphat (NADPH), die in Fluoreszenzmikroskopiemessungen nicht unterschieden werden können. Zusätzlich zu den raumzeitlichen Strukturen wurden auch sinusförmige zeitliche NAD(P)H-Oszillationen mit einer Periode von 20 und 10 Sekunden durch fluorimetrische Messungen der NAD(P)H Autofluoreszenz der ganzen Zelle gemessen [120].

Interessanterweise publizierten Petty et al. ähnliche oszillierende Eigenschaften für zelluläre Calcium-Signale. Sie beobachteten, dass Calcium-Oszillationen mit derselben Frequenz und einer konstanten Phasenbeziehung zu NAD(P)H auftreten [120]. Beide Oszillatoren zeigen konsistent eine Erhöhung der Oszillationsfrequenz von einer Periode von 20 auf 10 Sekunden nach Aktivierung mit Hilfe von proinflammatorischen Substanzen wie z.B. FMLP oder Cytokine [3, 121], wobei die Phasenkopplung erhalten bleibt.

Nach Einsatz der sogenannten „*Hochgeschwindigkeitsfluoreszenzmikroskopie*“ [122], die ein Fluoreszenzmikroskop mit einer Hochgeschwindigkeitskamera kombiniert, berichtete die Petty-Gruppe von NAD(P)H-Wellen im nicht aktivierten Zustand, die ausschließlich am Ende der Zelle ausgelöst werden und unidirektional in Richtung der Front der Zelle mit einer Geschwindigkeit von ungefähr $15 - 50 \mu\text{m/s}$ propagieren [123, 125]. Jede Welle wird nach Erreichen

der Front ausgelöscht und eine neue Welle am Ende der Zelle ausgelöst. Nach proinflammatorischer Stimulation treten zwei Wellen auf, die in entgegengesetzte Richtungen propagieren, am Rand reflektiert werden und bei Kollision sich nicht gegenseitig auslöschen, wie es oft in Reaktions-Diffusions-Systemen beobachtet wird, sondern sich Kreuzen ohne sich gegenseitig zu beeinflussen. Die beschriebenen Wellenphänomene sind mechanistisch nicht verstanden, aber sie repräsentieren eventuell einen Signalpfad, der von der Zelle verwendet wird, um räumlich heterogene extrazelluläre Signale, wie z.B. Konzentrationsgradienten von chemotaktisch aktiven Substanzen, in intrazelluläre Signale zu übersetzen.

Um ein vollständiges Verständnis der berichteten dynamischen Phänomene zu erhalten und unter dem Aspekt, dass andere raumzeitliche Messungen in Neutrophilen Teil einer Kontroverse über deren Auftreten und Charakteristiken sind [54, 132], wird in dieser Arbeit mathematische Modellierung angewandt, um mögliche unterliegende Mechanismen zu analysieren, die prinzipiell die beobachteten raumzeitlichen Strukturen erklären können. In dieser Arbeit soll zudem besonders betont werden, dass ein einheitlicher Modellierungsansatz gemacht wird, der die experimentellen Daten sowohl der raumzeitlichen als auch der rein zeitlichen Dynamik mit einschließt und dadurch eine Vielzahl der dynamischen Phänomene systematisch erklären kann. Diese ganzheitliche „Systembetrachtung“ ist der Kern der in der heutigen Zeit immer wichtiger werdenden *Systembiologie* und ein fundamentales Verständnis der Signaltransduktion sowie der metabolischen Dynamik kann nur erreicht werden, indem Studien durchgeführt werden, die Dynamiken in Raum und Zeit berücksichtigen. Die Modellierung mit gewöhnlichen Differentialgleichungen unter der Annahme einer homogenen Dynamik, die in diesem Forschungsbereich weit verbreitet ist, ist vor allem in den in dieser Arbeit untersuchten Prozesse nicht angebracht, da die beobachteten zeitlichen Phänomene, d.h. Oszillationen, das Ergebnis der unterliegenden raumzeitlichen Dynamik sind.

Deshalb wird hier erstmals ein einheitlicher raumzeitlicher Modellierungsansatz entwickelt, der die komplexe Wellenausbreitung und die Oszillationen in Neutrophilen beschreiben kann und es wird außerdem untersucht wie spezielle Charakteristiken, wie z.B. Wellenreflektion am Rand und Frequenzänderungen der Oszillationen, erklärt werden können [152]. Damit wird eine theoretische Grundlage der beobachteten Dynamiken entwickelt und, da keine Annahmen gemacht werden, die ausschließlich Neutrophil-spezifisch sind, ist das Auftreten dieser Phänomene potentiell in einer Vielzahl von biochemischen Systemen möglich.

1.1 Überblick über die Arbeit

In Kapitel 2 wird ein Überblick über die Reichhaltigkeit von Strukturbildungsprozessen in der Natur gegeben. Dabei werden sowohl Beispiele für rein zeitliche Dynamiken, d.h. Oszillationen, als auch für raumzeitliche Strukturen vorgestellt. Da in dieser Arbeit vor allem die Wellendynamik in Neutrophilen modelliert werden soll, wird der Fokus auf sie und vor allem deren Charakteristiken gelegt, damit die speziellen Eigenschaften der Wellenausbreitung in Neutrophilen besser verstanden werden können.

Da in dieser Arbeit mathematische Modellierung von strukturbildendem Verhalten, die durch die Nichtlinearität der darin beteiligten Prozesse entsteht, vorgestellt wird, wird im dritten Kapitel eine kurze Einführung in die zugrundeliegende Theorie der nichtlinearen Dynamik gegeben. Dadurch soll es dem Leser möglich sein, das Auftreten von Strukturbildung als Lösungen von mathematischen Modell-Gleichungen zu verstehen.

Die in der mathematische Modellierung auftretenden Gleichungen werden aufgrund der Tatsache, dass sie schlecht theoretisch zu behandeln sind, mit Hilfe von numerischen Methoden gelöst. Dazu wird in Kapitel 4 der notwendige Hintergrund zur numerischen Behandlung der auftretenden gewöhnlichen und partiellen Differentialgleichungen gegeben, die in dieser Arbeit Anwendung gefunden haben. Darüberhinaus wird eine kurze Abhandlung zur numerischen Behandlung von Optimalsteuerungsproblemen gegeben, die ebenfalls in dieser Arbeit eingesetzt wurden.

In Kapitel 5 wird zu Beginn eine kurze Einführung in die Immunabwehr durch Neutrophile gegeben, wobei auf deren prinzipiellen Funktionsweisen eingegangen werden soll. Anschließend werden die experimentellen Beobachtungen zur Strukturbildung in Neutrophilen diskutiert.

In Kapitel 6 werden zu Beginn die kinetischen Grundlagen chemischer Reaktionen diskutiert und eine Einführung in die Massenwirkungs- und Enzymkinetik gegeben. Anschließend ist im Detail das entwickelte kinetische Modell der Glykolyse und der Calcium-Signaltransduktion in Neutrophilen dargestellt.

Die numerischen Ergebnisse zur Strukturbildung in Neutrophilen sind in Kapitel 7 gegeben. Darüberhinaus werden hier die Ergebnisse diskutiert und mit experimentellen Daten und Messreihen belegt.

Anschließend ist im Kapitel 8 eine Zusammenfassung der Arbeit dargestellt und es wird ein kurzer Ausblick auf weitere möglicherweise zu untersuchende Aspekte gegeben.

Kapitel 2

Selbstorganisation in der Natur

In diesem Kapitel wird ein allgemeiner Überblick über die reichhaltig vorkommenden Strukturbildungsphänomene in der Natur und vor allem in der Chemie und Biologie gegeben. Hier können natürlich nicht alle in der Literatur vorhandenen Beispiele von Strukturbildungsprozessen dargestellt werden und somit soll mit Hilfe ausgewählter Beispiele verdeutlicht werden, dass Strukturbildung ein fundamentales Prinzip in der Natur ist, obwohl bis heute überwiegend nur die Phänomenologie untersucht wird und vor allem Funktionen weitestgehend unbekannt sind. Anschließend werden experimentelle Beobachtungen von „exotischem“ Verhalten vorgestellt, die auch in dieser Arbeit untersucht werden, um zu verdeutlichen, warum die hier untersuchten Phänomene eine besondere Beachtung erhalten. Abschließend wird ein kurzer Überblick über die zeitliche Entwicklung von mathematischer Modellierung von Strukturbildungsprozessen gegeben.

2.1 Strukturbildung in der Chemie und Biologie

2.1.1 Räumlich homogene Strukturbildung

Unter räumlich homogener Strukturbildung versteht man das Auftreten von Strukturen, die nur in einer zeitlichen Entwicklung beobachtet werden. Diese Strukturen sind weitestgehend als periodische Prozesse bekannt. Sie treten in fast allen Bereichen der Biologie und Chemie auf und haben Perioden von Bruchteilen von Sekunden bis hin zu Jahren [47]. Sehr bekannte Rhythmen beim Menschen sind zum Beispiel das Schlagen des Herzens oder der Wach-Schlaf Rhythmus, dem unser ganzer Tagesablauf unterliegt. Das oszillierende Verhalten ist aber häufig kein einfaches periodisches Verhalten, sondern zeigt

komplexe Strukturen wie z.B. das *Bursting*, bei dem Phasen von hochfrequenten *Spikes* auftreten, der wiederum eine Phase mit keinerlei Dynamik folgt oder Strukturbildung, die keinerlei periodischer Natur unterliegt und somit chaotisches Verhalten zeigt [47].

Obwohl periodische Prozesse schon sehr lange bekannt sind, blieb der ihnen unterliegende Mechanismus oft unklar. Einer der bekanntesten und am besten untersuchten Prozesse ist hier wahrscheinlich der 24-Stunden Rhythmus, der vor allem bei der Fruchtfliege *Drosophila* Teil intensiver Forschung ist. Hier sind neben experimentellen Arbeiten vor allem auch theoretische Ergebnisse zu topologischen prinzipiell notwendige Strukturen des Phasenraums einschließlich Singularitäten [175], aber auch mathematische Modellbildung [48] und sogar mathematische Optimierung [147] zu nennen. Es ist wahrscheinlich, dass diese 24-Stunden Rhythmen durch eine Vielzahl von Mechanismen produziert werden, aber eine komplexe Regulation der Protein und mRNS Synthese scheint ein einheitlicher Schlüsselmechanismus zu sein (siehe Abbildung 2.1 (links) für ein Beispiel der periodischen RNS-Synthese der Schlüsselenzyme per^+ und per^S) [51].

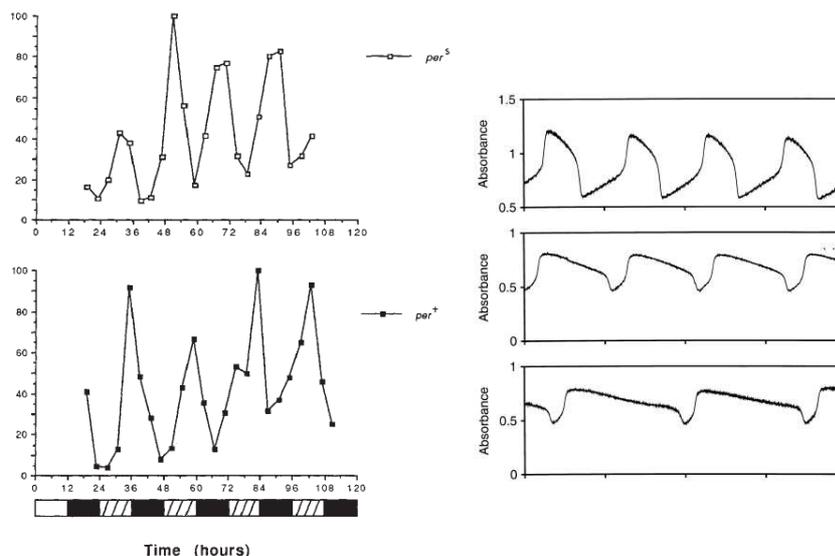


Abbildung 2.1: Links: Beispiel der periodischen Synthese von Protein-RNS in der Fruchtfliege *Drosophila*. Rechts: Experimentelle Beispiele für sinusförmige Oszillationen in der Glykolyse mit unterschiedlichen Perioden in Abhängigkeit von den Anfangsbedingungen. Die Abbildungen sind aus [51] und [112] entnommen.

Das wahrscheinlich am besten *in vitro* untersuchte biochemische System, das periodisches Verhalten zeigt, ist der Energiestoffwechsel in Hefezellen, die

sogenannte *Glykolyse*. Die in diesem chemischen Reaktionsweg häufig auftretenden Oszillationen der beteiligten Spezies resultieren aus der nichtlinearen Regulation der Enzymaktivität der an der Glykolyse beteiligten Enzyme. Es wurde publiziert, dass in ein und demselben biochemischen System eine Vielzahl von periodischen Strukturen abhängig von den Anfangsbedingungen entstehen können. So werden zum Beispiel Oszillationen beobachtet, die je nach Bedingungen unterschiedliche Perioden zeigen (siehe Abbildung 2.1 (rechts)), aber es können auch komplexe oder chaotische Oszillationen (siehe Abbildung 2.2) entstehen.

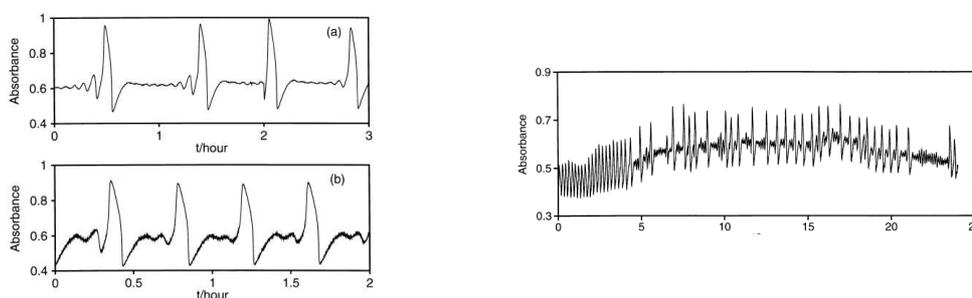


Abbildung 2.2: Experimentelle Beispiele von komplexen Oszillationen, die durch die Enzymregulation in der Glykolyse entstehen. Die Abbildungen sind aus [112] entnommen.

Als das klassische und historische Beispiel für Oszillatoren in chemischen Systemen sei hier die Belousov-Zhabotinsky-Reaktion (BZR) genannt [110]. Es handelt sich dabei um eine Klasse von Reaktionen, bei denen eine Dicarbonsäure durch Bromat in saurer Lösung oxidiert wird, wobei als Katalysator ein Redoxsystem anwesend ist, dessen oxidierte und reduzierte Form sich nur um eine Oxidationsstufe unterscheiden. Solche Systeme sind z. B. Ce(III)/Ce(IV) oder Mn(II)/Mn(III). Benannt wurde diese Reaktionsklasse nach den beiden sowjetischen Wissenschaftlern Boris Belousov, welcher die erste dieser Reaktionen entdeckte, und Anatol Zhabotinsky, der ihre Bedeutung erkannte und weiter untersuchte [179]. Die an diesem Reaktionsweg beteiligten Substanzen zeigen ebenfalls dynamisches Verhalten, das abhängig von den jeweiligen Bedingungen unterschiedliche Charakteristiken wie Perioden und Form der Oszillationen hervorbringt (siehe Abbildung 2.3 (links)).

Ein weiteres biologisches Beispiel, welches auch in den in dieser Arbeit betrachteten Immunzellen auftritt, sind Strukturbildungsprozesse im Calcium-Signaltransduktionssystem. Dieser Signalpfad ist einer der wichtigsten bekannten Signaltransduktionswege in Zellen, da eine große Anzahl an zel-

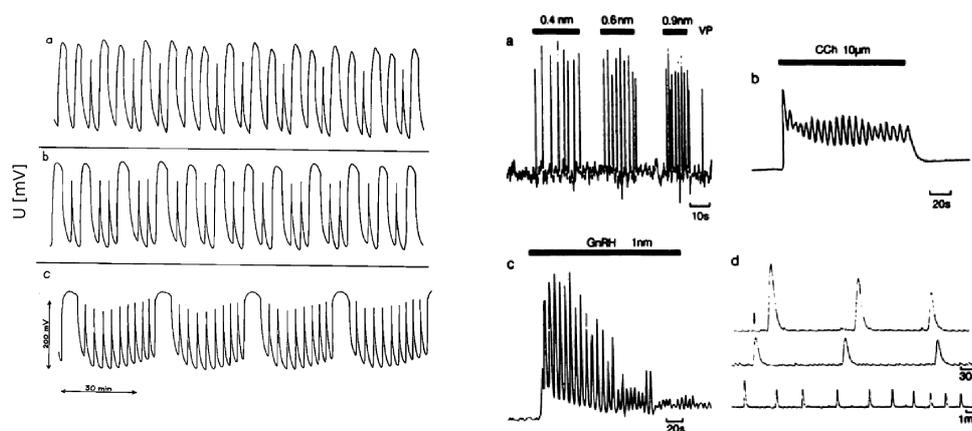


Abbildung 2.3: Links: Beispiel des periodischen Verhaltens in der Belousov-Zhabotinsky-Reaktion. Rechts: Beispiel für einige typische Calcium-Oszillationen in Leberzellen der Ratte (a), Zellen aus Speicheldrüsenzellen der Ratte (b) gonadotrope Zellen der Ratte (c) und Hamster Eizellen (d). Die Abbildungen sind aus [139] und [18] entnommen.

lulären Funktionen durch die Calcium-Konzentration reguliert werden. Viele Zelltypen zeigen sehr komplexe intrazelluläre Calcium-Oszillationen, die durch einen komplex regulierten Einfluss in die Zelle aus intrazellulären Speichern oder aus dem extrazellulärem Medium und einem regulierten Auspumpen in die Speicher oder in das extrazelluläre Medium entstehen, nachdem dieser Mechanismus durch einen extrazellulären Stimulus, wie z.B. ein Hormon, aktiviert wurde. Die Oszillationen sind in fast allen Zellen nicht sinusförmig, sondern treten in Form von „Spikes“ auf, die durch einen schnellen Anstieg der Calcium-Konzentration und einem anschließenden ebenfalls sehr schnellen Abfall charakterisiert sind (siehe Abbildung 2.3 (rechts) für ausgewählte Beispiele von Calcium-Oszillationen).

Wie man an diesen Beispielen sehen kann, sind periodische Prozesse sowohl im intrazellulären, physiologischen als auch im chemischen Bereich in der Natur weit verbreitet. Neben diesen rein zeitlichen Strukturbildungsprozessen werden darüberhinaus aber auch raumzeitliche Strukturbildungen beobachtet. Ein kurzer Überblick über diese Strukturen wird im nächsten Kapitel gegeben.

2.1.2 Räumlich inhomogene Strukturbildung

In der Natur sind räumliche Strukturen ein weit verbreitetes Phänomen und werden in verschiedene Typen eingeteilt. Strukturen, die periodisch im Raum

aber stationär in der Zeit sind, sind die wahrscheinlich häufigsten Strukturen in zwei oder drei räumlichen Dimensionen. Eine weitere Klasse stellen Prozesse dar, die sich homogen im Raum und periodisch in der Zeit entwickeln und in Form von Oszillationen auftreten, wie im vorigen Kapitel kurz vorgestellt wurde. Die in dieser Arbeit untersuchten in menschlichen Immunzellen auftretenden Strukturen gehören zur Klasse der periodischen Strukturen in Raum und Zeit. Die einfachste Struktur, die man sich hier vorstellen kann, sind propagierende Wellen. Da in dieser Arbeit überwiegend Phänomene des dritten Typs untersucht werden, wird hier nur kurz auf Strukturen, die periodisch im Raum und stationär in der Zeit sind, eingegangen und am wohl interessantesten Beispiel, der Morphogenese, d.h. der Gestaltbildung in der Natur, diskutiert. Anschließend werden Prozesse vorgestellt, die propagierende Wellen produzieren und an Hand dieser Beispiele Charakteristiken diskutiert, die normalerweise für diese Strukturen gelten, aber auch Beispiele vorgestellt, die diese nicht zeigen.

Morphogenese

Morphogenese beschreibt vor allem die Entwicklung von Strukturen während des Wachstums eines Organismus. Hier ist die Hauptfrage, wie räumliche Differenzierung entstehen kann, obwohl zu Beginn der Entwicklung ein symmetrisches System vorhanden ist. In einer mathematischen Form beschäftigt sich die Morphogenese unter anderem mit Symmetriebrechung: Wie entscheidet die Natur bei einem symmetrischen System was der Kopf und was der Schwanz des Organismus wird? Neben diesen grundlegenden Fragen der Entwicklung von organisierten zellulären Strukturen und der damit verbundenen Frage der Entstehung von Leben, umgibt uns darüberhinaus eine Vielzahl von Strukturen, die keinerlei unmittelbar erkennbare Funktion zu haben scheinen. So entwickeln eine Vielzahl von Lebewesen Strukturen in ihrem Aussehen, wie z.B. Zebras, Leoparden oder Weichtiere (siehe Abbildung 2.4). Um das Auftreten von dieser Art von Strukturbildung in sich entwickelnden Organismen erklären zu können, wurde das Vorhandensein von chemischen Substanzen, den sogenannten Morphogenen, postuliert. Die lokale Konzentration dieser Morphogene bestimmt dann die zelluläre Entwicklung. Dieser Basismechanismus wurde im Jahre 1952 von Alan Turing [163] vorgeschlagen, der unter der Annahme eines Reaktions-Diffusions-Systems die Entwicklung von räumlicher Struktur erklären konnte. Da die chemische Identifizierung der Morphogene damals nicht möglich war, waren diese Untersuchungen phänomenologisch und beinhalten nur qualitative Information des zellulären Prozesses, wobei heutzutage häufig molekulare Information zur Entwicklung vorhanden sind. Nach Turing wurden ähnliche Ansätze ebenfalls reichhaltig



Abbildung 2.4: Beispiele für räumlich periodische Strukturen, die im Erscheinungsbild von Lebewesen auftreten. Strukturen bei Zebren (links), Leoparden (Mitte) und Weichtieren (rechts). Die Abbildungen sind aus [28] entnommen.

theoretisch untersucht und wurden ein fester Teil der Entwicklungsbiologie (siehe [46, 100, 107, 108] für ausführliche Reviews).

Neben den Strukturen der Morphogenese treten darüberhinaus auch in anderen physikalischen oder chemischen Prozessen Strukturen auf, die zum Teil besser verstanden sind. Als klassische Beispiele seien hierbei Strukturen wie Eis, Luftblasen oder selbstorganisierende Sandstreifen (siehe Abbildung 2.5) genannt, die durch Transport des Sandes vom Wind entstehen. Für eine anschauliche Einführung in das Auftreten von Strukturen in unserer Welt sei auf [13] verwiesen.

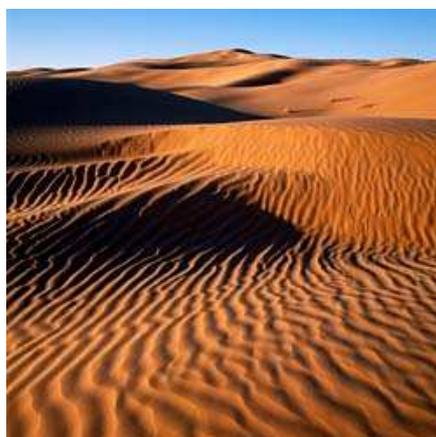


Abbildung 2.5: Streifen im Sand der Sahara sind selbstorganisierende Strukturen, die durch den Transport des Sandes durch Windstöße entstehen.

Wellen in der Chemie und Biologie

Die systematische Untersuchung von chemischen Prozessen, die periodisches Verhalten in Raum und Zeit zeigen, geht unter anderem auf Arbeiten zur Belousov-Zhabotinsky Reaktion zurück und steigerte sich bis zur heutigen Zeit sehr stark, da durch fortgeschrittenere Messmethoden immer mehr Wellenphänomene in verschiedenen Varianten beobachtet werden konnten. In der von Belousov und Zhabotinsky entdeckten Oxidationsreaktion von Malonsäure mit speziellen Katalysatoren, der sogenannten Belousov-Zhabotinsky-Reaktion (BZR), wurde gezeigt, dass es möglich ist, lokale Störungen zu initiieren, die dann mit konstanter Geschwindigkeit und konstanter Gestalt in Form eines zirkulären Pulses durch ein ungerührtes Reaktionsmedium propagieren. Interessanterweise existieren im selben System aber auch Zustände, bei dem diese Pulse periodisch von einem Zentrum aus (engl. häufig als *pacemaker* bezeichnet) ausgelöst werden. Die dann auftretenden Pulse haben häufig unterschiedliche Frequenzen, propagieren aber mit fast konstanter Geschwindigkeit durch das Medium (siehe Abbildung 2.6 für ein Beispiel der Wellenausbreitung in der BZR).

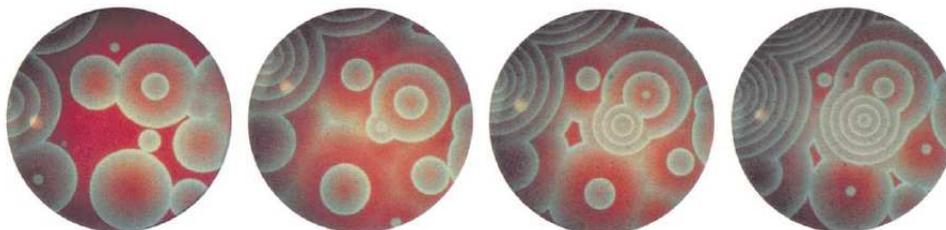


Abbildung 2.6: Zeitreihe der Wellenausbreitung in einer oszillierenden Belousov-Zhabotinsky-Reaktion. Die Abbildung ist aus [139] entnommen.

Anhand dieses Beispiels können schon die wichtigsten Eigenschaften eines Wellen generierenden Systems, das Reaktions-Diffusions basiert ist, beobachtet werden. Aus den schon erwähnten Eigenschaften der Wellenausbreitung mit einer konstanten Geschwindigkeit sieht man hier, dass eine punktuell ausgelöste Welle in alle Richtungen, die durch das unterliegende Medium erlaubt werden, mit konstanter Geschwindigkeit gleichmäßig propagiert. Dieses Verhalten resultiert in dem Ausbreiten einer sphärischen Welle. Eine weitere Eigenschaft vieler Reaktions-Diffusions-Systeme ist die Tatsache, dass sich kollidierende Wellen gegenseitig auslöschen. Ebenfalls werden Wellen häufig ausgelöscht, wenn sie den Rand des Reaktionsgefäßes erreichen.

Ein weiteres klassisches Beispiel aus der Chemie ist die durch Platin katalysierte Oxidation von Kohlenstoffmonoxid, bei der ebenfalls auf der Oberfläche

des Katalysators im Ultrahochvakuum Strukturbildung und Wellenausbreitung auftritt. Hier treten durch die nichtlineare Dynamik des Reaktionswegs eine Reihe von dynamischen Phänomenen wie z.B. Pulse, periodische Wellen und Spiralwellen auf, die durch Photoemissions-Elektronen-Mikroskopie im Ultrahochvakuum sichtbar gemacht werden können (siehe Abbildung 2.7).

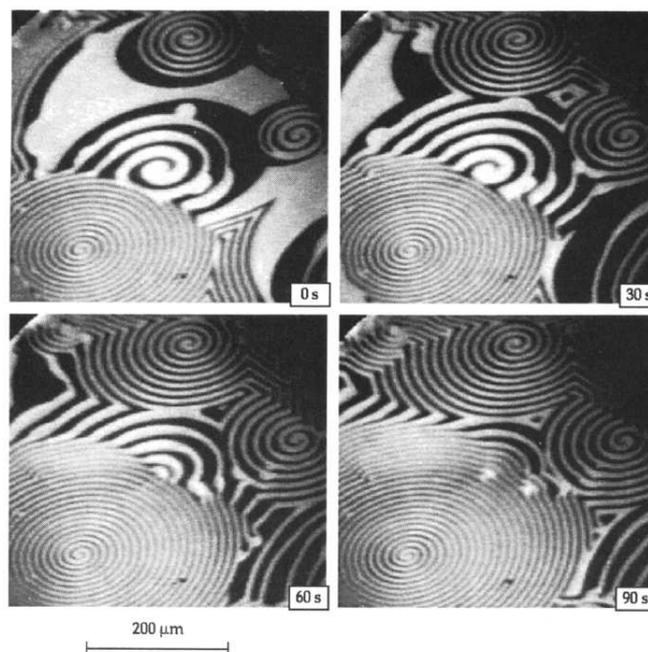


Abbildung 2.7: Zeitreihe der Sauerstoff-Wellenausbreitung während der Oxidation von CO auf Pt, die durch Photoemissions-Elektronen-Mikroskopie sichtbar gemacht werden. Die Abbildung ist aus [61] entnommen.

Hier können ebenfalls wie bei der BZ-Reaktion häufig die charakteristischen Eigenschaften wie gleichmäßige Ausbreitung in alle Richtungen mit einer konstanten Geschwindigkeit und Auslöschung bei Kollision beobachtet werden.

Als eines der am besten untersuchten Systeme in der Biologie gilt das strukturbildende Verhalten von beweglichen *Escherichia coli* Bakterien. Die Strukturbildung basiert auf der Chemotaxis der *E.coli* Bakterien. Chemotaxis bezeichnet das Verhalten, dass die *E.coli* Bakterien chemotaktisch aktive Substanzen sekretieren, wenn sie Nahrung finden und daraufhin andere *E.coli* Bakterien auf den entstehenden Gradienten dieser Substanzen reagieren und Strukturen von unterschiedlicher Zelldichte bilden. Interessanterweise hängt die Geometrie der Strukturen von den Anfangsbedingungen ab, wie z.B. der Konzentration des Wachstumssubstrats (siehe Abbildung 2.8, links).

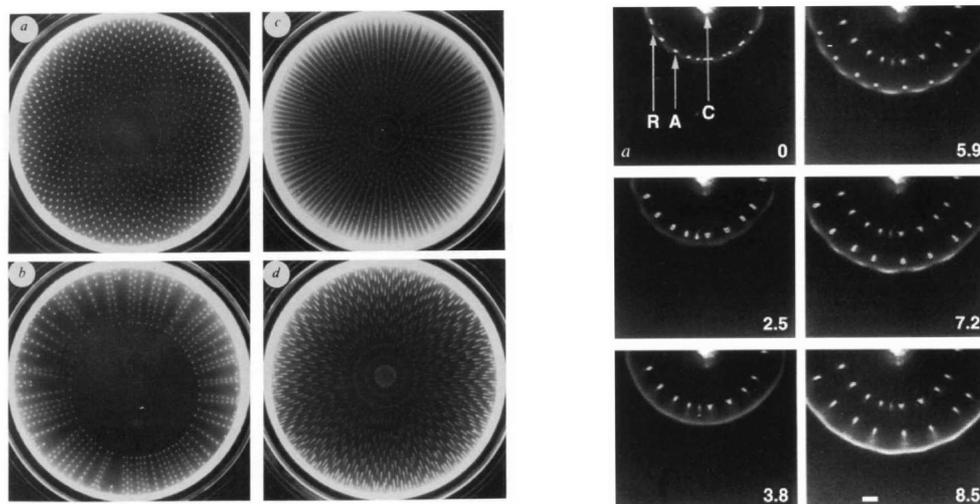


Abbildung 2.8: Links: Strukturen, die aus chemotaktisch migrierenden *E.coli* Bakterien entstehen. Rechts: Wellenausbreitung basierend auf dem chemotaktischen Verhalten von *E.coli* Bakterien. Nach der Zugabe einer Nahrungsquelle entsteht eine sphärische Welle aus Zelldichte, die aufgrund Instabilität zu Zelldichtepunkte zerfallen. Die Abbildungen sind aus [23] entnommen.

Dass sich diese Strukturen durch Wellenausbreitung mit konstanter Geschwindigkeit entwickeln, sieht man bei stärkerer Vergrößerung (siehe Abbildung 2.8, rechts). Nach Zugabe von Bakteriennahrung in einem Punkt in der Mitte des Reaktionsgefäßes, bilden sich Zelldichtepunkte und nachdem daraufhin die chemotaktisch aktiven Substanzen produziert wurden und die umliegenden Zellen reagiert haben, bildet sich eine sphärische Welle aus Zelldichte, die nach außen mit konstanter Geschwindigkeit propagiert und, wie bei allen anderen Systemen gesehen, nach Erreichen des Randes ausgelöscht wird. Da die Chemotaxisringe instabil sind, zerfallen sie in Zelldichtepunkte einer bestimmten Regularität. Abschließend entsteht die in Abbildung 2.8 (links) dargestellte stabile Struktur aus Zelldichte.

Ein weiteres biochemisches Beispiel, das Wellenausbreitung zeigt, ist der Reaktionsweg der Glykolyse in Hefezellen. Neben den rein zeitlichen Oszillationen (siehe Abbildungen 2.1 (rechts) und 2.2) zeigt dieser Reaktionsweg aufgrund der komplexen Regulation der beteiligten Enzyme und Heterogenitäten im Nährmedium auch Wellenausbreitung mit den charakteristischen Eigenschaften einer sphärischen Welle, die sich in alle räumlichen Richtungen gleichmäßig mit konstanter Geschwindigkeit ausbreitet. Auch kann man das typische Verhalten beobachten, dass zwei kollidierende Wellen sich auslöschen (siehe Abbildung 2.9).

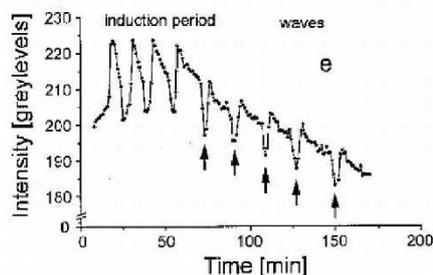
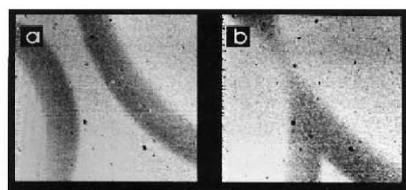


Abbildung 2.9: Links: Ausbreitung von sphärischen Wellen einer autofluoreszierenden Spezies basierend auf der Glykolyse in Hefezellen. Es kann beobachtet werden, dass sich zwei Wellen nach Kollision auslöschen. Das Zeitintervall zwischen den Aufnahmen beträgt 384 s. Rechts: Mittelt den zeitlichen Verlauf in einem räumlichen Gebiet erhält man zeitliche Oszillationen, denen aber die raumzeitliche Wellendynamik zugrunde liegt. Die Initiierung der Wellen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Abbildung ist aus [96] entnommen.

Interessanterweise zeigen diese Systeme nach Mittelung über das ganze Gebiet oszillierendes Verhalten, das aus der unterliegenden Wellenausbreitung resultiert, da nach Initiierung einer Welle die gemittelte Konzentration ansteigt und nach Auslöschung wieder absinkt.

In dieser Arbeit wird Wellenverhalten in menschlichen Immunzellen untersucht, das gemäß der publizierten experimentellen Daten von H. Petty et al. mehrere interessante Eigenschaften hat, die nicht typisch für strukturbildende Phänomene sind. Obwohl angenommen wird, dass die Wellenausbreitung in Neutrophilen ebenfalls aus der nichtlinearen Regulation der Glykolyse entstammt, propagieren die Wellen nicht in alle Richtungen gleichmäßig sondern werden immer an einer bestimmten Stelle ausgelöst. Darüberhinaus werden zwei kollidierende Wellen nicht ausgelöscht, wie in allen bisherigen Beispielen beobachtet, sondern sie kreuzen sich ohne sich gegenseitig zu beeinflussen. Da diese Eigenschaften untypisch für diese Systeme sind, entsteht neben der biologischen Relevanz auch ein rein theoretisches Interesse diese Phänomene mit Hilfe von mathematischer Modellierung zu verstehen.

Exotisches Verhalten

Im vorigen Kapitel wurde vorgestellt, dass Strukturbildungsprozesse basierend auf der Annahme eines Reaktions-Diffusions-Systems ein weitverbreiteter Mechanismus sind, bei dem bestimmte Charakteristika auftreten. In dieser Arbeit wird primär auf Strukturen eingegangen, die sowohl periodisch in der Zeit als auch im Raum sind, d.h. intrazelluläre Wellenausbreitung,

und es wird Verhalten untersucht, das als „*exotisch*“ für derartige Systeme gilt. Typisches Verhalten für diese Systeme, das im vorigen Kapitel an ausgewählten Beispielen verdeutlicht wurde, sind eine gleichmäßige Ausbreitung der Welle mit konstanter Geschwindigkeit in alle Richtungen und das Auftreten von Auslöschung nach Kollision von zwei Wellen oder nach Erreichen eines Randes des Systems. In bestimmten chemischen Systemen wird aber experimentell exotisches Verhalten wie Wellenreflektion am Rand und Nichtauslöschung bei Kollision beobachtet. Dieses spezielle Verhalten wird auch in dem in dieser Arbeit untersuchten System beobachtet und hier soll nun an weiteren Beispielen kurz dargestellt werden in welchen Fällen dieses Verhalten auftreten kann.

Die Oxidationsreaktion von CO auf Platin (siehe Abbildung 2.7) zeigt für bestimmte Bedingungen oszillierendes und strukturbildendes Verhalten, das durch die Photoemissions-Elektronen-Mikroskopie sichtbar gemacht werden kann [137]. In einem kleinen Bereich von Anfangsbedingungen zeigt das System einzelne Pulse, die mit einer konstanten Geschwindigkeit auf der Oberfläche propagieren und nach Kollision von zwei Wellen sich nicht auslöschen sondern reflektiert werden (siehe Abbildung 2.10, links). Warum zu diesen Parametern diese Wellen mit der Charakteristik der Nichtauslöschung auftreten, ist Teil aktueller Forschung und nicht verstanden. In [15] berichten die Autoren, dass im selben System auch spontane Wellenaufspaltung (siehe Abbildung 2.10, rechts) auftritt und entwickeln mit Hilfe von mathematischer Modellierung die Hypothese, dass das Verhalten der Nichtauslöschung auf lokale Strukturunterschiede der beteiligten Katalysatoroberfläche zurückzuführen ist. Wenn diese Annahmen stimmen, tritt das exotische Verhalten in der CO-Oxidation nur deshalb auf, weil lokale Inhomogenitäten vorhanden sind.

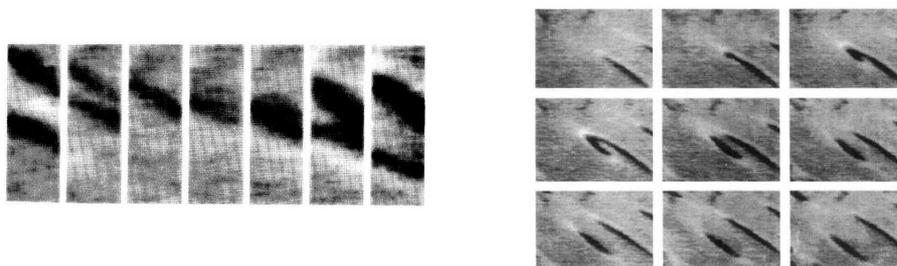


Abbildung 2.10: Beispiele für das Auftreten von Nichtauslöschung (links) und Wellenaufspaltung (rechts) in der CO Oxidation auf Platin. Die Abbildungen sind aus [137] und [15] entnommen.

Neben dem Auftreten der Wellenaufspaltung und Nichtauslöschung in der CO

Oxidation auf Platin, die potentiell durch Inhomogenitäten auf der Oberfläche des Katalysators verursacht sind, wurde dieses exotische Verhalten auch in der lichtsensitiven Belousov-Zhabotinsky-Reaktion (BZR) beobachtet. In dieser Reaktion treten normale Reaktions-Diffusions-Wellen auf (siehe Abbildung 2.6). Wird aber ein zeitlich begrenzter Lichtpuls auf das Reaktionssystem gegeben, so tritt in dieser Reaktion ebenfalls Wellenaufspaltung auf (siehe Abbildung 2.11, links). Wird eine Inhomogenität durch Umpolung eines angelegten elektrischen Feldes induziert, so berichten die Autoren von [146], dass in der BZR Wellenreflektion beziehungsweise eine Umkehr der Richtung der Wellenausbreitung auftritt (siehe Abbildung 2.11, rechts). Neben diesem exotischen Wellenverhalten, das durch lokale Inhomogenitäten oder einen zeitlich variierenden Kontrollparameter entsteht, tritt Wellenaufspaltung in der BZR ebenfalls in zweidimensionalen Aufnahmen eines dreidimensionalen Systems (gesehen von oben) auf, wobei hier die Wellenaufspaltung durch Inhomogenitäten in einer der räumlichen Dimensionen verursacht wird und die Wellen in unterschiedlichen räumlichen Ebenen propagieren. [4, 49, 92].

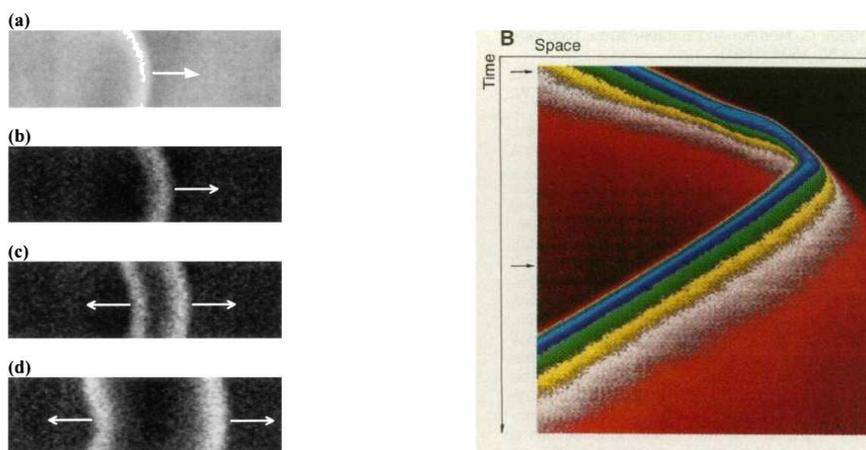


Abbildung 2.11: Beispiele für das Auftreten von Wellenaufspaltung (links) und Reflektion (rechts) in der Belousov-Zhabotinsky-Reaktion, die durch einen Lichtpuls (links) und durch die Umpolung eines angelegten elektrischen Feldes (rechts, gekennzeichnet durch einen Pfeil) verursacht wird. Die Abbildungen sind aus [106] und [146] entnommen.

2.2 Entwicklung der mathematischen Modellierung von Strukturbildungsprozessen

Die Beschreibung von Strukturbildungsprozessen durch mathematische Gleichungen hat mit der rasanten Entwicklung der Leistungsfähigkeit von Computern eine zunehmende Relevanz bei der Untersuchung von chemischen und biochemischen Prozessen gewonnen [14]. Die Grundidee dieses Ansatzes ist das experimentell beobachtete dynamische Verhalten durch mathematische Gleichungen zu beschreiben und durch diesen Entwicklungsprozess grundlegendes Verständnis der unterliegenden Mechanismen zu erhalten und Hypothesen zu entwickeln, wie z.B. exotisches Wellenverhalten zustande kommen kann.

Das erste mathematische Modell zur Beschreibung von Strukturbildungsprozessen ist die Arbeit von Wiener und Rosenblueth [172] im Jahr 1946 zur elektrischen Aktivität im Herzmuskel. Das Feld der Reaktions-Diffusionsgleichungen wurde vor allem durch die Publikation des britischen Mathematikers Alan Mathison Turing „Chemical Basis of Morphogenesis“ [163] in 1952 geprägt. In dieser Arbeit zeigte Turing, dass durch das Zusammenspiel von nichtlinearen Reaktionen und Transport durch Diffusion stabile räumlich inhomogene Strukturbildung in Spezieskonzentration entstehen kann. Die Strukturen werden seitdem „Turing-Patterns“ genannt. Turing-Strukturen wurden z.B. in der Chlorid-Iodid-Malonsäure Reaktion (CIMR) im Jahr 1990 entdeckt [26].

Ein weiteres klassisches Beispiel von Strukturbildungsprozessen in sogenannten „erregbaren“ Medien, die auch in dieser Arbeit untersucht werden, geht auf die Arbeiten von A.L. Hodgkin und A.F. Huxley in 1952 zurück. Sie untersuchten die physikalisch-chemischen Grundlagen von Ionenströmen in der Membran von Axonen in Tintenfischen und entwickelten dazu ein mathematisches Modell aus 6 gewöhnlichen Differentialgleichungen [55]. Das Hodgkin-Huxley Modell beschreibt die Dynamik des Aktionspotentials in Neuronen. Die Gleichungen beschreiben die Dynamik des Membranpotential V als eine Funktion der Ionenströme von Natrium und Kalium. Es lautet

$$\begin{aligned}
 c_m \frac{dV}{dt} &= -g_K n^4 (V - V_k) - g_{Na} m^3 h (V - V_{Na}) - g_L (V - V_L) + I_{app} \\
 \frac{dm}{dt} &= \alpha_m (1 - m) - \beta_m m \\
 \frac{dn}{dt} &= \alpha_n (1 - n) - \beta_n n \\
 \frac{dh}{dt} &= \alpha_h (1 - h) - \beta_h h,
 \end{aligned} \tag{2.1}$$

wobei m, h und n die Taktungsvariablen der Natrium- und der Kaliumkanäle mit kinetischen Parametern α_i und β_i beschreibt.

Das Konzept der Beschreibung eines erregbaren Systems hat danach viele Anwendungen bei der Beschreibung von Strukturbildungsprozessen in der Biologie und Chemie gefunden [57]. Seit den Hodgkin-Huxley Gleichungen und ihrer Varianten [68] wurden diese *gekoppelten nichtlinearen gewöhnlichen Differentialgleichungen* ausgiebig analytisch und numerisch untersucht. Eine stark vereinfachte Variante wurde von R. FitzHugh und J. Nagumo in den sechziger Jahren entwickelt, die diese vereinfachten Modellgleichungen analytisch untersuchen konnten [41]. Die Gleichungen lauten

$$\begin{aligned}\frac{du}{dt} &= -\frac{u^3}{3} + u - v = f(u, v) \\ \frac{dv}{dt} &= \epsilon(u - \gamma v + \beta) = \epsilon g(u, v).\end{aligned}\tag{2.2}$$

Der *Aktivator* u wird dabei aus dem Membranpotential V der Hodgkin-Huxley Gleichungen abgeleitet, wobei der *Inhibitor* v eine Beschreibung der langsamen Variablen n (siehe oben) ist [41]. Diese Bezeichnungen gehen auf Gierer und Meinhardt [46] zurück, die ein Konzept entwickelt haben, welche qualitativen Eigenschaften ein System inne haben muss, um Strukturbildung zu zeigen. Sie formulierten einen Aktivator, der nach einer Störung autokatalytisch produziert wird und einen Inhibitor, der die Aktivierung inhibiert und somit das System wieder in den ursprünglichen Zustand bringt. Dadurch lässt sich z.B. das Auftreten von Oszillationen beschreiben.

Will man mit gekoppelten nichtlinearen Gleichungen auch räumliche Aspekte untersuchen, so werden sie häufig durch Transport mittels Diffusion erweitert, der zu *gekoppelten nichtlinearen partiellen Differentialgleichungen*

$$\begin{aligned}\frac{\partial u}{\partial t} &= f(u, v) + \Delta u \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= g(u, v) + \Delta v\end{aligned}\tag{2.3}$$

führt mit dem Laplace-Operator Δ . Mit Hilfe dieser Gleichungen können dann Strukturbildung wie zum Beispiel Wellenfronten, einzelne Puls-Wellen und periodisch auftretende Wellen beschrieben werden.

Der Zusammenhang der Dynamik gekoppelter gewöhnlicher Differentialgleichungen, die ein räumlich homogenes Verhalten beschreiben, und der Effekt der Hinzunahme der räumlichen Kopplung ist in Abbildung 2.12 dargestellt. Zeigt das System keinerlei Dynamik im Phasenraum, der durch die beiden Variablen u und v aufgespannt wird (Abbildung 2.12, oben), so erhält man auch mit räumlicher Kopplung ebenfalls keinen Effekt. Zeigt das System aber

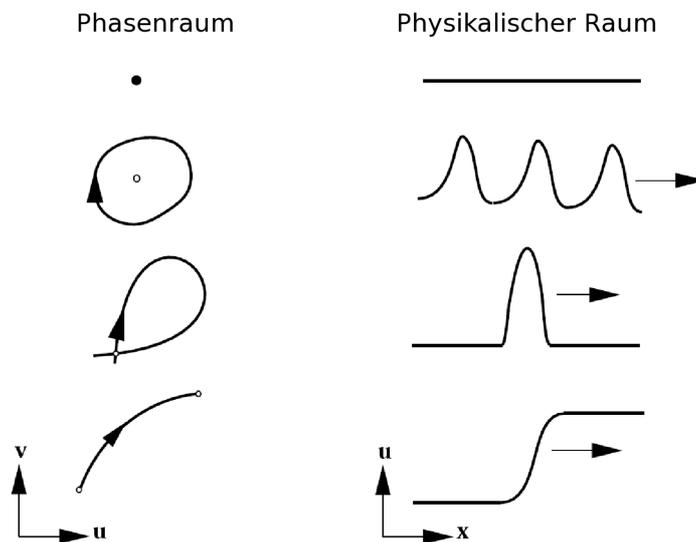


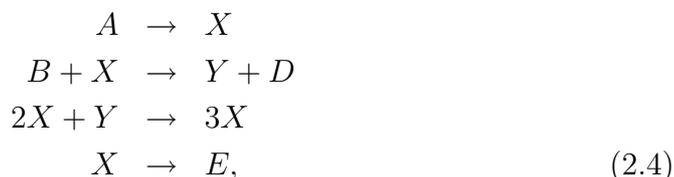
Abbildung 2.12: Beispiele für die Phasenraum-Dynamik der gewöhnlichen Differentialgleichungen und der darauf aufbauenden Erweiterung auf partielle Differentialgleichungen. Die Abbildung ist aus [14] entnommen.

periodisches Verhalten wie im zweiten Beispiel, so können periodische Wellenlösungen auftreten. Im dritten Beispiel ist der Fall dargestellt, dass die Dynamik nur eine schnelle Aktivierung und eine schnelle Inhibierung zeigt, die sich dann in einem einzelnen Puls im Reaktions-Diffusions-System zeigt. Entwickelt sich aber die Dynamik von einem stabilen Punkt zu einem anderen stabilen Punkt wie im letzten Beispiel, so erhält man mit räumlicher Kopplung häufig eine Wellenfront.

Mit Hilfe der Untersuchungen von Strukturbildungsprozessen durch mathematische Modelle durch Hodgkin und Huxley und der anschließenden Entwicklung der mathematischen Theorie wurde ein neues Wissenschaftsfeld aufgestoßen. Der Ansatz einer mathematischen Modellierung zur Beschreibung der vorliegenden Strukturbildungsprozesse hat sich mit der Zeit zu einem wichtigen Hilfsmittel in der Chemie und Biologie entwickelt. Eine Vielzahl von mathematischen Modellen wurde publiziert und hat somit dazu beigetragen, dass (bio)chemische Mechanismen verstanden werden konnten.

In den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts begann das Interesse an dissipativen Strukturen in chemischen Systemen immer stärker zu wachsen. Im Jahr 1968 entwickelten Prigogine und Lefever [128] eine thermodynamische Theorie von chemischen Instabilitäten und schlugen dabei einen allgemeinen, vereinfachten Reaktionsmechanismus vor, durch den viele Strukturen mathe-

matisch beschrieben werden können. Der Mechanismus ist gegeben durch



wobei die Konzentrationen von A und B als Kontrollparameter betrachtet werden und an konstanten Werten a und b fixiert werden. Das korrespondierende Reaktions-Diffusions Modell ist weitgehend als *Brusselator* bekannt und ist gegeben durch

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial u}{\partial t} &= a - (b + 1)u + u^2v + D_u \Delta u \\
 \frac{\partial v}{\partial t} &= bu - u^2v + D_v \Delta v,
 \end{aligned}
 \tag{2.5}$$

wobei u und v die Konzentrationen beschreiben. Dieses System gilt als Prototyp für das Auftreten von *dissipativen Strukturen* [109, 110] und wurde auf viele Prozesse sowohl bei homogenen und heterogenen katalysierten Reaktionen [67] als auch auf biochemische und biologische Systeme angewandt [47].

Ein weiteres klassisches Beispiel von dissipativen Strukturen in der Chemie, das theoretisch untersucht wurde, ist die Belousov-Zhabotinsky Reaktion (BZR). Die BZ Reaktion ist die Oxidation der Malonsäure und schließt mehr als 100 chemische Spezies ein. Trotzdem entwickelten Field et al. [40] ein Modell, das die essentielle Dynamik durch einen Kernmechanismus beschreibt und das als *Oregonator*-Modell bekannt wurde.

Auch die Oxidation von CO auf Pt(110) [37] wurde intensiv mit Hilfe von Reaktions-Diffusions-Gleichungen untersucht und stellt eines der wichtigsten chemischen strukturbildenden Systeme dar (siehe [61] für einen Review). Einer der Entdecker dieses Systems, Gerhard Ertl, wurde deshalb unter anderem für seine experimentellen aber auch seine theoretischen Untersuchungen zu diesem System im Jahr 2007 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

Ein weiteres relevantes Feld, in dem Reaktions-Diffusions-Systeme eine wichtige Rolle spielen, sind Wellen und Strukturen, die aus der Nichtlinearität der Reaktionswege in der Biologie entstehen. Als eine Pionierarbeit gelten die Arbeiten zu der Aggregation von Schleimpilzkolonien bei denen Spiralwellen von chemischen Substanzen, die von den Pilzen produziert werden, entdeckt wurden [45]. Diese Aggregation und die Bildung der räumlichen Strukturen wurden intensiv studiert und auch durch Modellbildung analysiert (siehe [17] für einen Review). Ein weiteres aktuelles Beispiel eines

Reaktions-Diffusions-Systeme sind intrazelluläre Calciumwellen (siehe z.B. [84]), die ebenfalls ausgiebig durch mathematische Modellierung untersucht wurden [156]. Interessanterweise konnte bei fast allen der bisher entwickelten Modelle das Konzept des Aktivator-Inhibitor-Prinzips, das von Meinhardt und Gierer [46] entwickelt wurde, und eines erregbaren Mediums angewandt werden.

In neuerer Zeit erhält dieser Ansatz eine noch größere Bedeutung, da in der *Systembiologie* versucht wird *in vivo* Prozesse durch mathematische Modellierung zu erklären und virtuell am Computer zu simulieren. Man erhofft sich davon, dass dadurch ein besserer Einblick in die Regulation von biologischen Prozessen erhalten wird und anschließend mit der Entwicklung einer vollständigen mathematischen Beschreibung von funktionellen biologischen Teilen virtuelle Experimente am Computer durchgeführt werden können, die z.B. aufwändige und teure Experimente ersetzen, wie es heutzutage unter anderem bereits in der chemischen Industrie der Fall ist.

Kapitel 3

Theorie der Nichtlinearen Dynamik

Im Rahmen der Theorie nichtlinearer dynamischer Systeme wird versucht, die experimentellen dynamischen Phänomene der Strukturbildung in mathematischen Gleichungen zu formulieren und mit Hilfe von theoretischer Analyse und numerischen Simulation den unterliegenden Mechanismus zu verstehen. In dieser Arbeit wird durch mathematische Modellierung der nichtlinearen Dynamik der biochemischen Prozesse ein konsistentes Modell entwickelt, um die im Kapitel 5 dargestellten Phänomene zu beschreiben und zu verstehen. In diesem Kapitel wird ein kurzer Überblick über die mathematische Charakterisierung der Dynamik mit Hilfe von Phasenraumanalyse gegeben. Anschließend wird ein Ansatz vorgestellt, wie mit Hilfe dieser mathematischen Charakterisierung das Auftreten von Wellenlösungen und deren exotisches Verhalten untersucht werden kann.

3.1 Nichtlineare dynamische Systeme

Zu Beginn wird eine sehr allgemeine Definition eines dynamischen Systems gegeben [79].

Definition 3.1 *Ein dynamisches System ist ein Tripel (T, X, φ^t) , das aus einer Menge T , normalerweise als Menge der Zeitpunkte bezeichnet, einem Phasenraum X und einer Familie von Transformationen $\varphi^t : X \rightarrow X$ besteht. Es wird parametrisiert durch $t \in T$ und genügt*

$$\begin{aligned}\varphi^0 &= \text{id} \\ \varphi^{t+s} &= \varphi^t \circ \varphi^s, \quad t, s, t+s \in T.\end{aligned}\tag{3.1}$$

Eine graphische Darstellung dieser Definition ist in Abbildung 3.1 gegeben.

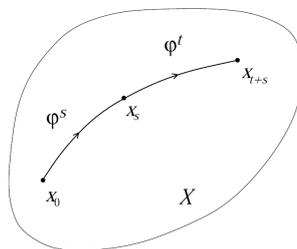


Abbildung 3.1: Darstellung eines dynamischen Systems basierend auf Definition (3.1). Die Abbildung ist aus [79] entnommen.

In dieser Arbeit wird die Entwicklung des dynamischen Systems nur implizit in Form von Geschwindigkeiten der Phasenraumvariablen \dot{x}_i betrachtet und somit werden sie ausschließlich in Form von Differentialgleichungen beschrieben. Eine gewöhnliche Differentialgleichung ist gegeben durch

$$\dot{x}(t) := \frac{dx(t)}{dt} = f(t, x(t); \eta), \quad (3.2)$$

mit $x(t) \in U \subset \mathbb{R}^n$, $t \in \mathbb{R}$, $f \in \mathbb{R}^n$ und $\eta \in V \subset \mathbb{R}^p$, wobei U und V offene Mengen in \mathbb{R}^n und \mathbb{R}^p sind. Mit η wird der Vektor der Modellparameter bezeichnet. Diese spielen bei der Modellierung von Strukturbildungsprozessen eine wichtige Rolle, da in Abhängigkeit von Parameterwerten unterschiedliches dynamisches Verhalten beobachtet wird. Dies wird in Kapitel 3.3 näher beschrieben.

Eine Lösung von (3.2) ist eine Abbildung x von einem Intervall $I \subset \mathbb{R}$ in den \mathbb{R}^n , also

$$\begin{aligned} x : I &\rightarrow \mathbb{R}^n, \\ t &\mapsto x(t), \end{aligned} \quad (3.3)$$

so dass $x(t)$ (3.2) genügt, das heißt

$$\dot{x}(t) = f(t, x(t); \eta).$$

Definition 3.2 Das System (3.2) zusammen mit den Anfangswerten (t_0, x_0) mit $x(t_0) = x_0$ heißt **Anfangswertproblem (AWP)**.

Wenn man sich auf eine Lösung zu einem speziellen Anfangswert bezieht, wird sie häufig mit $x(t; t_0, x_0, \eta)$ bezeichnet. Es stellt sich nun die Frage, wann eine Lösung eines Anfangswertproblems existiert und wann diese Lösung eindeutig ist. Dies wird im Rahmen der numerischen Lösung von gewöhnlichen

Differentialgleichungen in Kapitel 4.1 diskutiert. Eine Lösung zu einem speziellen Anfangswert wird häufig auch als Trajektorie bezeichnet.

Definition 3.3 Eine Lösung $x(t; t_0, x_0, \eta)$ heißt **Trajektorie** durch den Punkt x_0 am Zeitpunkt t_0 .

3.2 Phasenraumstrukturen

Die Dynamik der durch die Differentialgleichungen beschriebenen Systeme findet im entsprechenden Zustandsraum oder sogenannten *Phasenraum* statt. Der Phasenraum wird durch die Variablen des dynamischen Systems, d.h. hier durch die Variablen der Differentialgleichung, aufgespannt. Um diesen Phasenraum und die Dynamik des Systems besser charakterisieren und verstehen zu können, wird dieser nach Mengen mit spezieller Struktur untersucht. Hier spielt das Auftreten von Fixpunkten, an dem sich die zeitliche Entwicklung des Systems nicht ändert, eine entscheidende Rolle. Es wird nun kurz deren Auftreten diskutiert und deren Stabilitätseigenschaften dargestellt.

Definition 3.4 Sei x_0 ein Punkt im Phasenraum von (3.2). Unter einem **Orbit** $O(x_0)$ durch x_0 versteht man die Menge der Punkte im Phasenraum, die auf einer Trajektorie durch x_0 liegen, also für $x_0 \in U \subset \mathbb{R}^n$ ist der **Orbit** $O(x_0)$ durch x_0 gegeben durch

$$O(x_0) = \{x \in \mathbb{R}^n \mid x = x(t; t_0, x_0, \eta), t \in I\}.$$

In Abbildung 3.2 sind Beispiele für mögliche Orbits eines dynamischen Systems dargestellt.

Definition 3.5 Ein Punkt $x^0 \in X$ wird **Fixpunkt** eines dynamischen Systems genannt, falls

$$\varphi^t x^0 = x^0 \quad \forall t \in T.$$

Im Fall gewöhnlicher Differentialgleichungsmodelle ist dies erfüllt, falls $f(x^0) = 0$.

Fixpunkte sind bei dynamischen Systemen von besonderem Interesse, weil man mit ihrer Hilfe die Phasenraumstruktur eines Systems untersuchen kann. Eine wichtige Eigenschaft dieser Gleichgewichtslösungen ist ihre Stabilität.

Definition 3.6 Eine Gleichgewichtslösung von (3.2) $x^0(t)$ heißt **stabil** (oder **Lyapunov stabil**), wenn für ein gegebenes $\epsilon > 0$ ein $\delta = \delta(\epsilon) > 0$ existiert, so dass für jede Lösung $y(t)$ von (3.2) mit $|x^0(t_0) - y(t_0)| < \delta$ auch

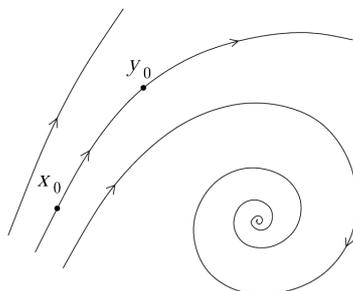


Abbildung 3.2: Darstellung von verschiedenen Orbits eines dynamischen Systems. Die Abbildung ist aus [79] entnommen.

$|x^0(t) - y(t)| < \epsilon$ gilt für alle $t > t_0 \in \mathbb{R}^n$.

Da diese Definition eine schwache Form der Stabilität beschreibt, wird überwiegend die asymptotische Stabilität verwendet.

Definition 3.7 Eine Gleichgewichtslösung von (3.2) $x^0(t)$ heißt **asymptotisch stabil**, wenn sie Lyapunov stabil ist und wenn eine Konstante $b > 0$ existiert, so dass für jede Lösung $y(t)$ von (3.2), wenn $|x^0(t_0) - y(t_0)| < b$ gilt, $\lim_{t \rightarrow \infty} |x^0(t) - y(t)| = 0$ folgt.

Für die Untersuchung der Stabilität eines Fixpunktes $x^0(t)$ muss das Verhalten der Lösung in einer Umgebung von $x(t)$ untersucht werden. Sei

$$x(t) = x^0(t) + y(t). \quad (3.4)$$

Substituiert man (3.4) in (3.2) und entwickelt in eine Taylorreihe mit Entwicklungspunkt $x^0(t)$, erhält man

$$\dot{x}(t) = \dot{x}^0(t) + \dot{y}(t) = f(x^0(t)) + Df(x^0(t))y(t) + \mathcal{O}(\|y^2\|), \quad (3.5)$$

wobei Df die Jacobimatrix von f und $\|\cdot\|$ eine Norm im \mathbb{R}^n bezeichnet. Mit $\dot{x}^0(t) = f(x^0(t))$ erhält man

$$\dot{y}(t) = Df(x^0(t))y(t) + \mathcal{O}(\|y^2\|). \quad (3.6)$$

Gleichung (3.6) beschreibt die Entwicklung der Trajektorien in der Nähe von $x^0(t)$. Um die Stabilität in einer hinreichend kleinen Umgebung der Lösung $x^0(t)$ zu untersuchen, genügt es, das linearisierte System

$$\dot{y}(t) = Df(x^0(t))y(t) \quad (3.7)$$

zu betrachten. Die Stabilität lässt sich dann aus den Eigenwerten des Systems (3.7) ableiten, denn wenn $x^0(t)$ eine Gleichgewichtslösung ist, das heißt

$x^0(t) \equiv x^0$, dann ist $Df(x^0(t)) = Df(x^0)$ eine Matrix mit konstanten Einträgen und die Lösung von (3.7) durch den Punkt $y_0 \in \mathbb{R}^n$ lautet

$$y(t) = e^{Df(x^0)t} y_0. \quad (3.8)$$

x_0 wird dann asymptotisch stabil genannt, wenn alle Eigenwerte von $Df(x^0)$ negative Realteile haben, da die lineare Approximation eine exponentiell abfallende Funktion darstellt. Zusammenfassend ergibt sich der folgende

Satz 3.8 (Stabilität von Fixpunkten) *Angenommen alle Eigenwerte der Jacobimatrix $Df(x^0)$ haben negative Realteile. Dann ist die Gleichgewichtslösung x^0 des Systems (3.2) asymptotisch stabil.*

Beweis: Siehe [173, Kapitel 1.1].

Zwei- oder mehrdimensionale Phasenräume können neben Fixpunkten weitere charakteristische Strukturen zeigen. Ein Beispiel ist das Vorhandensein von stabilen periodischen Lösungen oder Zyklen.

Definition 3.9 *Ein Zyklus ist ein Orbit L_0 , so dass jeder Punkt $x_0 \in L_0$ die Bedingung $\varphi^{t+T_0} x_0 = \varphi^t x_0$ mit $T_0 > 0$ für alle $t \in T$ erfüllt. Das minimale T_0 mit dieser Eigenschaft wird die **Periode** des Zyklus L_0 genannt.*

Ein periodischer Orbit ist eine geschlossene Trajektorie im Phasenraum. Der Zusammenhang zwischen Phasenraumdynamik und zeitlichem Verlauf von Systemzuständen ist für eine beispielhafte Trajektorie in Abbildung 3.3 (links) graphisch dargestellt.

Für die in dieser Arbeit modellierten periodische Prozesse, wie z.B. Oszillationen, ist es wichtig, dass die Zyklen oder periodischen Orbits stabil sind. Dafür wird das Konzept der Lyapunov-Stabilität auf Zyklen erweitert.

Definition 3.10 *Eine periodische Lösung $L_0(t)$ des Systems (3.2) wird **Lyapunov-stabil** genannt, wenn für jedes t_0 und für jedes $\epsilon > 0$ ein $\delta(\epsilon, t_0) > 0$ existiert, so dass*

$$\|x_0 - L_0(t_0)\| \leq \delta \Rightarrow \|x(t; t_0, x_0) - L_0(t)\| \leq \epsilon \text{ für } t \geq t_0.$$

Das Konzept der Lyapunov-Stabilität wird wie im Fall der Stabilität von Fixpunkten auf das Konzept der asymptotischen Stabilität erweitert. Dazu betrachtet man die autonome Differentialgleichung in \mathbb{R}^n

$$\dot{x}(t) = f(x), \quad x(t_0) = x_0 \quad (3.9)$$

mit der periodischen Lösung $L_0(t)$, die einem geschlossenen Orbit im n -dimensionalen Phasenraum entspricht. Mit einer Transversalen V sei eine Mannigfaltigkeit bezeichnet, die vom geschlossenen Orbit im Punkt x_0 geschnitten

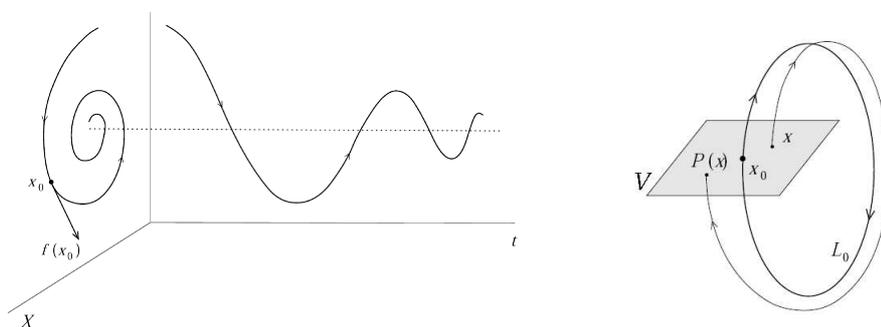


Abbildung 3.3: Links: Darstellung eines periodischen Orbit im Phasenraum und im zeitlichem Verlauf von Systemzuständen. Rechts: Schematische Darstellung einer Poincaré-Abbildung. Die Abbildungen sind aus [79] entnommen.

wird und nicht tangential zu ihm ist. Man nehme an, dass ein Punkt $x \in V$ durch den Phasenfluss, der durch Differentialgleichung (3.9) definiert wird, nach V abgebildet wird. Diese Abbildung wird Poincaré-Abbildung P genannt (siehe Abbildung 3.3 (rechts)). Der Punkt $P(x) \in V$ kann ebenfalls abgebildet werden, d.h. $P^2(x) \in V$.

Definition 3.11 Eine periodische Lösung $L_0(t)$ des Systems (3.9) mit der Transversalen V und der Poincaré-Abbildung P mit Fixpunkt x_0 wird **stabil** genannt, wenn für jedes $\epsilon > 0$ ein $\delta(\epsilon)$ existiert, so dass

$$\|x - x_0\| \leq \delta, x \in V \Rightarrow \|P^n(x) - x_0\| \leq \epsilon \text{ für } n = 1, 2, 3, \dots$$

Mit Hilfe dieser Konzepte kann nun die asymptotische Stabilität definiert werden.

Definition 3.12 Eine periodische Lösung $L_0(t)$ des Systems (3.9) mit der Transversalen V und der Poincaré-Abbildung P mit Fixpunkt x_0 wird **asymptotisch stabil** genannt, wenn sie stabil ist und ein $\delta > 0$ existiert, so dass

$$\|x - x_0\| \leq \delta, x \in V \Rightarrow \lim_{n \rightarrow \infty} P^n(x) = x_0.$$

Wie im Fall der Fixpunkte eines dynamischen Systems kann die Stabilität einer periodischen Lösung durch Linearisierung-Techniken untersucht werden. Dazu untersucht man die Jacobi-Matrix der Poincaré-Abbildung $\frac{\partial P}{\partial x}$ in einer Umgebung des Fixpunktes x_0 (der Poincaré-Abbildung). Ein Zyklus ist (in linearer Näherung) stabil, wenn alle Eigenwerte μ_1, \dots, μ_{n-1} der $(n-1) \times (n-1)$ Jacobi-Matrix von P innerhalb des Einheitskreises $|\mu| = 1$ lokalisiert sind (siehe [79] für Details und Beweise der Aussagen). Eine stabile periodische Lösung wird auch *Grenzzzyklus* genannt.

Um eine Idee über das Auftreten von stabilen, periodischen Lösungen zu bekommen, wird im folgenden Kapitel das Entstehen von periodischen Lösungen in Abhängigkeit von Modellparametern diskutiert.

3.3 Bifurkationen

Einer der interessantesten Aspekte, die bei der Untersuchung von nichtlinearen dynamischen Systemen auftreten, ist die qualitative Änderung der Systemdynamik in Abhängigkeit der Parameterwerte. Für das Verständnis des dynamischen Systems ist es hilfreich zu wissen, ob z.B. Fixpunkte ihre Eigenschaften wie z.B. Stabilität ändern, wenn Parameter variiert werden und ob sich Phasenraumporträts der Trajektorien in Abhängigkeit der Parameterwerte verändern. Da in dieser Arbeit vor allem periodische Lösungen betrachtet werden, wird als Illustration wie in einem dynamischen System periodische Lösungen entstehen können nur die sogenannte *Hopf-Bifurkation* betrachtet. Für eine detaillierte Einführung in die Bifurkationstheorie sei auf [159] und [173] verwiesen.

Um qualitative Veränderungen von dynamischen Systemen zu untersuchen und zu vergleichen, wird zu Beginn der Begriff der topologischen Äquivalenz eingeführt.

Definition 3.11 *Ein dynamisches System $(T, \mathbb{R}^n, \varphi^t)$ wird als **topologisch äquivalent** zum dynamischen System $(T, \mathbb{R}^n, \psi^t)$ bezeichnet, wenn ein Homöomorphismus¹ $h : \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}^n$ existiert, der die Orbits des ersten Systems auf die Orbits des zweiten Systems unter Beibehaltung der Zeitrichtung abbildet.*

Die Phasenräume von topologisch äquivalenten Systemen werden häufig auch topologisch äquivalent genannt. Ein Beispiel von topologisch äquivalenten Phasenräumen ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

Wenn die Parameterwerte eines dynamischen Systems nun variieren so existieren zwei Möglichkeiten: Entweder das System bleibt topologisch äquivalent zu dem ursprünglichen System oder seine Topologie verändert sich.

Definition 3.12 *Das Auftreten von topologisch nicht-äquivalenten Phasenräumen unter Variation von Parametern wird **Bifurkation** genannt.*

Die einfachste Bifurkation, die bei dynamischen Systemen auftritt, ist die Änderung der Stabilität eines Fixpunktes und dies hat offensichtlich Einfluss auf die qualitative Struktur des Phasenraums.

¹Ein Homöomorphismus ist eine invertierbare Abbildung, so dass die Abbildungen und ihre Inverse stetig sind.

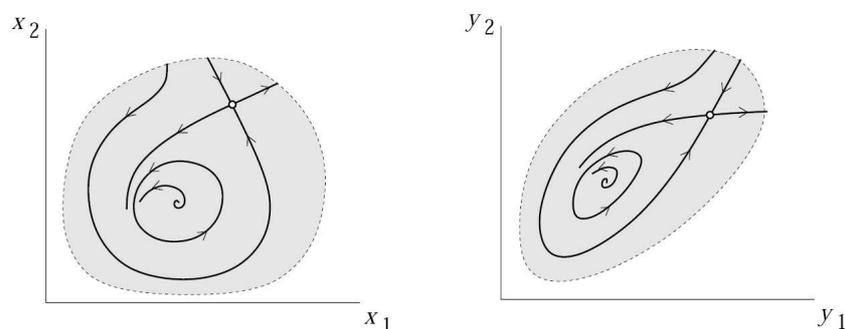


Abbildung 3.4: Schematisches Beispiel von topologisch äquivalenten Phasenräumen. Die Abbildung ist aus [79] entnommen.

Da in dieser Arbeit periodischen Prozesse, wie z.B. Oszillationen, modelliert und untersucht werden sollen, wird nun mit Hilfe eines Beispiels das Auftreten von Zyklen und die Änderung der Systemdynamik in Abhängigkeit von Parametern verdeutlicht.

Beispiel 3.13 (Hopf-Bifurkation)

Es sei das System

$$\begin{aligned} \dot{r} &= \mu r - r^3 \\ \dot{\phi} &= \omega + br^2 \end{aligned} \quad (3.10)$$

in Polarkoordinaten (r, ϕ) gegeben. Der Bifurkationsparameter sei μ . Für $\mu < 0$ existiert ein stabiler Fixpunkt im Ursprung. Wenn μ größer wird, wird der Ursprung für $\mu > 0$ instabil und es entsteht ein stabiler Zyklus um den Fixpunkt (siehe Abbildung 3.5). Die Rotationsrichtung der Spirale hängt hierbei vom Vorzeichen von ω ab. Dies ist der Prototyp für eine sogenannte superkritische Hopf-Bifurkation.

Um zu verstehen was mit der Stabilität des Fixpunktes im Ursprung geschieht, kann man dies mit Hilfe von linearer Stabilitätsanalyse untersuchen. Formuliert man das System (3.10) in kartesische Koordinaten, so erhält man

$$\begin{aligned} \dot{x} &= \dot{r} \cos(\phi) - r\dot{\phi} \sin(\phi) \\ &= [\mu - (x^2 + y^2)] x - [\omega + b(x^2 + y^2)] y \end{aligned}$$

und

$$\begin{aligned} \dot{y} &= \dot{r} \sin(\phi) + r\dot{\phi} \cos(\phi) \\ &= [\omega + b(x^2 + y^2)] x + [\mu - (x^2 + y^2)] y \end{aligned}$$

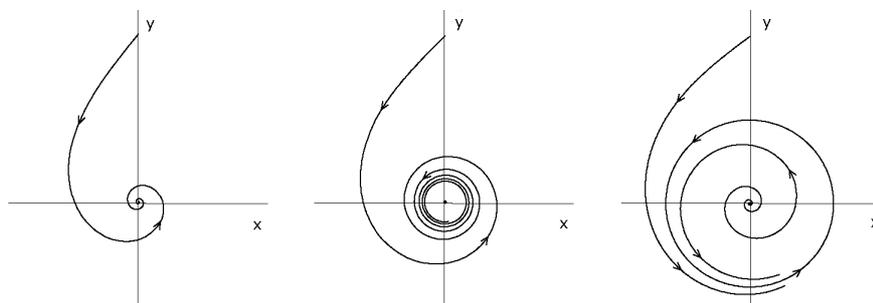


Abbildung 3.5: Aus einem stabilen Fixpunkt mit $\mu < 0$ entsteht ein stabiler Zyklus mit einem instabilen Fixpunkt im Zentrum für $\mu > 0$. Der Effekt ist in kartesischen Koordinaten gezeigt. Die Abbildung ist aus [79] entnommen.

Die Jacobi-Matrix um Punkt $(0, 0)$ lautet

$$J(0, 0) = \begin{pmatrix} \mu & -\omega \\ \omega & \mu \end{pmatrix}$$

mit den Eigenwerten

$$\lambda_{1,2} = \mu \pm i\omega.$$

Wie man nun sieht, überqueren die Eigenwerte die imaginäre Achse beim Auftreten der Bifurkation, wenn μ von negative auf positive Werte wechselt. Der stabile Fixpunkt wird plötzlich instabil, wobei ein periodischer Zyklus entsteht.

3.4 Auftreten von Wellenlösungen in erregbaren Medien

3.4.1 Einführung

In diesem Kapitel soll kurz eine anschauliche Einführung gegeben werden, wie in einem nichtlinearen System räumliche Wellenausbreitung basierend auf einem Reaktions-Diffusions-System auftreten kann und wann diese Lösungen die Charakteristik eines einzelnen Pulses und wann einer periodische Wellenlösung haben.

Das Auftreten von Wellen in erregbaren Medien kann mit Hilfe von Phasenraumüberlegungen anschaulich beschrieben werden, da erregbare Medien gewisse charakteristische Eigenschaften haben [164]. Dazu betrachtet man

das allgemeine Reaktions-Diffusions-System

$$\begin{aligned}\frac{\partial u}{\partial t} &= D\Delta u + f(u, v) \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= D\Delta v + g(u, v),\end{aligned}\quad (3.11)$$

wobei D die Diffusionskonstante und Δ der Laplaceoperator (in ein, zwei oder drei räumlichen Dimensionen) ist.

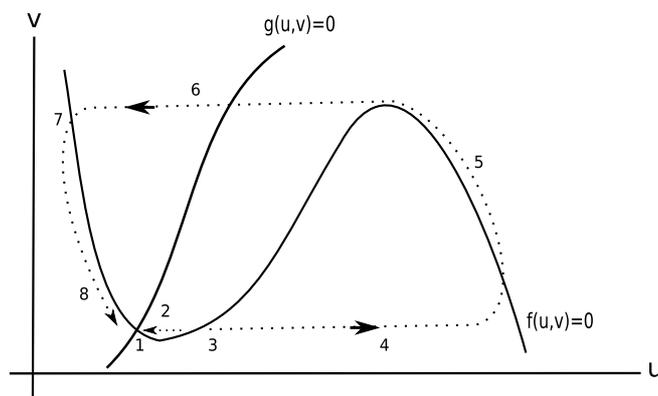


Abbildung 3.6: Typische Phasenraumstruktur eines erregbaren Systems (3.11), wobei die räumliche Kopplung vernachlässigt wird. Die zeitabhängigen Variablen u und v beschreiben den Zustand des Systems. Durchgezogene Linien sind die Nullklinen, auf denen $du/dt = 0$ und $dv/dt = 0$ gilt. Gestrichelte Linien sind die durch die Zeit parametrisierten Trajektorien. Der Fixpunkt (1) ist stabil und kleine Störungen (2) werden zum Fixpunkt gedämpft. Störungen, die eine gewisse Schwelle überschreiten (3), durchlaufen zuerst eine Phase der schnellen Erregung (4), in der u autokatalytisch produziert wird. Anschließend bleibt das System in einem erregten Zustand (5). Nachdem diese Phase zu Ende geht (6), ist das System zuerst refraktär (7), wobei es anschließend wieder erregbar im Ursprungszustand ist (8) [164].

Die Funktionen $f(u, v)$ und $g(u, v)$ beschreiben die nichtlineare Dynamik des Systems und ihre sogenannten *Nullklinen* sollen qualitativ die Form aus Abbildung 3.6 (unter Vernachlässigung der räumlichen Kopplung) haben. Die u -Nullkline $f(u, v) = 0$ ist n-förmig und die v -Nullkline $g(u, v) = 0$ ist monoton mit nur einer Schnittstelle mit $f(u, v) = 0$. Dies sind die qualitativen Nullklinen eines *Aktivator-Inhibitor-Systems*. Das Entstehen von Wellen kann nun anschaulich durch das Phasenraumdiagramm beschrieben werden.

Ist das System in einem stabilen Fixpunkt werden kleine Störungen schnell wieder gedämpft. Bei größeren Störungen, die eine gewisse Schwelle über-

schreiten, reagiert das System sehr schnell und abrupt, wird dann aber ebenfalls schnell refraktär und ist dann wieder erregbar. Dieser Ablauf ist in Abbildung 3.6 schematisch in einem Phasenraumdiagramm mit Vernachlässigung der räumlichen Kopplung abgebildet.

Wellen entstehen nun durch die räumliche Kopplung des Systems. Wird nun ein kleiner räumlicher Bereich über die Erregbarkeitsschwelle gestört, verursacht die schnelle, autokatalytische Produktion von u , dass u in Nachbarregionen diffundiert und diese über die Erregbarkeitsschwelle stört und somit ein räumliches Ausbreiten der Störung zur Folge hat. Hinter der Wellenfront, die mit dem Sprung von (4) auf (5) aus Abbildung 3.6 korreliert, ist eine erregte Zone, die durch den Beginn der refraktären Phase ((6) in Abbildung 3.6) beendet wird. Nach der Refraktärphase kann das System dann wieder durch eine entsprechende Störung erregt werden.

Es ist klar, dass mit Hilfe dieses Mechanismus ohne weitere Störung nur eine Welle durch das räumliche Gebiet propagieren wird. Da in dieser Arbeit aber periodische Wellenausbreitung untersucht werden soll und keine periodische Störung angenommen wird, muss hier ein leicht veränderter Mechanismus angenommen werden.

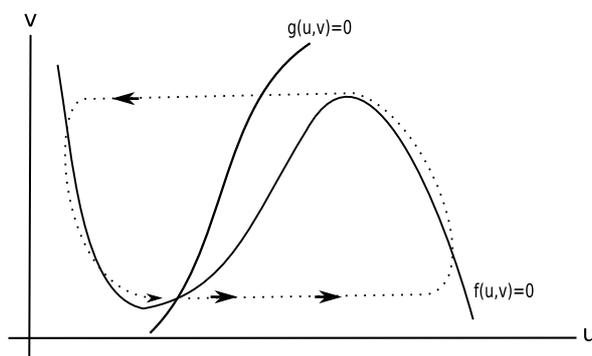


Abbildung 3.7: Typischer Phasenraum eines oszillatorischen Systems (unter Vernachlässigung der räumlichen Kopplung). Durch die oszillierende Dynamik entstehen zusammen mit räumlicher Kopplung durch Diffusion periodische Wellenlösungen.

In Abbildung 3.7 ist ein Phasenraumdiagramm (wiederum unter Vernachlässigung der räumlichen Kopplung) dargestellt, durch das qualitativ das Auftreten von periodischen Wellenlösungen veranschaulicht werden kann. Die Nullkline $g(x, v) = 0$ ist im Vergleich zu Abbildung 3.6 leicht nach rechts verschoben, so dass der Fixpunkt des Systems, der im Schnittpunkt der beiden Nullklinen liegt, instabil wird. Nach der autokatalytischen Produktion von u und der anschließenden refraktären Phase, entwickelt sich die Dyna-

mik in Richtung des instabilen Fixpunktes, wird von ihm abgestoßen und u geht wieder in den autokatalytischen Produktionsschritt. Mit Hilfe dieses Mechanismus kann die Entstehung von periodischen Wellenlösungen erklärt werden. Für eine systematischere und vor allem mathematisch fundiertere Behandlung von Wellenausbreitung sei auf [164] verwiesen.

3.4.2 Exotische Wellenlösung in Modellgleichungen

In diesem Kapitel soll kurz dargestellt werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten exotischen Wellenphänomene, wie Wellenreflektion am Rand und Nichtauslöschung bei Wellenkollision, zwar auch als Lösungen von anderen Modellgleichungen vorkommen, es aber ein seltenes Phänomen ist und normalerweise nicht in klassischen Reaktions-Diffusions-Systemen gefunden werden.

Wellenverhalten bei Kollision

Als ein Beispiel für ein System, das für bestimmte Parameterwerte Wellenreflektion bei Kollision zeigt, wurde in [102] folgendes einfaches (räumlich) eindimensionales Reaktions-Diffusions-System untersucht:

$$\begin{aligned}\epsilon\tau\frac{\partial u}{\partial t} &= \epsilon^2\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + u(1-u)(u-a) - v \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= d\frac{\partial^2 v}{\partial x^2} + u - \gamma v.\end{aligned}\tag{3.12}$$

ϵ , τ , d , a und γ sind positive Parameter. Für weitere Modelldetails sei auf [102] verwiesen. Dieses Modell produziert durch seine nichtlineare Dynamik und die diffusive Kopplung Wellen, die über weite Bereiche das oft bei Reaktions-Diffusions-Systemen beobachtete Auslöchen von Wellendynamik (siehe Kapitel 2.1.2) zeigt (siehe Abbildung 3.8 (links)).

Interessanterweise zeigt dieses recht einfache Modellsystem aber für bestimmte Parameterbereiche Wellenreflektion nach Kollision (siehe Abbildung 3.8 (rechts)). Hier ist für diese Arbeit von besonderem Interesse, dass bei der Wellenreflektion die System-Dynamik gestört wird, d.h. direkt bei der Kollision wird eine Intensitätsabnahme beobachtet und nach der Reflektion propagiert die Welle mit der ursprünglichen Intensität weiter durch das Gebiet.

Ähnliches Verhalten zeigt das in [119] untersuchte eindimensionale Reaktions-Diffusions-System

$$\begin{aligned}\frac{\partial \alpha}{\partial t} &= \delta\frac{\partial^2 \alpha}{\partial x^2} + \frac{1-\alpha}{\tau} - \alpha\beta^2 \\ \frac{\partial \beta}{\partial t} &= \frac{\partial^2 \beta}{\partial x^2} + \frac{\beta_0 - \beta}{\tau} + \alpha\beta^2 - k_2\beta.\end{aligned}\tag{3.13}$$

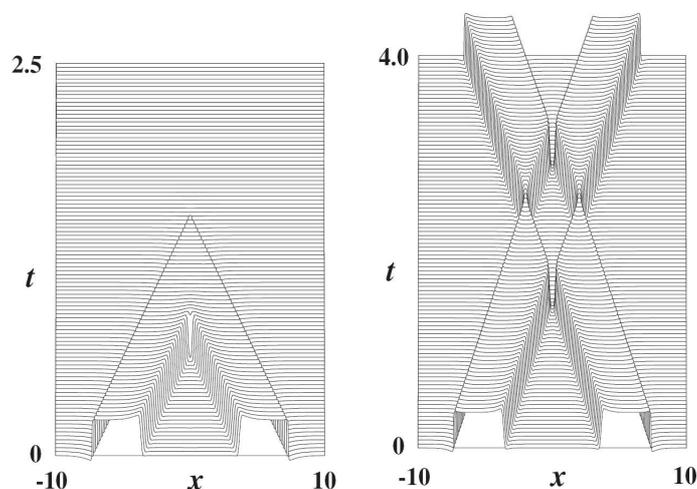


Abbildung 3.8: Links: Simulation von Auslöschung der Wellen nach Kollision in Reaktions-Diffusions-System (3.12). Rechts: Simulation von Wellenreflektion nach Kollision in Reaktions-Diffusions-System (3.12). Die Abbildungen sind aus [102] entnommen.

τ , β_0 und k_2 bezeichnen Modellparameter und für weitere Modelldetails sei auf [119] verwiesen. Innerhalb bestimmter Parameterbereiche zeigt dieses System Wellenreflektion bei Kollision und an den Rändern des Gebiets. In diesem System scheinen sich die Wellen nicht direkt zu berühren, sondern werden schon vor Kontakt reflektiert (siehe Abbildung 3.9). Dieses Verhalten bei Wellenkollision wird bei den in dieser Arbeit untersuchten Wellenphänomenen nicht beobachtet, wie die quantitative Analyse der Wellenintensität zeigt, die in Kapitel 7.3 dargestellt ist.

Aufspalten von Wellen

Darüberhinaus ist bei dem in Kapitel 7.3 vorgestellten Verhalten ersichtlich, dass die beiden nach der Aufspaltung erhaltenen Wellen mit der Hälfte der ursprünglichen Intensität propagieren. Dies ist ebenfalls ein selten beobachtetes Verhalten, da bei anderen Modelluntersuchungen, die Wellenaufspaltung zeigen, normalerweise die beiden nach der Aufspaltung erhaltenen Wellen mit derselben Intensität wie die ursprüngliche Welle propagieren. Um dies zu verdeutlichen, wird nun ein aussagekräftiges Beispiel vorgestellt. In [106] untersuchen die Autoren die Wellen-Aufspaltung in einem lichtsensitiven Belousov-Zhabotinsky-Experiment nach Anwendung eines Lichtpulses (siehe Kapitel 2.1.2 für die experimentellen Ergebnisse) und versuchen das Verhalten durch eine einfache Modellstudie zu erklären.

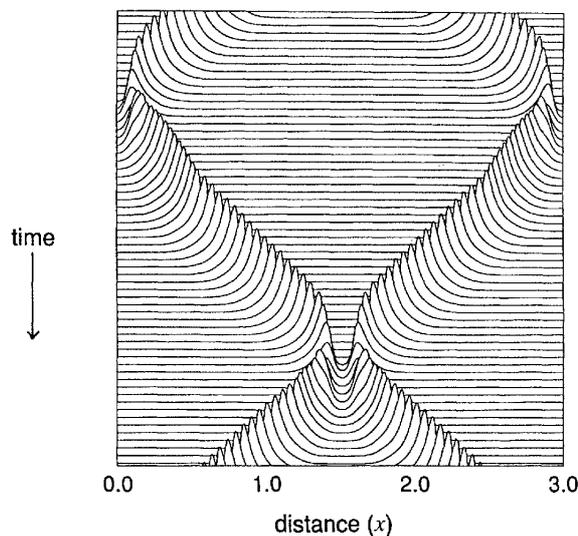


Abbildung 3.9: Simulation von Wellenreflektion nach Kollision und an den Rändern des Gebiets von Reaktions-Diffusions-System (3.13). Die Abbildungen ist aus [119] entnommen.

In [106] wird eine eindimensionale Variante der Fitz-Hugh-Nagumo Gleichungen verwendet, die durch den zeitlich variierenden Parameter φ beeinflusst werden kann. Die Gleichungen sind durch

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} &= D_u \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \epsilon \left(u \left(1 - \frac{u^2}{3} \right) \right) - g_k v - \varphi \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= D_v \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} + u + \beta - \gamma v \end{aligned} \quad (3.14)$$

gegeben. ϵ , g_k , β und γ sind Modellparameter und für weitere Modelldetails sei auf [106] verwiesen. Durch eine zeitliche Variation des lichtsensitiven Modellparameter φ (siehe Abbildung 3.10) wird eine Aufspaltung der Welle erreicht, wobei nach Aufspaltung die beiden entstandenen Wellen nach Intensitätsschwankungen wieder die vor der Aufspaltung beobachtete Wellenintensität entwickeln und mit dieser Intensität in unterschiedliche Richtungen propagieren. Dies wird bei der in dieser Arbeit beobachteten Wellenphänomenen ebenfalls nicht beobachtet, da nach Aufspaltung eine Halbierung der Intensität beobachtet wird.

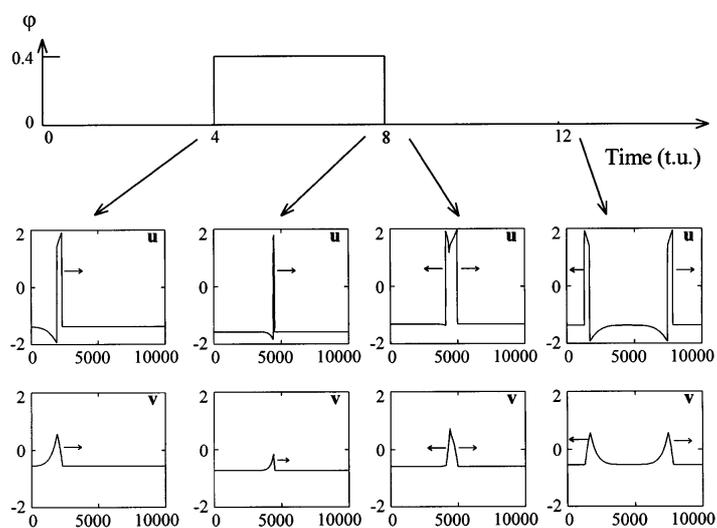


Abbildung 3.10: Simulation von Wellenaufspaltung durch zeitliche Variation des lichtsensitiven Parameters φ im Reaktions-Diffusions-System (3.14). Die Abbildungen ist aus [106] entnommen.

Kapitel 4

Mathematische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die notwendigen mathematischen Grundlagen dargestellt, die zur Behandlung der durch die Modellierung erhaltenen mathematischen Gleichungen benötigt werden.

In den ersten drei Unterkapiteln findet sich eine Einführung in die grundlegenden Begriffsbildungen und ein Überblick über die Existenz- und Eindeutigkeitsfrage von Anfangswertproblemen von gewöhnlichen Differentialgleichungen (engl. ordinary differential equations, ODEs). Anschließend wird die numerische Behandlung von ODEs kurz dargestellt.

Da diese Arbeit auch eine Methode zur Analyse von Steuerfunktionen, um ein erwünschtes Systemverhalten zu erhalten, enthält, mit deren Hilfe Modellierer systematisch potentielle Regulationsprozesse analysieren können, wird ebenfalls eine kurze Einführung in die darin verwendeten mathematische Behandlung von Optimalsteuerungsproblemen gegeben.

Weil hier vor allem Modellierung von raumzeitlichen Strukturbildungsprozessen behandelt wird, wird abschließend ein kurzer Überblick über die mathematische Klassifizierung und Behandlung von partiellen Differentialgleichungen (engl. partial differential equations, PDEs) gegeben.

4.1 Theoretische Grundlagen für gewöhnliche Differentialgleichungen

4.1.1 Einführung

Durch

$$\frac{dx(t)}{dt} = \dot{x}(t) = f(t, x(t)), \quad t \in I \quad (4.1)$$

ist eine *explizite gewöhnliche Differentialgleichung erster Ordnung* gegeben. Dabei ist $x : I \rightarrow \mathbb{R}^n$ eine gesuchte differenzierbare Funktion auf einem Intervall $I \subset \mathbb{R}$ und $f : D \subset \mathbb{R} \times \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}^n$ eine gegebene Funktion. Falls $n = 1$ spricht man von einer *skalaren gewöhnlichen Differentialgleichung* und falls $n > 1$ von einem *System gewöhnlicher Differentialgleichungen*. Die Differentialgleichung (4.1) heißt *gewöhnlich*, da die unbekannte Funktion nur von einer reellen Variablen abhängt [168].

Bei der Lösung eines *Anfangswertproblems* sucht man nach einer Lösung $x : I \subset \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}^n$, $x \in \mathcal{C}^1$, die im vorgegebenen Anfangswert $(t_0, x_0) \in D \subset \mathbb{R} \times \mathbb{R}^n$ startet, so dass neben der Differentialgleichung (4.1) die Anfangsbedingung $x(t_0) = x_0$ erfüllt ist.

4.1.2 Existenz und Eindeutigkeit

Nach der generellen Problemformulierung werden nun in diesem Abschnitt die mathematischen Sätze dargestellt, mit deren Hilfe die Frage nach Existenz und Eindeutigkeit der Lösung von Anfangswertproblemen geklärt werden sollen [10].

Satz 4.1 (Satz von Peano) *Gegeben sei die stetige Funktion $f : D \rightarrow \mathbb{R}^n$ auf einer offenen Teilmenge $D \subset \mathbb{R}^{1+n}$. Dann besitzt jedes Anfangswertproblem*

$$\dot{x}(t) = f(t, x(t)), \quad x(t_0) = x_0, \quad (t_0, x_0) \in D \quad (4.2)$$

eine lokale Lösung, d.h. es gibt ein $\beta = \beta(t_0, x_0) > 0$ derart, dass das Anfangswertproblem (4.2) auf dem Intervall $[t_0 - \beta, t_0 + \beta]$ mindestens eine Lösung besitzt.

Beweis: Siehe Aulbach [10].

Somit existiert nach dem Satz von Peano eine Lösung eines Anfangswertproblems, wenn dessen rechte Seite $f(t, x(t))$ stetig ist. Die Eindeutigkeit der Lösung wird durch eine Verschärfung der Stetigkeitsvoraussetzung an $f(t, x(t))$ mit der sogenannten „Lipschitz-Stetigkeit“ bezüglich der Variable x erreicht.

Definition 4.2 *Gegeben sei die Funktion $g : D \subseteq \mathbb{R}^{m+n} \rightarrow \mathbb{R}^k$. Gibt es hierbei eine Konstante $L \geq 0$ mit*

$$\|g(s, x) - g(s, y)\| \leq L\|x - y\| \text{ für alle } (s, x), (s, y) \in D,$$

*so sagt man, die Funktion $g(s, x)$ genüge auf D einer (globalen) **Lipschitz-Bedingung** bezüglich x (mit der **Lipschitz-Konstante** L), beziehungsweise*

die Funktion $g(s, x)$ sei (global) **Lipschitz-stetig** bezüglich x in D .

Wenn es zu jedem Punkt in D eine Umgebung U gibt, so dass die Einschränkung von $g(s, x)$ auf $U \cap D$ dort einer Lipschitz-Bedingung bezüglich x genügt, so heißt $g(s, x)$ (lokal) **Lipschitz-stetig** bezüglich x in D .

Ist $g(s, x)$ von s unabhängig, so entfällt bei den zuvor genannten Begriffbildungen der Zusatz „bezüglich x “.

Da eine Forderung nach globaler Lipschitz-Stetigkeit sehr einschränkend ist und nur wenige Differentialgleichungen diese Forderungen erfüllen, wird für die Formulierung des Satzes von Picard-Lindelöf der Begriff der lokalen Lipschitz-Stetigkeit verwendet.

Satz 4.3 (Satz von Picard-Lindelöf) *Ist D eine offene Teilmenge des \mathbb{R}^{1+n} und ist $f : D \rightarrow \mathbb{R}^n$ stetig und bezüglich x (lokal) Lipschitz-stetig, so besitzt jedes der Anfangswertprobleme*

$$\dot{x}(t) = f(t, x(t)), \quad x(t_0) = x_0, \quad (t_0, x_0) \in D$$

eine eindeutig bestimmte lokale Lösung, d.h. es existiert ein $\beta = \beta(t_0, x_0) > 0$ derart, dass das Anfangswertproblem auf dem Intervall $[t_0 - \beta, t_0 + \beta]$ genau eine Lösung besitzt.

Beweis: Siehe Aulbach [10].

4.2 Numerische Lösung von Anfangswertproblemen

Dieser Abschnitt befasst sich mit der numerischen Lösung von Anfangswertproblemen von sogenannten steifen gewöhnlichen Differentialgleichungen. Dabei wird insbesondere auf die Methoden eingegangen, die im Integrator LIMEX [33] implementiert sind. LIMEX basiert auf einem Extrapolationsverfahren mit linear-impliziter Eulerdiskretisierung und ist frei verfügbar [33].

4.2.1 Steife Differentialgleichungen

Für Anfangswertprobleme

$$\dot{x}(t) = f(t, x(t)), \quad x(t_0) = x_0, \tag{4.3}$$

die in der Modellierung von biochemischen Prozessen auftreten, wird häufig das Problem der *Steifheit* beobachtet. Für diese Eigenschaft gibt es keine ein-

heitliche Definition. Steifheit wurde zum ersten Mal von Curtiss und Hirschfelder [29] erwähnt, die zusammengefasst steife Gleichungen dadurch charakterisiert haben, dass bei ihrer numerischen Lösung bestimmte sogenannte implizite Lösungsverfahren besser funktionieren als sogenannte explizite Lösungsverfahren. Dies wird im nächsten Kapitel näher erläutert. Eine gebräuchliche Definition ist die folgende

Definition 4.4 Das System (4.3) heißt **steif**, wenn Eigenwerte λ_i der Matrix $\frac{df}{dx}$, die aus dem System (4.3) folgt, existieren mit

$$\left\| \frac{df}{dx}(t, x(t)) \right\| |t_f - t_0| \gg 1,$$

für welche

$$\operatorname{Re}(\lambda_i) \ll 0$$

gilt, wobei $[t_0, t_f]$ das betrachtete Zeitintervall ist.

Anschaulich bedeutet Steifheit, dass es Lösungskomponenten des Anfangswertproblems gibt, die sich langsam ändern, es aber ebenfalls Lösungskomponenten gibt, die sich schnell ändern. Im biochemischen Kontext bedeutet dies, dass es sehr schnelle, aber auch sehr langsame Reaktionen gibt.

4.2.2 Extrapolationsverfahren

Extrapolation ist ein Verfahren zur Konvergenzbeschleunigung numerischer Methoden zur Lösung von Differentialgleichung [52]. Diese Technik wird nun in diesem Kapitel am Beispiel von Einschrittverfahren erklärt.

Ein *Einschrittverfahren* approximiert die Lösung $x(t) : I \subset \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}^n$ eines Anfangswertproblems

$$\dot{x}(t) = f(t, x), \quad x(t_0) = x_0 \quad (4.4)$$

durch eine Gitterfunktion $v_h(t) : I_h \rightarrow \mathbb{R}^n$, wobei ein äquidistantes Gitter

$$I_h = \{t \in [t_0, t_{\max}] : t = t_l, l = 0, \dots, N, t_l = t_0 + lh\} \quad (4.5)$$

mit $v_h(t_l) = v_l$ für $t_l \in I_h$ angenommen wird.

Definition 4.5 Ein **Einschrittverfahren** zur Bestimmung einer Gitterfunktion $v_h(t) : I_h \rightarrow \mathbb{R}^n$ hat die Gestalt

$$\begin{aligned} v_{l+1} &= v_l + h\phi(t_l, v_l, h), \quad l = 0, \dots, N-1 \\ v_0 &= x_0. \end{aligned} \quad (4.6)$$

Dabei heißt ϕ **Verfahrensfunktion** des *Einschrittverfahrens*.

Das explizite Eulerverfahren mit

$$\phi(t_l, v_l, h) = f(t_l, v_l)$$

ist das einfachste Einschrittverfahren zur Lösung eines Anfangswertproblems und seine implizite Form ist gegeben durch

$$\phi(t_l, v_l, h) = f(t_{l+1}, v_{l+1}).$$

Offensichtlich ist beim explizitem Eulerverfahren nur eine Auswertung der rechten Seite der Differentialgleichung notwendig, wobei beim impliziten Eulerverfahren ein nichtlineares Gleichungssystem gelöst werden muss und es somit numerisch aufwendiger ist.

Um eine qualitative Untersuchung der unterschiedlichen Verfahren zu ermöglichen, werden nun grundlegende Begriffe eingeführt.

Definition 4.6 Das *Einschrittverfahren* (4.6) heißt **konsistent** für das Anfangswertproblem (4.4), falls für den **lokalen Diskretisierungsfehler**

$$\tau(t_{l+1}) = \tau_{t+1} := x(t_{l+1}) - x(t_l) - h\phi(t_l, v_l, h)$$

mit der exakten Lösung des Anfangswertproblems $x(t)$ gilt:

$$\bar{\tau}(h) := \max_{t \in [t_0, t_{\max}]} \frac{\|\tau(t+h)\|}{h} \rightarrow 0 \text{ für } h \rightarrow 0.$$

Es besitzt die **Konsistenzordnung** p , wenn

$$\bar{\tau}(h) = \mathcal{O}(h^p).$$

Die Konsistenzordnung beschreibt somit die Qualität der numerischen Approximation pro Schritt. Da der Fehler der Approximation nach k Schritten nur zum Teil aus dem in jedem Schritt entstehenden lokalen Fehler besteht, sondern von Schritt zu Schritt auch fortgepflanzt werden kann, wird der globale Fehler definiert.

Definition 4.7 Ein *Einschrittverfahren* (4.6) heißt **konvergent** für das Anfangswertproblem (4.4), wenn für jede Gitterfolge I_h für den **globalen Diskretisierungsfehler**

$$\epsilon(h, t) := x(t) - v_h(t), \quad t \in I_h \tag{4.7}$$

die Beziehung

$$\bar{\epsilon} := \max_{t \in I_h} \|\epsilon(h, t)\| \rightarrow 0 \text{ für } h \rightarrow 0$$

gilt. Das Einschrittverfahren hat die **Konvergenzordnung** p , wenn gilt

$$\bar{\epsilon}(h) = \mathcal{O}(h^p).$$

Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, muss bei der Lösung von Anfangswertproblemen neben allgemeinen Eigenschaften wie Konvergenz auch Steifheit berücksichtigt werden, da diese häufig bei biochemischer Modellierung vorkommen. Um die Eignung von numerischen Verfahren zur Lösung von steifen Differentialgleichungen zu untersuchen, hat Dahlquist [30] die Testgleichung

$$\dot{x}(t) = \lambda x(t) \quad (4.8)$$

mit $\lambda \in \mathbb{C}$ und $\operatorname{Re}(\lambda) \leq 0$ vorgeschlagen. Eine Analyse für (4.8) ergibt nach (4.6)

(i) Expliziter Euler: $v_{l+1} = v_l + h\lambda v_l = v_0(1 + h\lambda)^{l+1}$

(ii) Impliziter Euler: $v_{l+1} = v_l + h\lambda v_{l+1} = v_0 \left(\frac{1}{1-h\lambda}\right)^{l+1}$

Damit im expliziten Fall (i) die fallende Lösung $x(t) = x_0 e^{\lambda t}$ von (4.8) approximiert wird, muss gelten

$$|1 + h\lambda| \leq 1 \quad (4.9)$$

und somit erfüllt das Verfahren die Bedingung (4.9) nur für bestimmte h . Im impliziten Fall (ii) ist wegen $\operatorname{Re}(\lambda) \leq 0$ die Ungleichung

$$\left| \frac{1}{1 - h\lambda} \right| \leq 1, \quad (4.10)$$

für alle $h > 0$ erfüllt. Das implizite Verfahren ist somit zwar numerisch aufwendiger, aber für die numerische Behandlung von steifen Differentialgleichungen aufgrund dieser Überlegungen geeigneter.

Definition 4.8 Ein numerisches Verfahren heißt **A-stabil (absolut stabil)**, falls seine Anwendung auf das Testproblem (4.8) für jede Schrittweite $h > 0$ stets eine nicht-wachsende Folge von Approximationen v_l erzeugt, so dass

$$|v_{l+1}| < |v_l|$$

für alle l gilt.

Die Anwendung der Einschrittverfahren auf die Testgleichung (4.8) führt auf eine Vorschrift

$$v_{l+1} = R(z)v_l$$

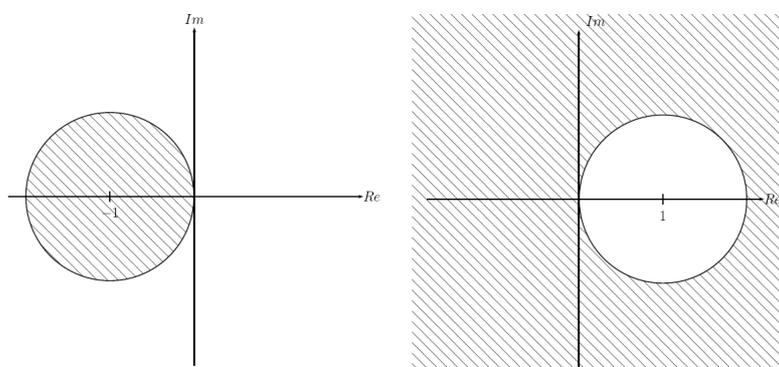


Abbildung 4.1: Links: Stabilitätsgebiet des expliziten Eulerverfahrens; rechts: Stabilitätsgebiet des impliziten Eulerverfahrens.

mit der zum Verfahren gehörigen *Stabilitätsfunktion* R und $z := h\lambda$. Beim expliziten Eulerverfahren ist $R(z) := 1 + z$, und beim impliziten dagegen $R(z) := 1/(1 - z)$.

Definition 4.9 Das **Stabilitätsgebiet** eines *Einschrittverfahrens* (4.6) ist die Menge

$$S := \{z \in \mathbb{C} : |R(z)| \leq 1\}.$$

Daraus folgt die Äquivalenz:

Satz 4.10 Für ein *Einschrittverfahren* (4.6) gilt¹:

$$A - \text{stabil} \Leftrightarrow \mathbb{C}^- \subset S.$$

In Abbildung 4.1 sind die Stabilitätsgebiet des impliziten und expliziten Eulerverfahrens dargestellt. Liegt $z = h\lambda$ in S (schraffierte Fläche) so arbeitet das Verfahren stabil, sonst instabil. Da beim impliziten Eulerverfahren die komplette negative Halbebene in S enthalten ist, ist dieses Verfahren A -stabil und es gibt für dieses Verfahren keine Einschränkung an die Schrittweite h . Da die A -Stabilität für viele numerische Verfahren eine zu starke Einschränkung darstellt, führte Widlund [171] als eine Abschwächung die $A(\alpha)$ -Stabilität ein.

¹ \mathbb{C}^- bezeichnet hier die linke Halbebene der komplexen Zahlenebene.

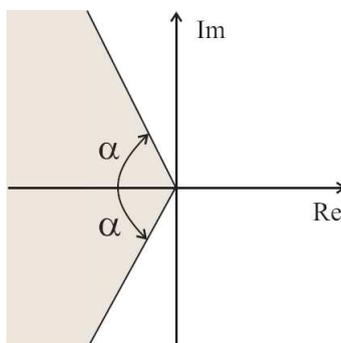


Abbildung 4.2: Stabilitätsgebiet eines $A(\alpha)$ -stabilen numerischen Verfahrens.

Definition 4.11 Ein numerisches Verfahren heißt **$A(\alpha)$ -stabil** mit $0 < \alpha < \frac{\pi}{2}$, wenn gilt

$$S_\alpha := \{z \in \mathbb{C}^- : |\arg(z) - \pi| \leq \alpha\} \subset S.$$

Das Stabilitätsgebiet eines $A(\alpha)$ -stabilen numerischen Verfahrens enthält demnach statt der kompletten negativen Halbebene nur deren Teilgebiet mit dem Winkel α (siehe Abbildung 4.2).

Im LIMEX-Integrator wird ein linear-implizites Eulerverfahren [33] verwendet. Dieses Verfahren eignet sich genauso gut für steife Differentialgleichungen wie das implizite Eulerverfahren, erfordert jedoch weniger Rechenaufwand [32], da in jedem Integrationsschritt nur ein lineares Gleichungssystem zu lösen ist. Dazu wird die Differentialgleichung (4.4) in die Form

$$\dot{x}(t) = Jx(t) + f(t, x(t)) - Jx(t), \quad J \approx \frac{\partial f}{\partial x}(t, x(t))$$

gebracht und nur der erste lineare Summand $Jx(t)$ implizit diskretisiert. Somit hat ein linear-implizites Eulerverfahren folgende Gestalt

$$(I - hJ)(v_{l+1} - v_l) = hf(t_l, v_l).$$

Da hier nur eine Variante des Eulerverfahrens verwendet wird, ist die Konsistenzordnung $p = 1$ und somit sehr klein. Verfahren höherer Ordnung lassen sich mit Hilfe von Extrapolation konstruieren. Dazu wird zu einer vorgegebenen Grundschriftweite h und einer monoton fallenden Folge

$$H = \{h_i : h_i = \frac{h}{n_i}, n_i \in \mathcal{F}, i = 0, \dots, k\}$$

lokaler Schrittweiten h_i eine Folge von Näherungen mit Hilfe eines Grundverfahrens mit der Verfahrensfunktion ϕ berechnet

$$\begin{aligned} z^0 &:= v_l \\ z^{d+1} &:= z^d + h_i \phi(t_l + dh_i, z^d, h_i), \quad d = 0, \dots, n_i - 1 \\ v_{l+1} &:= z^{n_i}. \end{aligned}$$

\mathcal{F} ist eine monoton steigende Folge natürlicher Zahlen. In LIMEX wird z.B. eine harmonische Folge $\mathcal{F} = \{1, 2, 3, \dots\}$ verwendet [32]. Durch die berechneten Näherungen wird ein Interpolationspolynom gelegt und durch Extrapolation auf die Schrittweite 0 erhält man dann eine Approximation der exakten Lösung an der Stelle t_{l+1} , deren Ordnung größer als die Ordnung des verwendeten Grundverfahrens ist. Dies ist möglich, da eine asymptotische Entwicklung des globalen Diskretisierungsfehlers bezüglich der Schrittweite h gegeben ist.

Satz 4.12 (Satz von Gragg) *Seien f aus dem Anfangswertproblem (4.4) und die Verfahrensfunktion ϕ des Einschrittverfahrens (4.6) der Ordnung $p \geq 1$ hinreichend oft differenzierbar. Der lokale Diskretisierungsfehler des Einschrittverfahrens besitze eine asymptotische Entwicklung der Form*

$$\tau(t_{l+1}) = d_{p+1}(t_{l+1})h^{p+1} + \dots + d_{p+q}(t_{l+1})h^{p+q} + D(t_{l+1}, h)h^{p+q+1}$$

mit stetig differenzierbaren $d_i(t_{l+1})$. Dann besitzt auch der globale Diskretisierungsfehler für alle $h \in H$ eine asymptotische h -Entwicklung der Form

$$\epsilon(h, t_{l+1}) = e_p(t_{l+1})h^p + \dots + e_{p+q-1}(t_{l+1})h^{p+q-1} + E_{p+q}(t_{l+1}, h)h^{p+q}.$$

Dabei sind die Funktionen $e_i : [t_l, t_{l+1}] \rightarrow \mathbb{R}^n$ stetig differenzierbar und genügen der Differentialgleichung

$$\dot{e}_i(t) = \frac{\partial f}{\partial x}(t, x)e_i(t) - d_{i+1}, \quad e_i(t_l) = 0, \quad i = p, \dots, p+q-1.$$

Desweiteren gibt es ein $\bar{h} > 0$ und ein $M < \infty$, so dass das Restglied mit

$$\|E_{p+q}(t_{l+1}, h_i)\| \leq M \quad \text{für alle } h_i \leq \bar{h}$$

beschränkt bleibt. Für symmetrische Verfahren existiert eine asymptotische Entwicklung in h^2 .

Beweis: Siehe [157].

Mit $T(h_i^\gamma) := z^{n_i}$, $\gamma \in \{1, 2\}$ folgt aus der Definition des globalen Diskretisierungsfehlers (4.7) und aus dem Satz 4.10, dass $T(h_i^\gamma)$ eine asymptotische

Entwicklung besitzt. Wird darüberhinaus das Restglied vernachlässigt, so stellt $T(h_i^\gamma)$ näherungsweise ein Polynom in h_i^γ dar. Das Interpolationspolynom zu den Stützstellen $T(h_i^\gamma)$ hat dann folgende Gestalt

$$P(h^\gamma) = x(t_{l+1}) - e_p h^{\gamma p} - \dots - e_{p+k} h^{\gamma(p+k)}$$

mit

$$P(h_i^\gamma) = T(h_i^\gamma), \quad i = 0, \dots, k.$$

Die Extrapolation des Polynoms $P(h_i^\gamma)$ auf die Schrittweite Null erfolgt schließlich mit der Aitken-Neville-Formel [21]

$$\begin{aligned} T_{i,0} &:= T(h_i^\gamma), \quad i = 0, \dots, k \\ T_{i,j} &:= T_{i,j-1} + \frac{T_{i,j-1} + T_{i-1,j-1}}{\left(\frac{n_i}{n_{i-j}}\right)^\gamma - 1}, \quad j = 1, \dots, k, \quad i = j, \dots, k \end{aligned} \quad (4.11)$$

mit dem bekannten Schema

$$\begin{array}{ccccccc} & & & & & & T_{0,0} \\ & & & & & & T_{1,0} & T_{1,1} \\ & & & & & & T_{2,0} & T_{2,1} & T_{2,2} \\ & & & & & & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots \\ & & & & & & T_{k,0} & \dots & \dots & \dots & T_{k,k} \end{array}$$

Jedes Element $T_{i,j}$ aus dem obigen Tableau ist ein Einschnittverfahren mit der Konvergenzordnung $(j + 1)\gamma$ bezüglich der Grundschriftweite h [21]. Somit lässt sich mit Hilfe der Extrapolation die Ordnung der Einschnittverfahren erhöhen. Allerdings verliert man mit steigender Ordnung an Stabilität und es liegt bei einer Extrapolation des linear-impliziten Eulerverfahrens (wie in LIMEX implementiert) ab der dritten Spalte des Extrapolationstableaus (4.11) keine A-Stabilität mehr vor. Die resultierenden Verfahren sind in diesem Fall $A(\alpha)$ -stabil mit $\alpha = 89.77^\circ$ [32].

4.3 Theorie und numerische Lösung von Optimalsteuerungsproblemen

In dieser Arbeit wird als ein Aspekt zur Analyse von möglichen dynamischen Regulationen in biochemischen Reaktionsnetzwerken eine Methode vorgestellt, die auf der mathematischen Lösung von Optimalsteuerungsproblemen basiert. Dazu wird nun ein kurzer Überblick über den mathematischen Hintergrund gegeben, wobei auf die direkte Mehrzielmethode näher eingegangen wird, die in der verwendeten Software MUSCOD-II [88] implementiert ist.

4.3.1 Einführung in Optimalsteuerungsprobleme

Problemformulierung

Unter einem Optimalsteuerungsproblem für gewöhnliche Differentialgleichungen [88] in der Form, in der es in dieser Arbeit auftaucht und das hier kurz erläutert werden soll, versteht man folgendes System:

$$\min_{x,u} J[x, u] = \int_{t_0=0}^{t_f} \Phi(t, x(t), u(t)) dt \quad (4.12a)$$

unter den Nebenbedingungen

$$\dot{x}(t) = f(t, x(t), u(t)), \quad t \in [t_0, t_f] \quad (4.12b)$$

$$r_0(x(t_0)) + r_f(x(t_f)) = 0 \quad (4.12c)$$

$$g(t, x(t), u(t)) \geq 0, \quad t \in [t_0, t_f], \quad (4.12d)$$

wobei $x(t) \in \mathbb{R}^n$ die Zustände und $u(t) \in \mathbb{R}^k$ die Steuerungsfunktionen sind. Das Zeitintervall $I = [t_0, t_f]$ wird als fest angenommen. Die Funktionen $\Phi : I \times \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}^k \rightarrow \mathbb{R}$, $g : I \times \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}^k \rightarrow \mathbb{R}^l$ und $r_0, r_f : \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}^l$ sollen stetig differenzierbar sein. r_0, r_f bezeichnen die Randbedingungen des Optimalsteuerungsproblems. An $f : I \times \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}^k \rightarrow \mathbb{R}^n$ werden die üblichen Existenz- und Eindeutigkeitsannahmen gestellt. Das Zielfunktional Φ aus (4.12a) wird üblicherweise als Lagrange-Typ bezeichnet.

Das resultierende unendlich dimensionale Optimierungsproblem über dem Funktionenraum der Steuerungsfunktionen muss für eine numerische Behandlung in ein endlich dimensionales Problem parametrisiert werden. Hierfür wird in der in dieser Arbeit eingesetzten Software MUSCOD-II die von Bock und Plitt [22] entwickelte *direkte Mehrzielmethode* (engl. *Multiple Shooting*) angewandt.

Das Zeitintervall wird dabei durch die Einführung eines Gitters $t_0 = 0 = \tau_0 < \tau_1 < \dots < \tau_m = t_f$ in Unterintervalle $I_i = [\tau_i, \tau_{i+1}]$ – sogenannte *Multiple Shooting Intervalle* – aufgeteilt. Auf den Multiple-Shooting-Intervallen I_i wird die Steuerung $u(t)$ durch lokale Ansatzfunktionen $\bar{\varphi}(\tau)|_{I_i}$ beschrieben. Diese lokalen Ansatzfunktionen können beispielsweise als stückweise konstant (wie in Abbildung 4.3), stückweise linear oder stückweise kubische Polynome angenommen werden. Anschließend werden die Zustände $x(t)$ ebenfalls auf demselben Gitter diskretisiert. Eine sehr gute Darstellung dieser Methode kann in [20, 88] gefunden werden. Dadurch wird das unendlich dimensionale Optimalsteuerungsproblem in ein endlich dimensionales Problem überführt. Bei der Mehrzielmethode wird auf jedem Subintervall das Anfangswertpro-

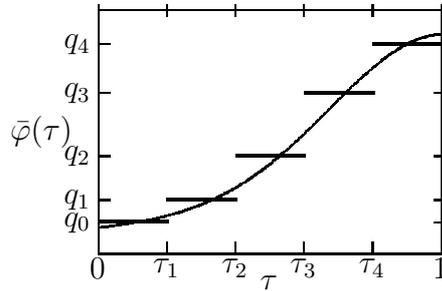


Abbildung 4.3: Stückweise konstante Parametrisierung auf fünf Multiple-Shooting-Intervallen auf einem Zeithorizont $t \in [0, 1]$. Als Beispiel wird $\bar{\varphi}(t)|_{I_i} = q_i$ gewählt.

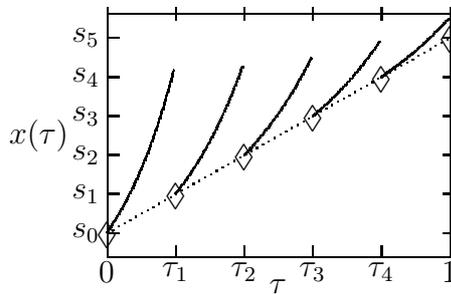


Abbildung 4.4: Zustandsparametrisierung mit fünf Multiple-Shooting-Intervallen auf einem Zeithorizont $t \in [0, 1]$.

blem

$$\begin{aligned} \dot{x}_i(\tau) &= f(\tau, x_i(\tau), \bar{\varphi}(\tau)) \\ x_i(\tau_i) &= s_i \end{aligned} \quad (4.13)$$

gelöst und somit hängen die Trajektorien $x_i(\tau)$ auf den Intervallen I_i nur von den lokalen neu eingeführten Startwerten s_i und den Steuerungsfunktionen auf dem Intervall $[\tau_i, \tau_{i+1}]$ ab und können somit simultan gelöst werden, wobei dann zwischen den Multiple-Shooting-Intervallen unstetige Lösungen resultieren können (siehe Abbildung 4.4). Die Stetigkeit der optimalen Lösung wird durch zusätzlichen Gleichungsbedingungen

$$s_{i+1} = x_i(\tau_{i+1}; s_i) \quad (4.14)$$

gesichert (siehe Abbildung 4.5). Um Konsistenz der Problemformulierung zu sichern, wird darüberhinaus für den Startwert $s_0 = x_0$ verlangt. Durch (4.13) und (4.14) werden die zusätzlichen Freiheitsgrade, die durch die Einführung der Multiple-Shooting-Knoten s_i erworben wurden, wieder eliminiert.

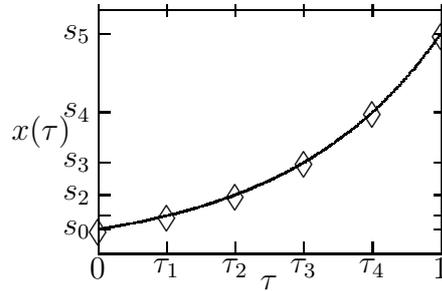


Abbildung 4.5: Die stetige Lösung des Optimierungsproblems.

Mit Hilfe dieser Parametrisierungen kann das resultierende endlich dimensionale nichtlineare Optimierungsproblem (NLP) formuliert werden:

$$\min_{s_0, \dots, s_m, \bar{\varphi}} \sum_{i=0}^{m-1} \int_{\tau_i}^{\tau_{i+1}} \Phi(\tau, x_i(\tau), \bar{\varphi}(\tau)) d\tau \quad (4.15a)$$

unter den Nebenbedingungen

$$x_i(\tau_{i+1}; s_i) - s_{i+1} = 0, \quad i = 0, \dots, m - 1 \quad (4.15b)$$

$$x_0 - s_0 = 0 \quad (4.15c)$$

$$g(\tau_i, s_i, \bar{\varphi}_i) \geq 0, \quad i = 0, \dots, m, \quad \tau \in [\tau_i, \tau_{i+1}] \quad (4.15d)$$

$$r_0(s_0) + r_f(s_m) = 0. \quad (4.15e)$$

Das NLP (4.15) besteht zwar aus mehr Variablen als ein durch beispielsweise durch Single-Shooting parametrisierte Problem, kann aber durch die entkoppelte Struktur des Problems und nach Anwendung von Kondensieralgorithmen mit geringfügig mehr Aufwand gelöst werden [88].

Lokale Optimalitätsbedingungen

Um Optimierungsprobleme wie das NLP (4.15) mathematisch zu behandeln, stellt sich die Frage, wann eine Lösung optimal ist. Dazu betrachten wir das allgemeine Optimierungsproblem

$$\min_x f(x), \quad f : \mathbb{R}^{n_x} \rightarrow \mathbb{R}, \quad x \in \mathbb{R}^{n_x} \quad (4.16a)$$

unter den Nebenbedingungen

$$g(x) = 0 \quad g : \mathbb{R}^{n_x} \rightarrow \mathbb{R}^{n_2} \quad (4.16b)$$

$$h(x) \geq 0 \quad h : \mathbb{R}^{n_x} \rightarrow \mathbb{R}^{n_3}. \quad (4.16c)$$

Hier werden nur die für die Arbeit notwendigen Definitionen und Sätze erwähnt. Für eine detailliertere Einführung sei auf [113] verwiesen.

Definitionen 4.13

- Die Menge $S := \{x \mid g(x) = 0, h(x) \geq 0\}$ heißt **zulässige Menge**.
- Ein Punkt x^* heißt **lokales Minimum**, falls eine Umgebung $U(x^*)$ existiert für die gilt: $f(x^*) \leq f(x) \forall x \in S \cap U$.
- Die Funktion $\mathcal{L}(x, \lambda, \mu) := f(x) - \lambda^T g(x) - \mu^T h(x)$ heißt **Lagrange-Funktion**, wobei $\lambda \in \mathbb{R}^{n_2}$ und $\mu \in \mathbb{R}^{n_3}$. λ und μ werden **Lagrange-Multiplikatoren** genannt.
- Die Menge $I = \{i \mid h_i(x) = 0\}$ heißt **aktive Menge**. Die aktiven Ungleichungen werden mit $\tilde{h}(x)$ bezeichnet.
- Ein Punkt \bar{x} heißt **regulärer Punkt**, wenn die Matrix $\frac{\partial \tilde{g}(\bar{x})}{\partial x}$ regulär ist, wobei $\tilde{g}(x) = \begin{pmatrix} g(x) \\ \tilde{h}(x) \end{pmatrix}$.

Satz 4.14 (Notwendige Bedingung 1. Ordnung) Sei x^* ein lokales Minimum von (4.16) und regulär. Dann existieren $\lambda^* \in \mathbb{R}^{n_2}$ und $\mu^* \in \mathbb{R}^{n_3}$, so dass

$$\nabla_x \mathcal{L}(x^*, \lambda^*, \mu^*) = 0 \quad (4.17a)$$

$$g(x^*) = 0 \quad (4.17b)$$

$$h(x^*) \geq 0 \quad (4.17c)$$

$$\mu^* \geq 0 \quad (4.17d)$$

$$\mu_j^* h_j(x^*) = 0, \quad j = 1, \dots, n_3. \quad (4.17e)$$

Ein Punkt, der diese Bedingungen erfüllt, wird als **Karush-Kuhn-Tucker (KKT) Punkt** bezeichnet.

Beweis: Siehe [113].

Ein Minimum des Optimierungsproblems 4.16 muss also notwendig eine Nullstelle der Ableitung der Lagrangefunktion sein. Dies wird bei der Erläuterung der numerischen Methoden im nächsten Kapitel verwendet.

Um das nichtlineare Optimierungsproblem numerisch zu lösen, wird das ursprüngliche Problem durch eine Folge von Unterproblemen ersetzt. Eine Verfahren, welches dies anwendet, ist das sogenannte SQP-Verfahren (Sequential-Quadratic-Programming-Verfahren) von Han und Powell [50, 127].

4.3.2 Numerische Behandlung von Optimalsteuerungsproblemen

4.3.3 Sequentielle Quadratische Optimierung

Die Idee eines SQP-Verfahrens ist ein nichtlineares Problem durch eine Folge leichter zu lösender quadratischer Probleme zu ersetzen. Dazu wird eine Folge von approximierenden Lösungen

$$x_{k+1} = x_k + \alpha_k p_k$$

erzeugt, wobei $\alpha_k \in \mathbb{R}$ ein Dämpfungsfaktor (Schrittweite) und $p_k \in \mathbb{R}^n$ die Suchrichtung ist. p_k wird dabei aus der Lösung des quadratischen Subproblems

$$\min_p \nabla f_k^T p + \frac{1}{2} p^T \nabla_x^2 \mathcal{L}_k p \quad (4.18a)$$

unter den linearisierten Nebenbedingungen

$$h_k + \nabla h_k^T p = 0 \quad (4.18b)$$

$$g_k + \nabla g_k^T p \geq 0 \quad (4.18c)$$

erhalten. Für x_{k+1} wird dabei gefordert, dass es in der linearen Approximation zulässig ist. Exakte Zulässigkeit bezüglich der nichtlinearen Beschränkungen wird deshalb nicht gefordert, weil es in einer Implementierung zu ineffizient wäre (vgl. [88]). Es wird bei System (4.18) gefordert, dass in einem Optimum der Gradient der Lagrangefunktion identisch Null sein muss, wie es bei Satz 4.14 gefordert ist. Das quadratische Unterproblem (4.18) wird dann in jedem Schritt gelöst. Wenn dadurch keine weiteren Verbesserungen gefunden werden (d.h. $p_k = 0$), ist die Lösung der Folge mit der optimalen Lösung des ursprünglichen Problems identisch². Die Lagrange-Multiplikatoren der Ungleichung (4.18c) können durch „Active Set“ Strategien (siehe [113]) erhalten und dazu verwendet werden das nächste quadratische Unterproblem zu formulieren.

Der Vorteil dieser Methode ist, dass das Verfahren lokal quadratisch konvergiert, wenn die exakten aktiven Mengen und die exakte Hessematrix $\nabla_x^2 \mathcal{L}$ verwendet werden. Normalerweise wird die exakte Hessematrix meist nicht berechnet, da diese Berechnung numerisch sehr teuer werden kann, sondern durch Update-Formeln angenähert. Um eine Globalisierung der Konvergenz

²In der numerischen Optimierung wird gefordert, dass der Wert des Gradienten der Lagrange-Funktion kleiner als eine sogenannte KKT-Toleranz ist.

zu erreichen, wird der Dämpfungsfaktor α_k verwendet, der aber unter Verwendung von Update-Formeln keine quadratische sondern bestenfalls eine superlineare Konvergenz des Verfahrens sichert [113]. Für detailliertere Erläuterungen sei z.B. auf [88] verwiesen.

4.4 Mathematische Behandlung von partiellen Differentialgleichungen

4.4.1 Charakterisierung

Partielle Differentialgleichungen werden entsprechend dem Grad ihrer Nichtlinearität eingeteilt.

Definition 4.15 Sei $\Omega \subset \mathbb{R}^n$ ein Gebiet, $x \in \Omega$ und $\alpha, \beta \in \mathbb{N}^n$. Eine partielle Differentialgleichung der Ordnung k für eine Funktion $u : \Omega \rightarrow \mathbb{R}$ heißt

1. **linear**, falls sie die Form

$$\sum_{|\alpha| \leq k} a_\alpha(x) D^\alpha u = f(x)$$

hat.

2. **semilinear**, falls sie die Form

$$\sum_{|\alpha|=k} a_\alpha(x) D^\alpha u + a_0(D^{\alpha^1} u, \dots, D^{\alpha^l} u, x) = 0 \text{ mit } |\alpha^1|, \dots, |\alpha^l| \leq (k-1),$$

$l \in \mathbb{N}$ hat.

3. **quasilinear**, falls sie die Form

$$\sum_{|\alpha|=k} a_\alpha(D^{\beta^1} u, \dots, D^{\beta^p} u, x) D^\alpha u + a_0(D^{\alpha^1} u, \dots, D^{\alpha^l} u, x) = 0$$

$$\text{mit } |\alpha^1|, \dots, |\alpha^l|, |\beta^1|, \dots, |\beta^p| \leq (k-1), \quad l, p \in \mathbb{N}$$

hat.

4. **nichtlinear**, falls sie nicht die Form der Fälle 1)-3) hat.

Dabei sei für den Multiindex $\alpha = (\alpha_1, \dots, \alpha_n) \in \mathbb{N}^n$ mit $|\alpha| := \sum_{i=1}^n \alpha_i$

$$D^\alpha u := \frac{\partial^\alpha}{\partial x_1^{\alpha_1} \dots \partial x_n^{\alpha_n}} u, \quad u \in \mathcal{C}^{|\alpha|}(\mathbb{R}^n).$$

Die klassische Klassifikation von linearen partiellen Differentialgleichungen teilt diese in elliptische, hyperbolische und parabolische Gleichungen ein (vgl. [136]).

Definition 4.16 Sei $(x, y) \in \Omega \subset \mathbb{R}^2$. Eine lineare partielle Differentialgleichung zweiter Ordnung³ mit zwei unabhängigen Variablen und konstanten Koeffizienten $a, b, c, d, e, f \in \mathbb{R}^n$ für eine Funktion $u \in \mathcal{C}^2(\Omega)$, $u : \Omega \rightarrow \mathbb{R}$ in der Form

$$a\partial_x^2 u + b\partial_x\partial_y u + c\partial_y^2 u + d\partial_x u + e\partial_y u + fu + g(x, y) = 0$$

heißt

1. elliptisch, falls $b^2 - 4ac < 0$.
2. hyperbolisch, falls $b^2 - 4ac > 0$.
3. parabolisch, falls $b^2 - 4ac = 0$.

Diese Definition lässt sich auf Differentialgleichungen von mehreren Unabhängigen sowie auf Differentialgleichungssysteme verallgemeinern. In dieser Arbeit werden nichtlineare parabolische Differentialgleichungssysteme zweiter Ordnung

$$\partial_t u = f(u) + \Delta u \tag{4.19}$$

betrachtet [155]. $\Delta = \frac{\partial^2}{\partial x_1^2} + \dots + \frac{\partial^2}{\partial x_n^2}$ bezeichnet hierbei den **Laplace-Operator**. Als Randbedingung wird die klassische Neumannsche Randbedingung

$$\partial_n u = g \text{ auf } \partial\Omega \tag{4.20}$$

verwendet, wobei $\partial\Omega$ einen hinreichend glatten Rand beschreibt, und mit

$$u|_{t=0} = u_0, \tag{4.21}$$

das Anfangs-Randwert-Problem definiert ist. Mit dieser Art der Problemformulierung wird entweder ein „Fluss“ in die Zelle $g > 0$ oder eine „Null-Fluss“ Situation $g = 0$ modelliert (weitere Details in Kapitel 7).

Definition 4.17 Sei $\Omega \subset \mathbb{R}^n$ ein Gebiet, $x \in \Omega$, $u \in (\mathcal{C}^2(\Omega))^n$. Ein nicht-lineares System partieller Differentialgleichungen der Form $\partial_t u - f(u) =$

³Für die Übersichtlichkeit sei $\partial_i u := \frac{\partial u}{\partial x_i}$.

$\partial_x(B(u)\partial_x u)$ mit einer $n \times n$ -Matrix B heißt **parabolisch**, falls alle Eigenwerte von $B(u)$ nicht negative Realteile haben.

Bemerkung 4.18 System (4.19) gehört zur Klasse der parabolischen partiellen Differentialgleichungen. Dies folgt unmittelbar daraus, dass die Matrix $B(u)$ eine Diagonalmatrix mit Einsen auf der Diagonalen ist und somit alle Eigenwerte nicht negative Realteile haben.

4.4.2 Numerische Lösung von partiellen Differentialgleichungen

In dieser Arbeit werden auftretende partielle Differentialgleichungen auf zwei Weisen behandelt. Zu Beginn wird eine numerische Approximation durch die sogenannte Finite-Differenzen-Methode erreicht, mit deren Hilfe die räumlichen Ableitungen durch Differenzenquotienten approximiert werden und das resultierende hochdimensionale System gewöhnlicher Differentialgleichungen mit einem geeigneten Integrator in der Zeit integriert wird. Da mit dieser Methode nur umständlich auf die aus der Fragestellung auftretenden Aspekte, wie z.B. Geometriebehandlung, eingegangen werden kann und die in der Software GASCOIGNE [44] implementierte Finite-Elemente-Methode bessere numerische Eigenschaften besitzt, werden komplexerer Problemstellungen mit Hilfe dieser Methode behandelt.

Finite-Differenzen-Methode

Da in dieser Arbeit PDEs in ausschließlich zwei räumlichen Dimensionen untersucht wird, wird hier folgendes Anfangs-Randwertproblem [136] auf dem abgeschlossenen Gebiet $\bar{\Omega} \subset \mathbb{R}^2$ betrachtet:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} - D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} - D \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} &= f(x, y, t), \quad x, y \in \bar{\Omega}, \quad t > 0 \\ u(x, y, 0) &= u_0(x, y), \quad x, y \in \bar{\Omega} \\ \frac{\partial u(x, y, t)}{\partial n} &= g, \quad x, y \in \partial\Omega. \end{aligned} \quad (4.22)$$

Ω bezeichnet das Gebiet ohne Rand und $\partial\Omega$ den Rand des Gebiets.

Bei der Finite-Differenzen-Methode wird das Gebiet $\bar{\Omega}$ mit einer (äquidistanten) Schrittweite h diskretisiert. Es ergibt sich die Menge der Gitterpunkte

$$Z_h := \{(x, y) : x = j_1 h, y = j_2 h \quad j_1 = 0, \dots, N \quad j_2 = 0, \dots, M\}.$$

Daraus ergibt sich die Menge der inneren Gitterpunkte $\Omega_h = \Omega \cap Z_h$, die Menge der diskretisierten Randpunkte $\partial\Omega_h = \partial\Omega \cap Z_h$ und schließlich $\bar{\Omega}_h =$

$\Omega_h \cup \partial\Omega_h$. Auf diesen Gitterpunkten erfolgt die Approximation der räumlichen partiellen Ableitungen durch die sogenannte Fünf-Punkt-Formel, die aus der Approximation des Laplace-Operators durch die Taylorreihe folgt [136].

Definition 4.19 *Auf dem vorliegenden äquidistanten Gitter approximiert die Fünf-Punkt-Formel*

$$(\Delta_h u)(x, y) := \frac{u(x-h, y) + u(x+h, y) + u(x, y-h) + u(x, y+h) - 4u(x, y)}{h^2} + \mathcal{O}(h^2)$$

den Diffusionsterm in zwei räumlichen Dimensionen.

Sei

$$u_j^i \approx u(x_j, y_i, t), \quad j = 0, \dots, N \quad i = 0, \dots, M$$

die approximierte Lösung im Punkt (x_j, y_i) . Dann ergibt sich für $(x, y) \in \Omega$ als Näherung zum Zeitpunkt t

$$\frac{\partial u_j}{\partial t} - D \frac{u_{j-1}^i + u_{j+1}^i + u_j^{i-1} + u_j^{i+1} - 4u_j^i}{h^2} = f(x_j, y_i, t).$$

Die Randpunkte werden analog approximiert, bis auf die Tatsache, dass durch die von-Neumann-Randbedingung verschiedene Terme explizit durch $\partial_n u = g$ gegeben sind.

Liegt u_j^i z.B. auf einer Kante, wird die Randbedingung $\frac{\partial u(x, y, t)}{\partial n} = g$ durch den symmetrischen Differenzenquotienten

$$\frac{u(x, y) - u(x+h, y)}{2h} = g$$

bei einer entsprechenden Kante approximiert, wobei der Punkt $u(x+h, y)$ dann nicht definiert ist. Um dieses Problem zu umgehen, wird diese Formel dann nach $u(x+h, y)$ aufgelöst und in das Diskretisierungsschema eingearbeitet.

Dadurch ergibt sich zum Beispiel für eine Ecke mit $g = 0$ im Punkt (x_{i_e}, y_{j_e})

$$\frac{\partial u_j}{\partial t} - D \frac{u_{j_e+1}^{i_e} + u_{j_e}^{i_e+1} - 2u_{j_e}^{i_e}}{h^2} = f(x_{i_e}, y_{j_e}, t).$$

oder für die Randpunkte

$$\frac{\partial u_j}{\partial t} - D \frac{u_{j_r+1}^{i_r} + u_{j_r}^{i_r+1} + u_{j_r}^{i_r-1} - 3u_{j_r}^{i_r}}{h^2} = f(x_{i_r}, y_{j_r}, t),$$

wobei diese Indizes nur auf eine Seite des Randes zutreffen. Für eine detaillierte Beschreibung sei auf die einschlägige Literatur, wie z.B. [136] oder

[131], verwiesen.

Dieses diskretisierte Problem wird dann durch einen geeigneten Integrator gelöst. Da in der biochemischen Modellierung steife Differentialgleichungen auftreten und durch die beschriebene Diskretisierung der partiellen Ableitung sehr große Systeme entstehen, ist die Wahl eines schnellen, aber auch für steife Systeme geeigneten Integrators nötig. Der in Kapitel 4.2.2 diskutierte Integrator LIMEX ist deswegen eine angebrachte Wahl.

Finite-Elemente-Methode

Wie bei der Methode der Finiten-Differenzen gesehen, wird bei der numerischen Behandlung von partiellen Differentialgleichungen versucht das eigentlich unendlichdimensionale Problem durch geeignete endlich dimensionale Näherungen zu approximieren, um es für eine Behandlung mit Hilfe eines Computers zugänglich zu machen. Bei der Methode der Finiten-Differenzen werden die partiellen Ableitungen durch Differenzenquotienten direkt approximiert und das resultierende System dann numerisch behandelt. Dieser Diskretisierungsprozess wird bei der Methode der Finiten-Elemente durch einen indirekten Ansatz erreicht. Dazu wird die partielle Differentialgleichung zuerst auf eine sogenannte *variationelle Form* gebracht, die sogenannte *Testfunktionen* enthält, und das variationelle Problem wird dann mit Hilfe der Finiten-Elemente diskretisiert.

Der Übersichtlichkeit halber wird in diesem Kapitel nur auf die numerische Behandlung der Wärmeleitungsgleichung als Modellgleichung von parabolischen partiellen Differentialgleichung mittels Finite-Elemente-Methode eingegangen. Eine sehr gute Darstellung der Behandlung von allgemeinen nicht-linearen parabolischen partiellen Differentialgleichungen kann in [77, 131] und [136] gefunden werden.

Die Wärmeleitungsgleichung in zwei Ortsdimensionen mit von-Neumann-Randbedingungen ist gegeben durch

$$\begin{aligned} \partial_t u - \Delta u &= f \text{ in } \Omega \times (0, T), \quad T > 0 \\ \partial_n u &= g \text{ in } \partial\Omega \\ u|_{t=0} &= u_0. \end{aligned} \tag{4.23}$$

Das Definitionsgebiet $\Omega \in \mathbb{R}^2$ wird als glatt berandet oder als konvexes Polygongebiet vorausgesetzt. Die Problemdata f , g und u_0 werden als glatt und kompatibel angenommen, so dass die Lösung ebenfalls als glatt angenommen werden kann.

Als Basis der Finite-Elemente-Methode dient die Formulierung der sogenannten *variationellen Gleichung* von (4.23). Es kann gezeigt werden, dass eine

Lösung von (4.23) diese variationelle Formulierung erfüllen muss (siehe [136]). Um diese Formulierung zu erreichen, wird die partielle Differentialgleichung mit Testfunktionen φ multipliziert, über den Raum Ω integriert und partielle Integration im Raum angewandt (siehe [77, 130, 136]). Mit Hilfe dieser Formulierung kann dann unter gewissen Voraussetzungen Existenz und Eindeutigkeit einer sogenannten *schwachen Lösung* gezeigt werden (siehe [130]). Die variationelle Formulierung von (4.23) lautet dann

$$(\partial_t u, \varphi)_\Omega + a(u, \varphi)_\Omega = (f, \varphi)_\Omega + (g, \varphi)_{\partial\Omega}, \quad \forall \varphi \in V, \quad t > 0, \quad u|_{t=0} = u_0, \quad (4.24)$$

mit dem sogenannten *Sobolev-Raum* V , in dem die Lösung der Variationsgleichung definiert ist, dem L^2 -Skalarprodukt $(u, v)_\Omega = \int_\Omega u(x)v(x)dx$ und der symmetrischen und positiv definiten *Energie-Bilinearform* $a(u, \varphi)_\Omega := (\nabla u, \nabla \varphi)_\Omega$ ⁴.

Zur numerischen Approximation der Variationsgleichung (4.24) werden nun endlich dimensionale Teilräume

$$V_h \subset V \quad (0 < h \leq h_0)$$

gewählt, deren Feinheit durch einen Diskretisierungsparameter h charakterisiert ist. Dieses allgemeine sogenannte *Galerkinsche (Projektions-)Verfahren* bestimmt nun Näherungen der variationelle Formulierung von (4.23) durch die Beziehung

$$(\partial_t u, \varphi_h)_\Omega + a(u, \varphi_h)_\Omega = (f, \varphi_h)_\Omega + (g, \varphi_h)_{\partial\Omega}, \quad \forall \varphi_h \in V_h, \quad u|_{t=0} = u_0, \quad (4.25)$$

wobei für die praktische Realisierung des Projektionsverfahrens eine Basis $\{\varphi_h^{(i)}, i = 1, \dots, N\}$ mit $N := \dim V_h$ gewählt werden muss. Anschließend wird für die zu bestimmende Lösung der Ansatz $u_h(t) = \sum_{j=1}^N \xi_j(t) \varphi_h^{(j)}$ und $u_0 = \sum_{j=1}^N \xi_{j0} \varphi_h^{(j)}$ gemacht. Für jedes $t \in (0, T)$ ist für alle $i = 1, \dots, N$ die Variationsgleichung (4.25) äquivalent zu

$$\sum_{j=1}^N (\varphi_h^{(j)}, \varphi_h^{(i)})_\Omega \frac{d\xi_j(t)}{dt} + \sum_{j=1}^N a(\varphi_h^{(j)}, \varphi_h^{(i)})_\Omega \xi_j(t) = (f, \varphi_h^{(i)})_\Omega + (g, \varphi_h^{(i)})_{\partial\Omega} \quad (4.26)$$

Mit $A := a(\varphi_h^{(j)}, \varphi_h^{(i)})_\Omega$ als sogenannte *Steifigkeitsmatrix*, $M := (\varphi_h^{(j)}, \varphi_h^{(i)})_\Omega$ die sogenannte *Massenmatrix* und den Vektoren $\beta := (f, \varphi_h^{(i)})_\Omega + (g, \varphi_h^{(i)})_{\partial\Omega}$

⁴Eine gute Darstellung der funktionalanalytischen Hintergründe kann z.B. in [158] gefunden werden.

sowie $\xi_0 := \xi_{i0}$ ergibt sich für $\xi(t) := \xi_i(t)$ folgendes System linearer gewöhnlicher Differentialgleichungen mit (im Zeitpunkt) konstanten Koeffizienten:

$$\begin{aligned} B \frac{d}{dt} \xi(t) + A \xi(t) &= \beta, \quad t \in (0, T) \\ \xi(0) &= \xi_0. \end{aligned} \tag{4.27}$$

Die gewöhnliche Differentialgleichung (4.27) kann dann mit einem geeigneten Integrator gelöst werden. Hier ist zu beachten, dass in jedem Zeitschritt durch Integration über das Gebiet beziehungsweise über den Rand die Steifigkeitsmatrix A , die Massenmatrix M und der Vektor β ausgewertet werden müssen.

Bei der Wahl des Integrators muss beachtet werden, dass das System eine generische Steifheit enthält [131] und, da es sich normalerweise um sehr große Systeme handelt, im Hinblick auf die Lösungsökonomie mit wenigen Vektor-Matrix Multiplikationen auskommen soll. Um diese Aspekte zu berücksichtigen, fällt die Wahl normalerweise auf recht einfache Integratoren mit niedriger Ordnung. In dieser Arbeit wurde das implizite Eulerverfahren verwendet (siehe Kapitel 4.2.2), das zusammen mit einer effizienten Implementierung in der am IWR in Heidelberg in der Arbeitsgruppe von Prof. Rannacher entwickelten Finite-Elemente-Bibliothek GASCOIGNE [44] verfügbar ist.

Wahl der Finiten-Elemente

Bei der Wahl der geeigneten Ansatzräume $V_h \subset V$ sowie der Aufstellung der Gleichungssysteme (4.27) sind einige Bedingungen zu beachten. Die Berechnung der Matrixelemente von A sowie der rechten Seite β sollte numerisch billig sein, die Matrix A sollte dünn besetzt sein und es sollte mittels der Ansatzfunktionen möglich sein, allgemeine Gebiete komplexer Geometrie zu approximieren. Es sollten Ansatzfunktionen verwendet werden, die bezüglich der Zerlegung des Gebietes $\bar{\Omega}$ in einfache Teilgebiete T_h (sogenannte *Zellen*) polynomial sind.

Hier sind gängige Beispiele für Zellen in zwei räumlichen Dimensionen Dreiecke oder (konvexe) Vierecke. Mit Hilfe der Wahl dieser Elemente ist es möglich, allgemeine Gebiete automatisch mit Gitterapproximationen zu behandeln. In Abbildung 4.6 ist eine beispielhafte Diskretisierung eines Gebietes Ω mittels Dreiecks- beziehungsweise Viereckselementen dargestellt.

Aufgrund dieser Argumente wurde in dieser Arbeit die in der Finite-Elemente-Bibliothek GASCOIGNE [44] implementierten Vierecke mit automatischer Gittergenerierung gewählt. Für eine gute Diskussion der richtigen Wahl der Elemente sei auf [131] verwiesen.

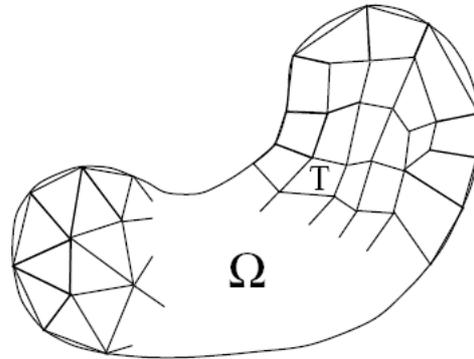


Abbildung 4.6: Finite-Elemente Diskretisierung eines Gebietes Ω mittels Dreiecks- beziehungsweise Viereckselementen. Die Abbildung ist aus [130] entnommen.

Kapitel 5

Strukturbildung in Immunzellen

In diesem Kapitel werden die notwendigen Grundlagen der Immunabwehr durch neutrophile Granulozyten dargestellt. Dazu wird ein kurzer Überblick über die Funktionsweise und Aufgabe von Neutrophilen in der menschlichen Immunabwehr gegeben. Anschließend werden die experimentellen Beobachtungen, die die Grundlage des Modellierungsansatzes dieser Arbeit sind, dargestellt und deren biochemischer Hintergrund diskutiert.

5.1 Immunabwehr durch neutrophile Granulozyten

5.1.1 Das Neutrophil

Neutrophile, auch polymorphkernige Leukozyten genannt, bilden einen wichtigen Teil der menschlichen Immunabwehr gegen eine große Anzahl an gefährlichen Mikroorganismen (Pathogene). Neutrophile akkumulieren durch gezielte Bewegung zu Stellen im Körper, die durch Mikroorganismen infiziert sind. Die Hauptfunktion von Neutrophilen in der menschlichen Immunabwehr ist die Erkennung, Aufnahme (Phagozytose) und Zerstörung der Pathogene. Dazu können Neutrophile Substanzen sekretieren, die die Ausbreitung der Infektion aufhalten und, wenn nötig, auch andere weiße Blutkörperchen zur Entzündung anlocken. Da Neutrophile auf eine Vielzahl von Pathogenen reagieren können, sind sie Teil der sogenannten *angeborenen Immunität*, die weitere Zelltypen umfaßt. Dahingegen werden Zellen der adaptiven Immunität so aktiviert, dass sie speziell auf die entsprechenden Pathogene reagieren können [25, 66].

Entwicklung und Funktion

Neutrophile bilden ungefähr zwei Drittel der weißen Blutkörperchen in unserem Körper [43]. Sie sind kurzlebige Zellen, die überwiegend in drei Bereichen in unserem Körper zu finden sind: dem Knochenmark, dem Blut und dem Gewebe, wobei sie aber normalerweise nicht in gesundem Gewebe zu finden sind. Alle Blutzellen, Lymphozyten, Erythrozyten, Monozyten, Blutplättchen und Granulozyten, stammen vom selben Vorläuferzellentyp im Knochenmark ab. Nachdem die ausdifferenzierten Neutrophile das Knochenmark verlassen haben, zirkulieren sie ungefähr zehn Stunden im Blutstrom. Danach migrieren sie in das umgebende Gewebe, wo sie dann weitere 1-2 Tage überleben. Anschließend wird angenommen, dass ein programmierter Zelltod (Apoptose) stattfindet und die abgestorbenen Zellen durch Makrophagen entsorgt werden, die das Gewebe vor möglichen gefährlichen Substanzen, die durch das Absterben entstehen können, schützen.

Während einer bakteriellen Infektion oder einer Verletzung im Gewebe, werden die Neutrophile durch inflammatorische Mediatoren, die von gewebeständigen Zellen am Ort der Infektion oder den Bakterien selbst sekretiert werden, angezogen, so dass sie den Blutstrom der Blutgefäße verlassen. Anschließend kriechen die Zellen in Richtung des ansteigenden Gradienten der chemotaktisch aktiven Substanz und somit in die Richtung der Infektion. Dieser Prozess wird *Chemotaxis* genannt. Dort wird das Pathogen phagozytiert und durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROS), wie Superoxide und Wasserstoffperoxid, abgetötet.

Der Prozess des Kriechens in Richtung eines Pathogens benötigt Energie, welche Neutrophile im sauerstoffarmen Gewebe überwiegend über die sogenannte anaerobe Glykolyse (siehe Kapitel 6.1) gewinnen, um chemische Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) [134, 174] zu produzieren.

Phagozytose und Degranulation

Auf der Neutrophilzell-Oberfläche werden eine Vielzahl von Rezeptoren präsentiert, mit deren Hilfe die Immunzellen Pathogene erkennen und phagozytieren können. Dies sind Rezeptoren für z.B. das Antikörpermolekül IgG, Komplement-Proteine, Mannose und Oligosaccharide [66]. Nachdem das Neutrophil ein potentiell zu phagozytierendes Partikel erreicht, wird das Partikel mit Plasmamembran umgeben und in die Zelle aufgenommen. Das Partikel ist dann in einem abgeschlossenen Vesikel aus Plasmamembran, dem *Phagosom*, im Cytoplasma eingeschlossen. Der Mechanismus, der das Binden von Pathogenen an die Rezeptoren in ein intrazelluläres Signal umwandelt und somit dann die Phagozytose steuert, ist noch nicht im De-

tail verstanden. Es existieren aber biochemische Hinweise, dass Gradienten von intrazellulärem Ca^{2+} in der Nähe der Peripherie die Aufnahme initiieren [89, 90]. Im Phagosom wird das aufgenommene Pathogen mit *Lysosomen*, Membranvesikel, die hydrolytische Enzyme und Phosphatasen enthalten, fusioniert und ebenfalls hochreaktiven Sauerstoffintermediaten ausgesetzt. Dadurch wird das Pathogen dann zerstört.

Die Produktion von ROS wird unmittelbar nachdem das Neutrophil in Kontakt mit einem chemotaktischen Stimulus steht durch einen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs um das 50- bis 100-fache initiiert [154]. Dies wird durch eine Ansammlung von Enzymen und der Aktivierung der NADPH-Oxidase-Reaktion in der Phagosommembran ausgelöst (für einen Review zur NADPH-Oxidase in Neutrophilen sei auf [145, 169] verwiesen). NADPH-Oxidase reduziert Sauerstoff zu Superoxid (O_2^-), das dann in das Phagosom freigesetzt wird. Gleichzeitig wird Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hypochlorige Säure (HOCl) produziert. Der Sauerstoffverbrauch ist an einen erhöhten Glucoseumsatz und eine Aktivierung des Pentosephosphatwegs (siehe Kapitel 6.1) gekoppelt, durch den das benötigte Redoxäquivalent NADPH produziert wird. Neben der Produktion von ROS werden von Neutrophilen darüberhinaus reaktive Stickstoffintermediate (RNS) produziert. Dieser oxidative Prozess produziert Stickstoffmonoxid (NO) durch Katalyse des Enzyms NO Synthase und verursacht ebenfalls Sauerstoffverbrauch (siehe [154] für einen Review). Es wird angenommen, dass NO durch Reaktion mit ROS zu weiteren cytotoxischen Spezies wie Peroxinitrit (OONO_2^-) [99] ebenfalls bei der Zerstörung der Pathogene eingesetzt wird.

Migration von Neutrophilen

Die schnelle Beweglichkeit der Neutrophile ist die Basis ihrer wichtigen Funktion in der Immunabwehr. Zellmigration hängt von physikalischen und chemischen Begebenheiten ab, da eine Vielzahl von Komponenten darin interagieren und koordiniert werden müssen (siehe [7] für eine gute Einführung in die Zellmigration). Die Transmigration von Neutrophilen aus dem intravasculären in den extravasculären Raum beinhaltet eine Reihe von Ereignissen. Diese umfassen zelluläre Aktivierung durch Liganden, Deformation und Polarisierung der Zelle, Adhärenzen an die Endothelzellen und Migration durch oder zwischen den Endothelzellen.

Vom Prozess der Zellbewegung wird ein sogenannter Mobilitätszyklus [148] angenommen, der folgende Prozesse einschließt und damit anschaulich gut beschrieben werden kann:

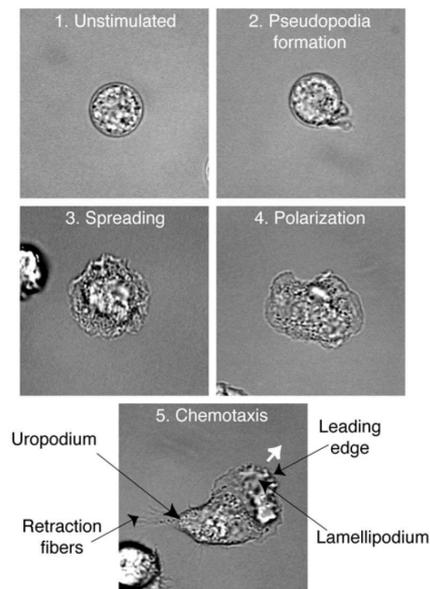


Abbildung 5.1: Aktivierung eines Neutrophils. Ein unstimuliertes, sphärisches Neutrophil entwickelt sich nach Aktivierung in eine typische flache Form. Die Zelle ist dann morphologisch in Richtung steigender Konzentration des Stimulus orientiert. Die Abbildung ist aus [94] entnommen.

1. Ausdehnung der Zellfront
2. Adhäsion an die zelluläre Matrix
3. Kontraktion des Cytoplasmas
4. Lösen der hinteren zellulären Kontakte
5. Recycling der Membranrezeptoren vom Ende zur Front der Zelle

Die Fortbewegung von Neutrophilen nach Aktivierung durch chemotaktische Substanzen beginnt immer mit der Ausbildung von dünnen, d.h. weniger als 200 nm dicken Ausstülpungen, den sogenannten *Pseudopodien* (siehe Abbildung 5.1). Diese Ausstülpungen adhäreren am Substrat der zellulären Matrix und bilden mit der Zeit die Front der Zelle, das sogenannte *Lamellipodium* und bestimmen somit die Richtung der Zellbewegung. Am Ende der Zelle werden die zellulären Kontakte gelöst und die Ausstülpungen wieder zur Zelle retrahiert. Dies bildet das Ende der Zelle, das auch *Uropodium* genannt wird. Durch diesen Prozess formt sich die typische Struktur eines migrierenden Neutrophils mit einer breiteren Front und einem dünneren Ende (siehe Abbildung 5.1).

Chemotaxis

Chemotaxis von Leukozyten ist ein komplexer Prozess, der durch Rezeptor-Ligand Wechselwirkung ausgelöst wird. Es ist generell akzeptiert, dass Rezeptor initiierte Chemotaxis von Leukozyten einer speziellen chemotaktisch aktiven Substanz auch Signale auslösen kann, die Degranulierung und Produktion von ROS zur Folge hat. Die wichtigsten Komponenten dieser Signaltransduktion durch die Rezeptoren ist die anschließende Produktion von Guaninnucleotide (GTP)-bindenden Proteinen (G Proteinen). Der exakte Signaltransduktionsmechanismus ist bis heute unklar.

Nachdem Neutrophile einen chemotaktischen Gradienten wahrnehmen, verändern sie ihre Gestalt und orientieren sich morphologisch in Richtung des ansteigenden Gradienten, wobei aber Korrekturen in der Richtungswahrnehmung kontinuierlich durchgeführt werden. Diese chemotaktische Antwort ist so effektiv, dass die Zelle Konzentrationsunterschiede von ungefähr 1% wahrnehmen kann [180]. Die Position des chemotaktischen Ursprungs versorgt das Neutrophil mit vektoriellen Koordinaten für die gezielte Bewegung.

Es sind heutzutage viele Faktoren bekannt, die diese Immunreaktion auslösen können und somit als chemotaktisch aktive Substanz wirken. Sie haben keine einheitliche chemische Struktur, sondern beinhalten eine große Anzahl von Substanzen, wie zum Beispiel N-formylierte Peptide, die von Bakterien generiert werden, Anaphylatoxine wie C5a und C3a, aber auch zelluläre Produkte wie Leukotriene B₄ (siehe [60, 140] für Reviews).

Richtungsfindung

Der genaue Mechanismus der Richtungsfindung von chemotaktisch migrierenden Neutrophilen ist unklar. In dieser Arbeit wird mathematische Modellierung von Wellenausbreitung in Neutrophilen vorgestellt, die potentiell einen Teil dieser Asymmetrien erklären könnte. Ein hypothetischer Mechanismus, der von Petty et al. diskutiert wurde [125], wäre, dass die Richtung der Zellmigration durch die Richtung von intrazellulärer Wellenausbreitung von chemischen Substanzen bestimmt ist. Dadurch könnte sich die räumliche Organisation der Migrationsbewegung erklären lassen, da die Fortbewegung große Mengen an Energie benötigt, die durch räumliche Organisation mit Hilfe der Wellenausbreitung bestimmt würde (siehe Kapitel 5.3.2).

Die extrazellulären Oberflächenmoleküle

Auf Neutrophilen sind neben den Rezeptormolekülen, durch die die chemotaktisch aktiven Substanzen erkannt werden, eine Vielzahl von weiteren Oberflächenmolekülen lokalisiert. Allgemein werden Oberflächenrezeptoren

in Gruppen basierend auf ihrem Aktivierungsmechanismus eingeteilt. Diese Rezeptoren sind (a) Ionenkanal-assoziiert, (b) G Protein-assoziiert und (c) Enzym-assoziiert. Die Rezeptoren können aber wiederum bei Neutrophilen nach ihrer Funktion eingeteilt werden. So gibt es Rezeptoren für (a) Chemotaxis, die z.B. IL-8 binden, (b) Adhäsion, die z.B. Laminin binden und (c) Phagozytose, die z.B. IgG binden, wobei manche Rezeptoren auch für mehrere Funktionen verwendet werden.

Adhäsionsmoleküle

Für Neutrophile ist Adhäsion an die extrazelluläre Matrix eine fundamentale Eigenschaft für ihre Funktionsweise. In Abbildung 5.2 sind die drei Hauptgruppen von Rezeptoren dargestellt, die Adhäsion vermitteln.

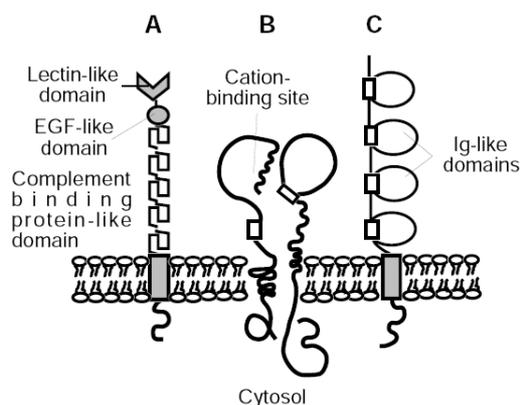


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der wichtigsten Adhäsionsmoleküle von Neutrophilen: (A) Selektine; (B) Integrine und (C) Immunoglobulin-Proteine. Die Abbildung ist aus [94] entnommen.

Dies sind Integrine, Selektine und Proteine der Immunoglobulin-Familie. Integrine sind transmembrane Glykoprotein-Komplexe, die Integrine genannt werden, da sie extrazelluläre Signale in Bewegungen des Zytoskeletts „integrieren“. Selektine sind eine Familie von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen, die in der Leukozyt-Endothel-Interaktion eine wichtige Rolle spielen. Diese Interaktion ist Teil des Mechanismus der Extravasation von Neutrophilen aus dem Blutkreislauf in das entzündete Gewebe (siehe Kapitel 5.1.2). Die dritte wichtige Gruppe, die Proteine der Immunoglobulin-Familie, sind die vielseitigsten Adhäsionsmoleküle. Sie können zum Beispiel im Fall einer Entzündung mit den Integrinen interagieren und somit diese Signaltransduktion unterstützen [16]. Die bekanntesten Beispiele dieser Gruppe sind das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 und das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül VCAM-1.

Rezeptor-Recycling

Nachdem das Neutrophil adhärert ist, bleiben die Membranrezeptoren statisch, während der Zellkörper sich über sie bewegt. Dazu wird der Rezeptor vom Substrat gelöst (siehe [148]), in die Zelle aufgenommen (Endozytose), durch Diffusion oder gerichteter Transport zur Zellfront transportiert und anschließend in die Zellfront eingebaut (Exocytose). Dies wird bei der Fortbewegung von Neutrophilen beobachtet (siehe Abbildung 5.3). Der Mechanismus ist aber noch Teil aktueller Forschung.

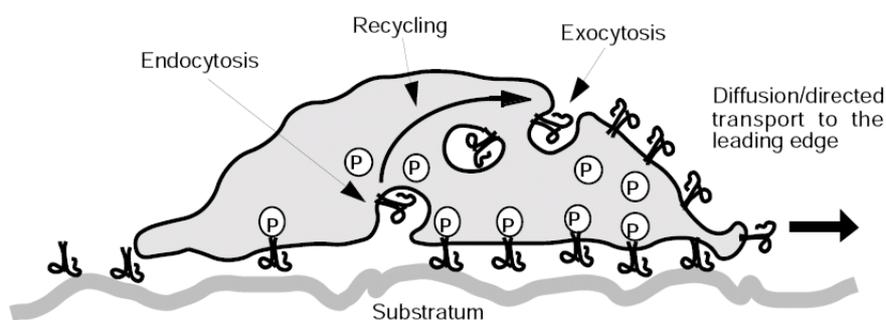


Abbildung 5.3: Darstellung des Rezeptor-Recyclings während der Neutrophil-Fortbewegung. Intrazelluläre Signale haben zur Folge, dass die Rezeptoren ihre Bindungen lösen, in die Zelle aufgenommen werden und an der Front wieder in die Membran eingebaut werden. Die Abbildung ist aus [94] entnommen.

5.1.2 Aktivierung von Neutrophilen

Die Hauptaufgabe von Neutrophilen ist bei einer Infektion den Blutkreislauf zu verlassen und schnell zum Infektionsherd zu migrieren, um die Pathogene zu bekämpfen [1]. Diese „Aktivierung“ der Neutrophile ist einer der wichtigsten Prozesse der Immunologie und Fokus einer Vielzahl von Forschungsprojekten.

Nachdem ein Pathogen das Epithel überwunden hat und in das darunterliegende Gewebe eingedrungen ist, wird es durch spezialisierte Zellen, den sogenannten *Makrophagen* erkannt. Die Makrophagen reagieren indem sie Proteine, sogenannten *Cytokine*, produzieren. Einige dieser Cytokine, z.B. *Tumor-Nekrose-Faktor* (TNF) und *Interleukin-1* (IL-1) stimulieren die Zellen der umliegenden Blutgefäße (*Endothelzellen*), um schnell Adhäsionsmoleküle, *E-Selektin* und *P-Selektin*, innerhalb der Blutgefäße zu präsentieren. Die zirkulierenden Neutrophile haben auf ihrer Oberfläche Selektinliganden,

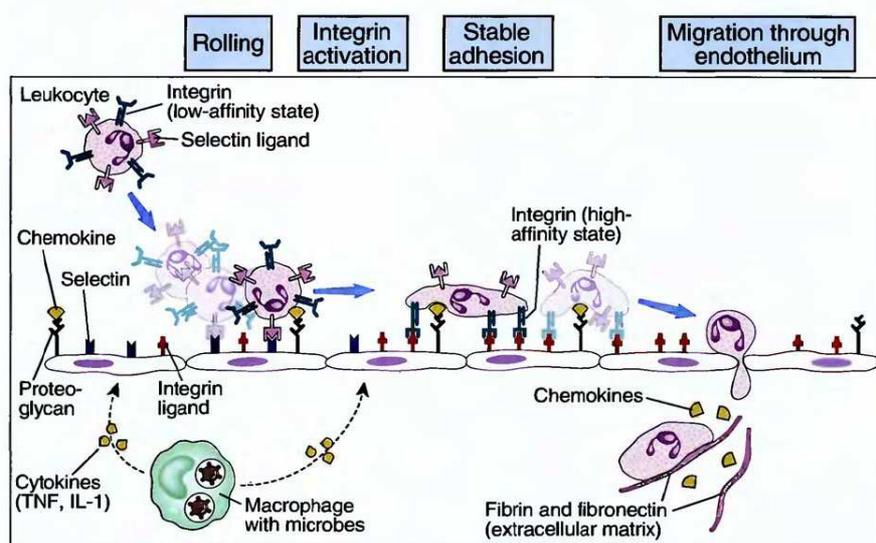


Abbildung 5.4: Darstellung der Zell-Zell-Interaktion bei der Extravasation von Neutrophilen. Die Abbildung ist aus [1] entnommen.

die schwach an die Endothelsektine binden. Die Neutrophile werden somit an die Endothelsektine gebunden, aber durch die Kraft des Blutstroms wird die Bindung wieder getrennt. Die Bindung wird kurze Zeit später wieder ausgebildet und so entsteht eine rollende Bewegung der Leukozyten auf der Endotheloberfläche, die sie abbremst (siehe Abbildung 5.4). Die hohe Konzentration der Cytokine, die an der Endotheloberfläche vorhanden ist, stimuliert einen schnellen Anstieg der Bindung der Neutrophil-Integrine zu den entsprechenden Liganden, die durch die Endothelzellen ebenfalls präsentiert werden. Nachdem die Geschwindigkeit der Neutrophile durch die rollende Bewegung ausreichend abgenommen hat, binden die Integrine fest an ihre Liganden und stoppen somit die rollende Bewegung. Anschließend wird das Zytoskelett reorganisiert und die Neutrophile beginnen durch die Blutgefäßwand zu migrieren. Anschließend wandern sie in Richtung des ansteigenden Konzentrationsgradienten der chemotaktisch aktiven Substanz. Nachdem sie die Infektionsstelle erreicht haben, wird sofort mit der Phagozytose und somit der Immunabwehr der Pathogene begonnen. Durch diesen Mechanismus wird erreicht, dass innerhalb von Minuten eine große Anzahl von Leukozyten an die Infektionsstelle rekrutiert werden. Durch die Änderung der Blutgefäßeigenschaften entstehen die charakteristischen Symptome einer Entzündung, die schon in der Antike durch Cornelius Celsus empirisch beschrieben wurden: Schmerz (lat. dolor), Wärmeentwicklung (lat. calor), Rötung (lat. rubor), Schwellung (lat. tumor) und eingeschränkte Funktion

(lat. functio laesa) [66].

5.2 Biochemischer Hintergrund

In diesem Kapitel werden kurz die biochemischen Hintergründe der Energiegewinnung eines Neutrophils und der dabei beteiligten Prozesse erläutert. Die Energiegewinnung ist ein sehr wichtiger Prozess für alle Lebewesen, aber da ein Neutrophil nach der Aktivierung schnell Energie unter sauerstoffarmen Gewebebedingungen benötigt, unterliegt ihr Energiehaushalt überwiegend der anaeroben Glykolyse, dem wohl am besten untersuchten biochemischen Reaktionsweg. Dies ist auch durch experimentelle Messungen [134, 141] bestätigt. Die Glykolyse ist eine Reaktionsfolge, die Glucose in Pyruvat zerlegt. Insgesamt sind bei dieser Reaktionsfolge elf Enzyme beteiligt, die die einzelnen biochemischen Reaktionen katalysieren (vgl. [167] und Kapitel 6.1).

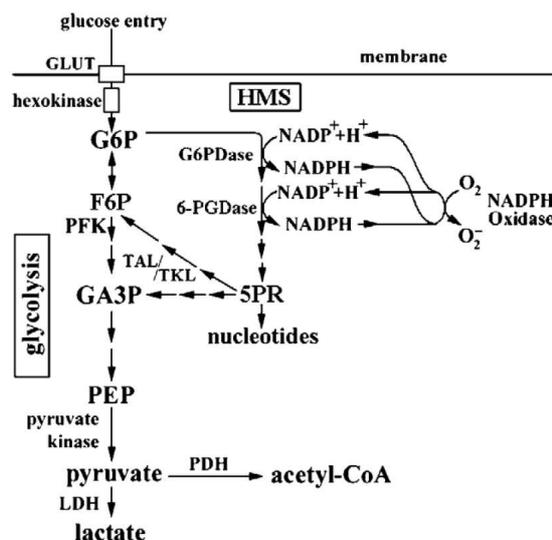


Abbildung 5.5: Schematische Darstellung der Glykolyse und des Pentosephosphatwegs (engl. Hexose-Monophosphate-Shunt (HMS)). Exemplarisch sind die Enzyme Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDase), 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6PGDase), Transaldolase (TALase), NADPH Oxidase und Lactat-Dehydrogenase (LDH) und die Substrate Glucose-6-Phosphat (G6P), Ribulose-5-Phosphat (5PR), Glyceraldehyd-3-Phosphat (GA3P), Phosphoenolpyruvat (PEP) und NADPH angegeben. Die Abbildung ist aus [58] entnommen.

Neben dem Prozess der Energiegewinnung ist für Neutrophile nach Aktivie-

rung ebenfalls wichtig, dass die für die Bekämpfung der Pathogene wichtigen ROS produzieren werden können. Diese werden durch Redoxreaktionen (z.B. durch die NADPH-Oxidase Reaktion) produziert, die als wichtiges Redoxäquivalent die Spezies NADPH benötigen. Ein Vorhandensein von NADPH wird nach Aktivierung dadurch erreicht, dass ein zweiter Glucose-basierter Stoffwechselweg, der Pentosephosphatweg, eine zunehmend wichtige Rolle spielt [134]. In ihm wird aus Glucose oxidativ unter Gewinn von NADPH Ribose-5-Phosphat gebildet, das in Metabolite der Glykolyse umgewandelt werden kann, oder als Grundbaustein für die Biosynthese von Nukleotiden dient (siehe Abbildung 5.5). In dieser Arbeit werden Oszillationen und Wellen von Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und dessen 2-Phosphat (NADPH) untersucht und modelliert. Da die Glykolyse und der Pentosephosphatweg die beiden wichtigsten Reaktionswege sind, durch die das Neutrophil beide experimentell gemessenen Spezies NAD(P)H produziert, wird in dieser Arbeit nur auf diese beiden Prozesse eingegangen. Darüberhinaus ergeben Studien zur Inhibierung beider Reaktionspfade, dass sie am Auftreten der dynamischen Phänomene beteiligt sind [78, 125]. Für eine detailliertere Diskussion der wichtigsten biochemischen Prozesse in Neutrophilen vor und nach Aktivierung sei auf [134] verwiesen.

5.3 Experimentelle Beobachtungen

In Neutrophilen wurde kürzlich eine Vielzahl von Strukturbildungsprozessen in Form von rein zeitlichen Oszillationen und von raumzeitlichen Wellenphänomenen experimentell beobachtet. Beide Prozesse zeigen interessantes dynamisches Verhalten, das Basis für die in dieser Arbeit durchgeführte mathematische Modellierung ist und in diesem Kapitel erläutert werden soll.

5.3.1 Oszillationen

In Neutrophilen wurden durch Howard Pettys Arbeitsgruppe am Kellogg Eye Center (University of Michigan, Ann Arbor, USA) NAD(P)H-Oszillationen entdeckt [135] (siehe Abbildung 5.6). In den Abbildungen sind Messungen der zellulären Autofluoreszenz im Bereich von 460 nm dargestellt. Diese Autofluoreszenz kann mit den intrazellulären Konzentrationen der beiden Spezies NADH und NADPH korreliert werden und als mögliche Charakterisierung der Dynamik des Zellmetabolismus verwendet werden [53].

Die Oszillationen zeigen unterschiedliche charakteristische Eigenschaften abhängig vom physiologischen Zustand des einzelnen Neutrophils. So zeigt ein sphärisches Neutrophil, das einem deaktivierten Zustand eines im Blutkreis-

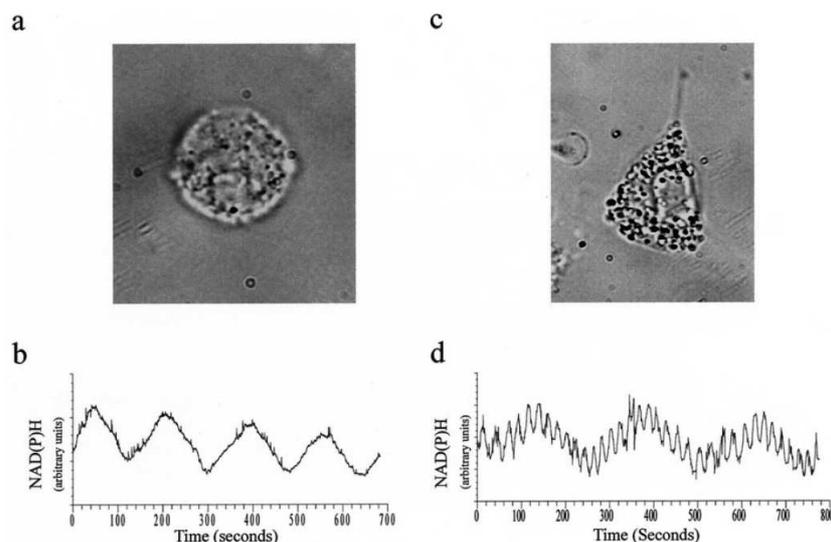


Abbildung 5.6: Experimentelle Messung der Autofluoreszenz von NAD(P)H-Oszillationen in Neutrophilen. In sphärischen Neutrophilen werden Oszillationen mit einer Periode von 3 Minuten beobachtet (links), bei der nach Polarisierung eine zweite, überlegende Oszillation mit einer Frequenz von 20 Sekunden beobachtet wird (rechts). Die Abbildung ist aus [135] entnommen.

lauf zirkulierenden Leukozyten entspricht, NAD(P)H-Oszillationen mit einer Periode von ungefähr drei Minuten.

Nachdem der Granulozyt an einer Oberfläche adhärert, werden neben den dreiminütigen Oszillationen noch zusätzliche, darüberliegende NAD(P)H-Oszillationen mit einer Periode von 20 Sekunden beobachtet [135].

Die letzteren Oszillationen zeigen nach Aktivierung durch Kontakt der Zelle mit proinflammatorischen Substanzen eine Erhöhung der Frequenz zu Oszillationen mit einer Frequenz von 10 Sekunden (siehe Abbildung 5.7 (a) und (d)) [78].

Neben den NAD(P)H-Oszillationen werden darüberhinaus auch weitere Oszillationen beobachtet. So zeigen auch die in der Immunabwehr wichtigen reaktiven Sauerstoffintermediate ROS und NO Oszillationen [78, 177] (siehe Abbildung 5.7 (b), (c), (e) und (f)) mit derselben Periode wie NAD(P)H und dem charakteristischen Anstieg der Oszillationsfrequenz von 20 auf 10 Sekunden. Da diese Substanzen durch Redoxreaktionen z.B. mit Hilfe der NADPH-Oxidase, die NAD(P)H als Substrat umsetzt, produziert werden, wird angenommen, dass die Oszillationen durch die NAD(P)H-Oszillationen getrieben sind [78]. Es wird aufgrund Studien mit metabolischen Inhibitoren, die ein Verschwinden der Oszillationen zur Folge haben, vermutet, dass

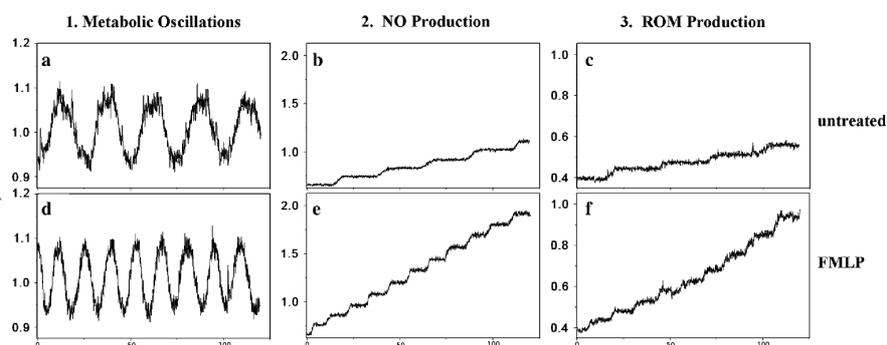


Abbildung 5.7: Experimentelle Messung von NAD(P)H -Autofluoreszenz (Spalte 1), NO -Produktion (Spalte 2) (mit Hilfe des fluoreszierende Farbstoffs DAF-2 DA) und ROS -Produktion (Spalte 3) (mit Hilfe des fluoreszierende Farbstoffs Hydroethidin) in Neutrophilen. Nach Aktivierung durch proinflammatorische Substanzen (wie FMLP) erhält man eine Erhöhung der Frequenz von 20 auf 10 Sekunden. Die Abbildung ist aus [78] entnommen.

die nichtlineare Regulation der Glykolyse einen wichtigen Beitrag zum Auftreten der Oszillationen leistet. Es wurde aber ebenfalls gefunden, dass eine Aktivierung des Pentosephosphatwegs fundamental wichtig für die Frequenzerhöhung von 20 auf 10 Sekunden ist, da nach Inhibierung dieses Reaktionswegs durch die Inhibitoren 6-Aminonicotinamid (6-AN) [70] und Dexamethason [116] keine Frequenzerhöhung beobachtet wird (siehe Abbildung 5.8).

Interessanterweise wurden neben den NAD(P)H -Oszillationen in Pettys Labor darüberhinaus auch Oszillationen für Calcium Signale gemessen, die über ähnliche Eigenschaften verfügen. Zusammen mit sinusförmigen NAD(P)H -Oszillationen wurden auch Calcium-„Spikes“ beobachtet (siehe Abbildung 5.9, links), die eine Phasenverschiebung von circa 90° zu den NAD(P)H -Oszillationen zeigen [120] und die Frequenz beider Oszillatoren erhöht sich zu einer Periode von 10 Sekunden nach Zugabe von proinflammatorischen Substanzen, wobei die Phasenverschiebung erhalten bleibt. Ca^{2+} -Oszillationen wurden auch von weiteren Gruppen beobachtet [31, 63, 64, 138], deren Perioden sich ebenfalls ungefähr in der Größenordnung von 10 – 100 Sekunden bewegen (siehe Abbildung 5.9, rechts).

Neben den beiden oszillierenden Spezies Ca^{2+} und NAD(P)H wurde darüberhinaus von weiteren oszillierenden Prozessen mit ähnlichen Perioden berichtet, für die ein globaler Zusammenhang dieser Oszillationen oder ein generelles Signaltransduktionsprinzip diskutiert wurden [120]. So berichteten als erste Jäger et al. von oszillierendem Verhalten des Membranpotentials [65],

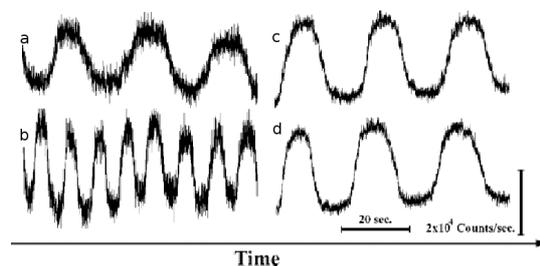


Abbildung 5.8: Experimentelle Messung von NAD(P)H-Autofluoreszenz in Neutrophilen. In adhärenenten Neutrophilen werden 20-Sekunden Oszillationen beobachtet (a,c), deren Frequenz sich nach Aktivierung durch proinflammatorische Substanzen von 20 auf 10 Sekunden erhöht (b). Diese Frequenzerhöhung wird nach Zugabe des Pentosephosphatweginhibitors 6-AN nicht beobachtet (d). Die Abbildung ist aus [70] entnommen.

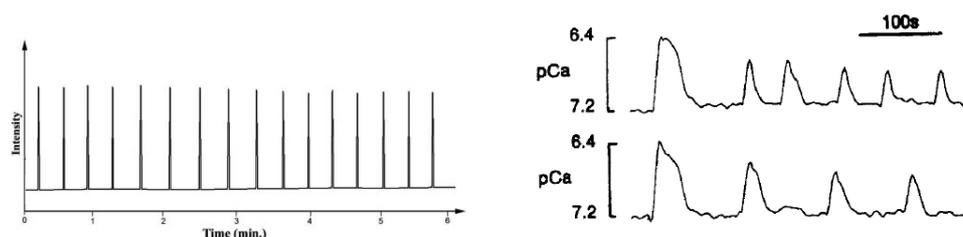


Abbildung 5.9: Experimentelle Messung der Fluoreszenz von Indo-1 markiertem Calcium in Neutrophilen. Die Abbildungen sind aus [74] und [63] entnommen.

das ebenfalls von Kindzelskii und Petty [74] beobachtet wurde. Dass diese periodischen Signale eine fundamentale Funktion bei der Funktionsweise der Neutrophile haben könnten, zeigt sich dadurch, dass sie auch in Prozessen auftreten, die direkt mit der Funktion zusammenhängen, wie z.B. der Aktinkonzentration beziehungsweise der zellulären Gestalt. Polymeres Aktin, das auch filamentöses Aktin (F-Aktin) genannt wird, ist Bestandteil des Zytoskeletts und sein dynamischer Auf- und Abbau ist ein fundamentaler Bestandteil der Beweglichkeit der Neutrophile. In Experimenten wurde gefunden, dass die intrazelluläre Aktinkonzentration nach Zugabe von proinflammatorischen Substanzen ebenfalls oszillierendes Verhalten mit circa 10 Sekunden Periodizität zeigt [117, 133, 176] (siehe Abbildung 5.10, links). Möglicherweise basierend auf einer oszillierenden Aktinkonzentration zeigt die Gestalt des Neutrophils (engl. *shape oscillations*) ebenfalls periodisches Verhalten nach Zugabe von proinflammatorischen Substanzen (siehe Abbildung 5.10, rechts) [34, 35, 36].

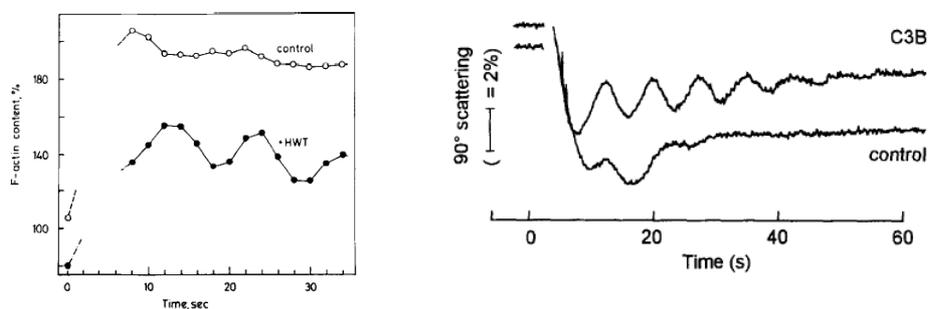


Abbildung 5.10: Experimentelle Messung der Lichtdurchlässigkeit von F-Aktin- (links) und Shape- (rechts) Oszillationen in Neutrophilen. Die Abbildungen sind aus [176] und [34] entnommen.

Physiologische Relevanz

Da die Frequenz und die Form der Oszillationen mit bestimmten physiologischen Zuständen von Neutrophilen korrelieren, wurde in Pettys Labor darüberhinaus untersucht, ob es Krankheiten gibt, die mit einer Fehlfunktion dieser Dynamiken in Neutrophilen assoziiert werden. Die Hautkrankheit Pyoderma Gangrenosum [2] ist mit einer Fehlfunktion von Neutrophilen assoziiert. Bei dieser schmerzhaften Erkrankung der Haut, bei der es großflächig, in der Regel an einer Stelle, zu einer Geschwürbildung und zu einem Absterben der Haut kommt, kommt es zu einer unspezifischen und nicht induzierten Neutrophilaktivierung (siehe Abbildung 5.11 (links)). In Neutrophilen, die aus dem Blut der erkrankten Personen entnommen wurden, wurde eine gestörte intrazelluläre NAD(P)H-Dynamik gefunden (siehe Abbildung 5.11 (rechts)) [2]. Hier werden bei Körpertemperatur keine sinusförmigen NAD(P)H-Oszillationen beobachtet, sondern Oszillationen, die sich durch chaotisches Verhalten auszeichnen. Interessanterweise wird die Sinusform zurückerhalten, wenn die zelluläre Temperatur gesenkt wird [2].

5.3.2 Wellen

Neben den rein zeitlichen Oszillationen wurde in Pettys Arbeitsgruppe darüberhinaus durch Anwendung von *Hochgeschwindigkeitsfluoreszenzmikroskopie* [122], die ein Fluoreszenzmikroskop und eine Hochgeschwindigkeitskamera kombiniert, NAD(P)H-Wellenausbreitung in adhärenenten Neutrophilen beobachtet (siehe Abbildung 5.12). Die NAD(P)H-Wellen werden ausschließlich am Uropodium ausgelöst und propagieren unidirektional in Richtung des Lamellipodiums mit einer Geschwindigkeit von ungefähr $15\text{--}50\ \mu\text{m/s}$ [125, 126]. Jede Welle wird nach Erreichen des Lamellipodiums ausgelöscht und eine

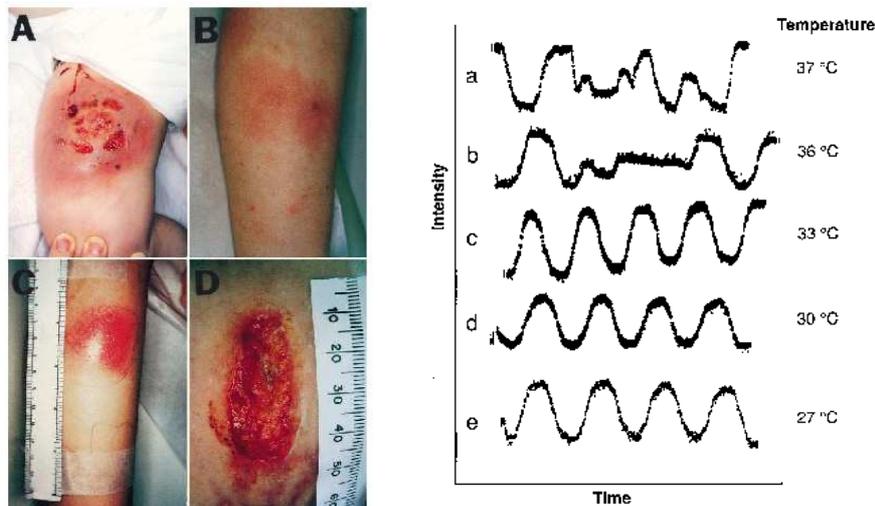


Abbildung 5.11: Links: Abbildung des Krankheitsbildes eines an Pyoderma Gangrenosum erkrankten Patienten. Rechts: Bei normaler Temperatur zeigen die Neutrophile des Patienten gestörte, chaotische Oszillationen, die sich bei sinkender Temperatur wieder zur harmonischen Sinusform normalisieren. Die Abbildungen sind aus [2] entnommen.

neue Welle wird am Uropodium ausgelöst (siehe Abbildung 5.12, Zeitreihe 1). Die Messungen der zellulären Autofluoreszenz erfolgten wie bei den NAD(P)H-Oszillationen im Emissionsbereich einer Wellenlänge von 460 nm. Diese NAD(P)H-Autofluoreszenz kann mit der Dynamik des Zellmetabolismus korreliert werden [53]. Es wird dadurch vermutet, dass die raumzeitlichen Phänomene ebenfalls aus der Glykolyse entstehen. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass die Wellen verschwinden, wenn ein metabolischer Inhibitor auf die Zelle gegeben wird [125].

Nach der Stimulation des Neutrophils mit proinflammatorischen Substanzen spaltet die Welle in der Mitte der Zelle auf, die beiden nun entstandenen Wellen propagieren in unterschiedliche Richtungen, werden am Uropodium beziehungsweise am Lamellipodium reflektiert und, wenn sie dann in der Mitte der Zelle kollidieren, kreuzen sie sich ohne sich zu beeinflussen (siehe Abbildung 5.12, Zeitreihe 2). Dies ist für Systeme mit Wellenausbreitung ein exotisches Verhalten, das sehr selten experimentell beobachtet wird. Meistens wird beobachtet, dass sich Wellen nach Kollision auslöschen (siehe Kapitel 2.1.2).

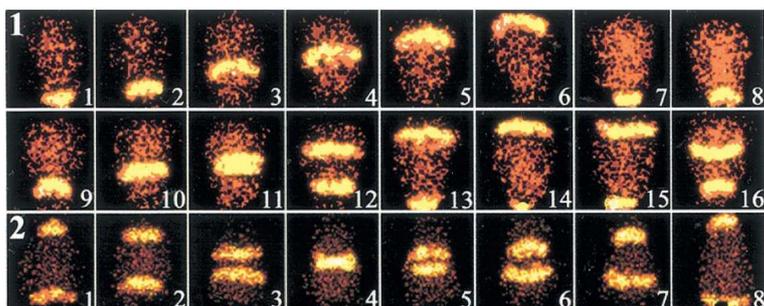


Abbildung 5.12: Experimentelle Messungen der Autofluoreszenz von $NAD(P)H$ -Wellenausbreitung in einem adhären, polarisierten Neutrophil, wobei die Zelle mit ihrer Front nach oben orientiert ist. Jedes Bild wurde $1 \mu s$ lang mit einem Intervall von 100 ms zwischen zwei Messungen aufgenommen. Die Abbildung ist aus [125] entnommen.

Physiologische Relevanz

Die beschriebene Wellenausbreitung in Neutrophilen scheint mit fundamentalen physiologischen Funktionen verknüpft zu sein. Es wurde diskutiert, dass die Wellenausbreitung des Neutrophils mit der Richtung der Polarisation zu korrelieren scheint [125]. Aktiviert man ein Neutrophil nur lokal, indem man mit Hilfe einer Mikropipette nur auf einem Teil der Neutrophilmembran die chemotaktisch aktive Substanz FMLP gibt, so ändert sich die Richtung der Wellenausbreitung in diese Richtung (siehe Abbildung 5.13). Darüberhinaus polarisiert das Neutrophil anschließend in diese Richtung.

Eine mögliche Funktion der Wellenausbreitung könnte somit die Signaltransduktion von räumlichen Orientierungsprozessen innerhalb der Zelle sein. Eine weitere mögliche Funktion wäre, dass Reaktionen, die $NAD(P)H$ als Substrat benötigen, durch gerichtete, lokalisierte Verfügbarkeit gesteuert werden.

Als ein Beispiel dieses Signaltransduktionsmechanismus publizierten Kindzelskii und Petty in [72] eine lokalisierte Produktion von ROS (siehe Abbildung 5.14). Da bei der Produktion der ROS unter anderem die $NAD(P)H$ -Oxidase beteiligt ist [12] und dieses Enzym $NADPH$ als Substrat verwendet, könnte dies ein Beispiel für den beschriebenen Mechanismus sein. Diese lokalisierte Produktion der reaktiven ROS könnte ein potentieller Schutzmechanismus des Neutrophils sein, um das umliegende gesunde Gewebe zu schonen, indem nur sehr zielgesetzt ROS produziert und in Migrationsrichtung der Zellen fokussiert wird.

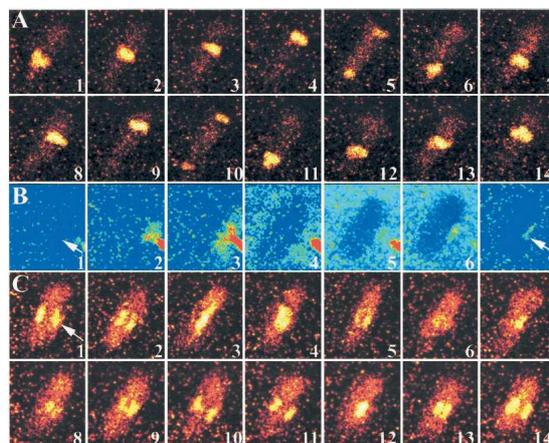


Abbildung 5.13: Experimentelle Messungen der Autofluoreszenz zur Änderung der NAD(P)H-Wellenausbreitung in einem Neutrophil. Nach der lokalen Anwendung von FMLP (B), ändert sich die Richtung der Wellenausbreitung in Richtung der Anwendung. Jedes Bild wurde $1 \mu\text{s}$ lang mit einem Intervall von 100 ms zwischen zwei Messungen aufgenommen. Die Abbildung ist aus [125] entnommen.

5.3.3 Andere theoretische Arbeiten

Die zuvor beschriebenen Strukturbildungsprozesse in Neutrophilen wurden bisher in zwei Publikationen mit Hilfe von mathematischer Modellierung behandelt [78, 116]. Beide Arbeiten beschäftigen sich ausschließlich mit den räumlich gemittelten, raumzeitlichen NAD(P)H-Dynamiken, d.h. Oszillationen, wobei die unterliegenden raumzeitlichen Dynamiken vernachlässigt werden. Die in dieser Arbeit präsentierten Modellierungsergebnisse stellen nach unserer Kenntnis die erste Untersuchung der metabolischen Dynamik in Neutrophilen dar, bei der sowohl zeitliche als auch raumzeitliche Phänomene untersucht werden.

In [116] untersuchen die Autoren ein bekanntes oszillierendes System, die Peroxidase-Oxidase-Reaktion (PO-Reaktion), von der bekannt ist, dass sie ein wichtiger Teil in proinflammatorisch aktivierten Neutrophilen darstellt, da sie Bestandteil des Synthesewegs der reaktiven Sauerstoffintermediate ist. Somit fokussieren sich die Autoren auf den aktivierten Zustand und vernachlässigen das ebenfalls gemessene Auftreten der Oszillationen im nicht-aktivierten Zustand. Mit Hilfe einer mathematischen Modellierung der PO-Reaktion werden sinusförmige NADPH-Oszillationen erhalten, die eine ungefähre Periode von 10 Sekunden haben und somit den experimentell berichteten Eigenschaften entsprechen (siehe Abbildung 5.15, links). Mit Hilfe des PO-Inhibitors Diphenyliodonium (DPI) konnte darüberhinaus gefunden

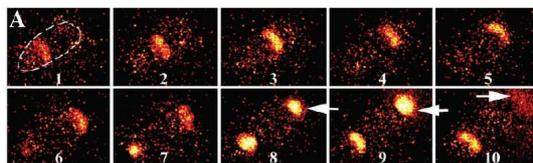


Abbildung 5.14: Experimentelle Messungen der $NAD(P)H$ -Autofluoreszenz und des oxidativen Fluoreszenzfarbstoff Hydroethidin zur gezielten ROS Produktion in einem Neutrophil. Nachdem die $NAD(P)H$ -Welle das Lamellipodium erreicht hat, werden nur an der Front die ROS synthetisiert (Pfeil). Jedes Bild wurde 100 ns lang mit einem Intervall von 25 ms zwischen den Messungen aufgenommen. Die Abbildung ist aus [72] entnommen.

werden, dass die 10-Sekunden Oszillationen bei niedriger DPI-Konzentration inhibiert werden und 20-Sekunden Oszillationen auftreten, die in einem nicht aktivierten Neutrophil beobachtet werden. Bei höher DPI-Konzentration werden diese auch inhibiert und keine metabolische Dynamik kann beobachtet werden (siehe Abbildung 5.15, rechts). Die Autoren ziehen daraufhin den Schluss, dass die PO-Reaktion potentiell Teil der metabolischen Dynamik eines aktivierten Neutrophils ist.

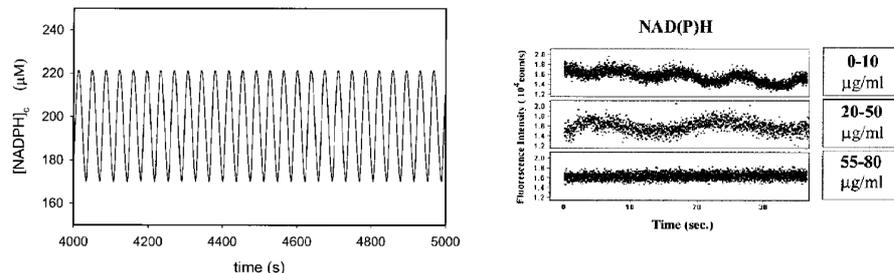


Abbildung 5.15: Links: Numerische Integration eines PO-Reaktionmodells, das durch deren nichtlinearen Dynamik oszillierendes Verhalten zeigt. Rechts: Mit steigender Konzentration des PO-Reaktionsinhibitors DPI werden $NAD(P)H$ -Oszillationen inhibiert. Die Abbildungen sind aus [116] entnommen.

Aber die Tatsache dass $NAD(P)H$ -Oszillationen ebenfalls beobachtet werden, wenn der Pentosephosphatweg, der ein für die PO-Reaktion notwendiges Substrat produziert, inhibiert ist, zeigt, dass die oszillierende Dynamik der PO-Reaktion zwar Teil der in aktivierten Neutrophilen beobachteten Oszillationen sein kann, aber der Schlüsselprozess, der diesen Oszillationen unterliegt, vernachlässigt wurde.

In [78] gehen die Autoren dieser Frage nach und schlagen vor, dass das oszillierende Verhalten der nichtlinearen Dynamik der Glykolyse entstammt. Diese

Annahme wird durch die experimentell bestätigte Tatsache belegt, dass in der Glykolyse die experimentell gemessenen Spezies produziert werden, Neutrophile ihren Energiehaushalt überwiegend mit Hilfe dieses Reaktionswegs bestreiten [141], die Glykolyse bekannt für nichtlineare Regulation ist und die gemessene Autofluoreszenz im betrachteten Emissionsbereich mit der Dynamik des Zellmetabolismus korreliert [53].

Somit ist die Annahme, dass dies ein Schlüsselprozess in der NAD(P)H-Dynamik ist, sehr naheliegend. Es wird in [78] mit Hilfe eines mathematischen Modells der Glykolyse gezeigt, dass aus deren nichtlinearen Regulation NAD(P)H-Oszillationen im Bereich einer Periode von 10-20 Sekunden entstehen können und diskutiert, dass es durch eine Aktivierung des Pentosephosphatwegs zu einem Anstieg der Oszillationsfrequenz kommt (siehe Abbildung 5.16). Diese Annahme vernachlässigt jedoch die Wellendynamik, die den zeitlichen Oszillationen unterliegt und somit die raumzeitliche Dynamik, die nach Mittelung über das räumlich Gebiet die rein zeitliche Dynamik produziert.

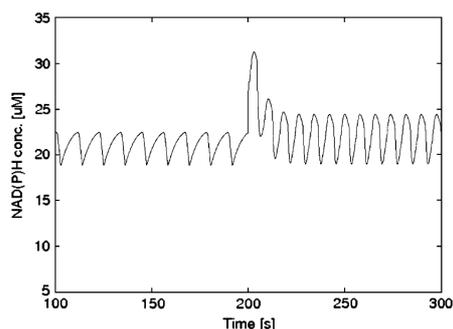


Abbildung 5.16: Numerische Integration eines Glykolysemodells, das oszillierendes Verhalten zeigt. Nach Aktivierung des Pentosephosphatwegs (bei $t=200$ s) wird eine Frequenzerhöhung beobachtet. Die Abbildung ist aus [78] entnommen.

In dieser Arbeit wird ein konsistentes mathematisches Modell entwickelt, mit dem weitestgehend sowohl das zeitliche als auch das raumzeitliche Verhalten erklärt werden kann und vor allem schlüssig deren weitere Charakteristiken mit einbezogen werden können (siehe Kapitel 7). Dies ist ein notwendiger Ansatz, um die Dynamiken in Neutrophilen zu untersuchen, da mittels der beiden anderen Ansätze nur Aspekte untersucht werden, die nicht zu einem ganzheitlichen Bild führen können.

Kapitel 6

Grundlagen der Modellbildung

In diesem Kapitel wird das in dieser Arbeit entwickelte mathematische Modell der NAD(P)H- und Ca^{2+} -Dynamiken in Neutrophilen und die notwendigen Hintergründe erläutert. Dazu wird kurz auf die Massenwirkungskinetik eingegangen, aber da biochemische Prozesse normalerweise durch Enzyme katalysiert werden, wird besonders auf enzymkinetische Modellierung eingegangen. Anschließend ist das entwickelte Modell dargestellt.

6.1 Glykolyse und Pentosephosphatweg

Da der Energiehaushalt von Neutrophilen überwiegend durch Glykolyse bestritten wird, das Redoxäquivalent NADPH, das für die Produktion der reaktiven Sauerstoffintermediate benötigt wird, über den Pentosephosphatweg produziert wird und Studien mit Inhibitoren zeigen, dass sowohl die NAD(P)H-Oszillationen als auch die Wellen andeuten aus diesen Reaktionspfaden zu entstehen (siehe Kapitel 5.2, [134] und [125]), werden nur diese beiden Prozesse in dieser Arbeit berücksichtigt.

Glykolyse

Die Glykolyse (aus dem Griechischen *glykos*, süß; *lysis*, auflösen) oder auch Embden-Meyerhof-Parnas-Weg [167] ist der erste Teil des Zucker-Abbaus (Katabolismus) in Zellen. In ihm wird Glucose zu Pyruvat umgesetzt, wobei zwei Mol Adenosintriphosphat (ATP) pro Mol Glucose synthetisiert werden. Diese Sequenz von zehn enzymatischen Reaktionen spielt eine zentrale Rolle im Energie-Metabolismus der Zellen, da sie einen Teil der chemischen Energie in Form von ATP produziert und Glucose und Kohlenhydrate für den oxidativen Zellstoffwechsel vorbereitet.

Allgemein ist die Funktion der Glykolyse Glucose in zwei C_3 Einheiten (Pyruvat) umzusetzen, die eine geringere freie Enthalpie inne haben, und die damit frei gewordene Energie zu verwenden, um ATP aus ADP und P_i zu synthetisieren. ATP ist die zelluläre „Energiewährung“ und wird durch ihr hohes Phosphatgruppenübertragungspotential dazu verwendet um endergone Prozesse, wie z.B. Aufbau von DNS, möglich zu machen (siehe [167] für einen Überblick über die energetischen Hintergründe). Der Prozess der Glykolyse benötigt einen Reaktionsweg von mehreren chemisch gekoppelten Phosphoryl-Übertragungsreaktionen und verfolgt insgesamt folgende chemische Strategie

1. Binde Phosphatgruppen an die Glucose.
2. Setze die phosphorylierten Zwischenprodukte in Verbindungen mit hohem Phosphatgruppenübertragungspotential um.
3. Kopple die anschließende Hydrolyse der reaktiven Substanzen an die ATP-Produktion.

Die zehn enzymkatalysierten Reaktionen sind in Abbildung 6.1 dargestellt. Bemerkenswert ist, dass zu Beginn ATP benutzt wird, um die phosphorylierten Zwischenprodukte zu synthetisieren und später wieder zurückgewonnen wird. Der erste Schritt der Glykolyse ist die Phosphorylierung von Glucose unter Verbrauch von ATP zu Glucose-6-phosphat (G6P). Diese Reaktion wird in Neutrophilen durch das Enzym Hexokinase katalysiert. Da die Zellmembran nicht für G6P durchlässig ist, reichert sich G6P in der Zelle an, verschiebt das Gleichgewicht an der Membran und begünstigt die Aufnahme von Glucose. Glucose-6-phosphat wird dann von der Hexosephosphat-Isomerase in Fructose-6-phosphat (F6P) umgesetzt. Anschließend wird Fructose-6-phosphat unter Katalyse eines Schlüsselenzyms der Glykolyse, Phosphofruktokinase, unter Verbrauch eines weiteren Moleküls ATP zu Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) phosphoryliert. Das Enzym Aldolase katalysiert nun die Spaltung des Glucoserings in Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP). Dihydroxyacetonphosphat wird von der Triosephosphatisomerase (TIM) ebenfalls in Glycerinaldehyd-3-phosphat umgewandelt. Jedes der beiden resultierenden Glycerinaldehyd-3-phosphat-Moleküle wird daraufhin durch das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und der Übertragung einer Phosphatgruppe zu 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3-BPG) durch NAD^+ oxidiert. Bei dieser Oxidationsreaktion entsteht nun auch NADH, das bei den experimentellen Messungen [125] zusammen mit NADPH gemessen wird (siehe Kapitel 5.3), auf den die Modellierungsansätze dieser Arbeit fußen.

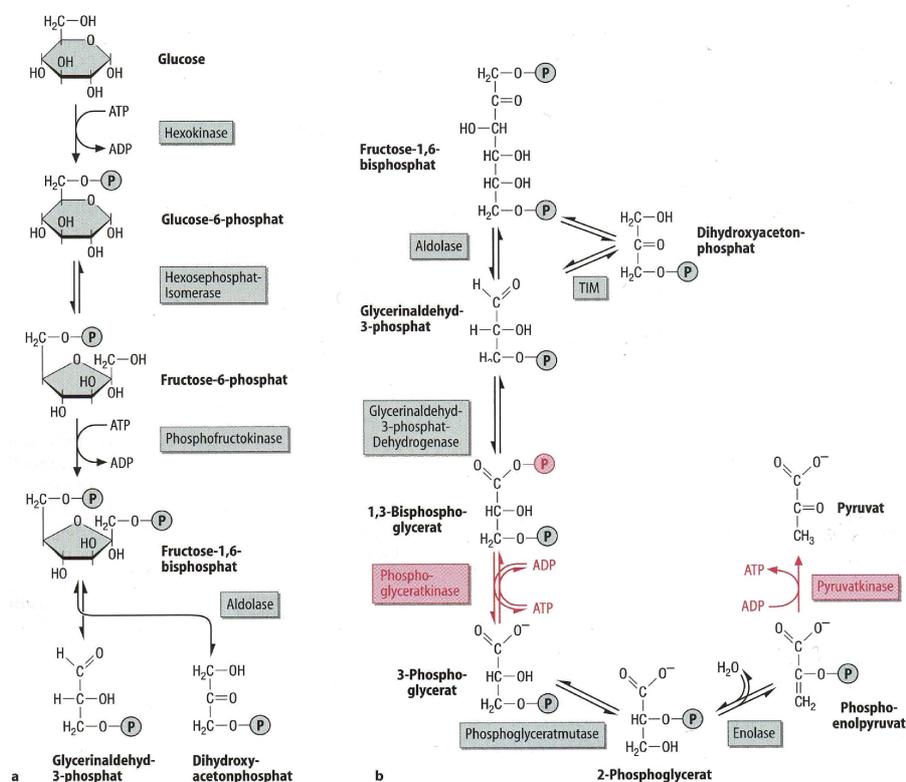
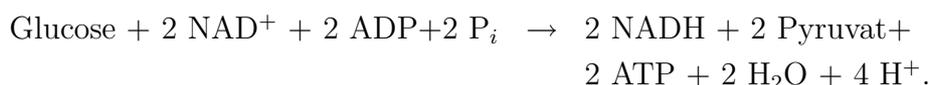


Abbildung 6.1: Darstellung der einzelnen Reaktionsschritte der Glykolyse separiert in einen oberen Teil (a) und unteren Teil (b). Die Abbildung ist aus [93] entnommen.

Im nächsten Schritt erzeugt die Phosphoglyceratkinase je ein Molekül ATP bei der Umwandlung von 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat (3-PGA) durch Übertragung eines Phosphatrests auf ADP. Phosphoglyceromutase katalysiert dann die Umwandlung von 3-Phosphoglycerat zu 2-Phosphoglycerat (2-PGA), woraus schließlich mit Hilfe der Enolase Phosphoenolpyruvat wird. Dieses wird abschließend in der Pyruvatkinasereaktion unter Erzeugung eines weiteren Moleküls ATP zu Pyruvat umgesetzt. Insgesamt ergibt sich somit die allgemeine Reaktion



Regulation der Glykolyse

Da die Hauptfunktion der Glykolyse die Produktion von ATP ist, muss sie fein reguliert sein, damit ATP in einem Ausmaß produziert wird, wie es

benötigt wird. Ein zentrales Enzym, das den Fluss durch die Glykolyse reguliert, ist die Phosphofruktokinase (PFK). Da die in der Glykolyse beobachteten Strukturbildungsprozesse im in dieser Arbeit entwickelten Modell wesentlich aus der Dynamik der PFK entstehen, soll hier kurz auf deren Regulation eingegangen werden und für eine tiefere Einführung sei auf [7] verwiesen.

PFK ist ein Tetramer [167] mit zwei möglichen Monomer-Konformationen R und T, die sich in ihrer Affinität zu unterschiedlichen Liganden unterscheiden und sich im Gleichgewicht befinden¹. In *in vitro* Experimenten wurde herausgefunden, dass die Umsatzgeschwindigkeit der PFK durch viele chemische Substanzen beeinflusst wird. Zellulär spielen dabei die beiden stärksten regulatorischen Substanzen, ATP und FBP, die entscheidende Rolle.

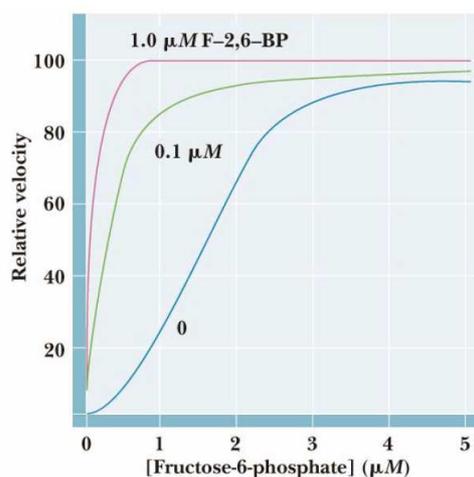


Abbildung 6.2: Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit der PFK von dem allosterischen Aktivator FBP. Die Abbildung ist aus [7] entnommen.

ATP bindet an seine Substrat-Bindungsstellen in beiden Konformationen gleich gut, wobei es an eine inhibierende Bindungsstelle überwiegend in der T Konformation bindet. Das andere Substrat der PFK, F6P, bindet überwiegend an die Bindungsstelle in der R Konformation. Daraus folgt, dass bei hoher ATP Konzentration ATP als sogenannter *allosterischer Inhibitor* [165] durch Bindung an die T Konformation agiert und das $T \rightleftharpoons R$ Gleichgewicht zugunsten der T Konformation verschiebt und die Affinität der PFK zu F6P minimiert. Neben dem allosterischen Inhibitor ATP sind auch allosterische Aktivoren bekannt. Einer der wichtigsten Aktivoren der PFK

¹Diese Bezeichnungen wurden in [104] zur modellhaften Beschreibung der Regulation eingeführt.

ist FBP, das an die R Konformation bindet und die Affinität des Enzyms an F6P erhöht. FBP agiert somit als Produktaktivator der PFK [11, 85]. Dieses Verhalten kann auch Aktivitätskurven der PFK dargestellt werden (siehe Abbildung 6.2), die charakteristisch für allosterisch aktivierte Enzyme ist. Bei steigender FBP Konzentration erreicht die PFK schneller ihre Maximalumsatzgeschwindigkeit von F6P.

Pentosephosphatweg

Neben der Glykolyse ist der Pentosephosphatweg (engl. Hexose-Monophosphate-Shunt (HMS)) der zweite wichtige Reaktionsweg im Kohlenstoffmetabolismus, der vor allem nach Aktivierung von Neutrophilen, d.h. bei der Bekämpfung von Pathogenen, bedient wird. Der Pentosephosphatweg ist eine Möglichkeit des Glucose-Katabolismus, über den aus Glucose-6-Phosphat, das über die Hexokinase-Reaktion der Glykolyse produziert wird, oxidativ unter Gewinn von NADPH Ribose-5-Phosphat gebildet wird, das in Metabolite der Glykolyse umgewandelt werden kann oder als Grundbaustein für die Biosynthese von Nukleotiden dient (siehe [167]). Der Pentosephosphatweg lässt sich in einen oxidativen und einen nicht-oxidativen Abschnitt aufteilen (siehe Abbildung 6.3). NADPH wird im oxidativen Teil durch Oxidation der Glucose zu der Pentose Ribulose-5-Phosphat unter Abspaltung von Kohlendioxid gewonnen. Im nicht-oxidativ ablaufenden Teil wird die entstandene Pentose in Metabolite der Glykolyse umgewandelt. Im Gegensatz zum NADH der Glykolyse entsteht beim Pentosephosphatweg als Reduktionsäquivalent NADPH, das dann zur Produktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten, die zur Bekämpfung von Pathogenen benötigt werden (siehe Kapitel 5.1), umgesetzt wird. Da der Pentosephosphatweg nicht explizit in die mathematische Modellierung eingehen wird, sondern nur der Aspekt der NADPH-Produktion berücksichtigt wird, sei für eine genauere Beschreibung vor allem der entsprechenden Reaktionsmechanismen auf die klassischen Biochemiebücher wie z.B. [7], [160] und [167] verwiesen.

6.2 Kinetische und enzymkinetische Modellierung

Die chemische *Kinetik* ([9] und [167]) befasst sich mit den Geschwindigkeiten chemischer Reaktionen mit der Zielsetzung einzelne Reaktionsschritte detailliert zu beschreiben. Mit Hilfe dieser kinetischen Beschreibung lässt sich auf den Reaktionsweg schließen, da sie eng an den Reaktionsmechanismus gekoppelt ist.

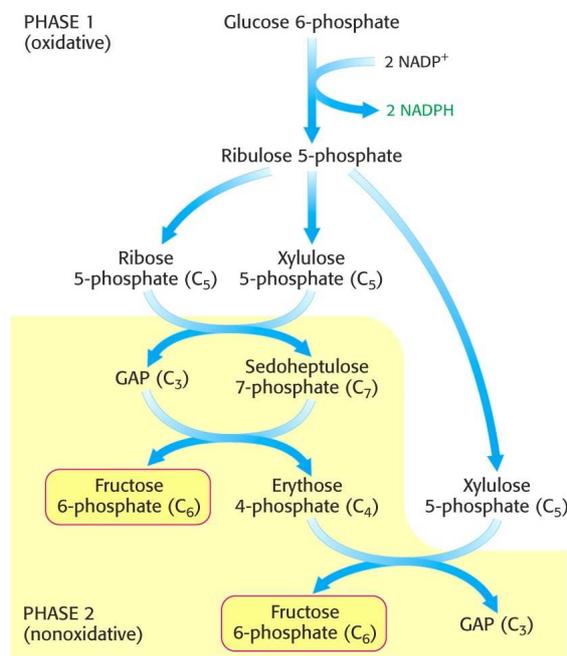
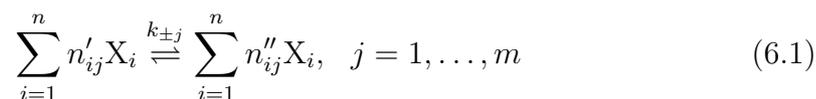


Abbildung 6.3: Schematische Darstellung der einzelnen Reaktionsschritte des Pentosephosphatwegs. Die Abbildung ist aus [93] entnommen.

6.2.1 Massenwirkungskinetik

Ein chemisches System mit n Spezies und m reversibel verlaufenden Reaktionen [27] lässt sich allgemein als



schreiben. Dabei entsprechen X_i den Spezies, k_{+j} und k_{-j} den Geschwindigkeitskonstanten der j -ten Hin- und Rückreaktion und n'_{ij} und n''_{ij} den stöchiometrischen Koeffizienten.

Die Änderungsrate lässt sich als Differentialquotient aus der Konzentrationsänderung und der Zeitänderung darstellen und führt somit zu einem Differentialgleichungssystem. Dies setzt sich aus der Summe der Reaktionsgeschwindigkeiten $v_j(x, p)$ aller Reaktionen zusammen, in denen die Spezies X_i als Edukt oder Produkt auftaucht, und man erhält somit für jede Spezies

$$\frac{dx_i}{dt} = \sum_{j=1}^m (n''_{ij} - n'_{ij}) v_j(x, p), \quad i = 1, \dots, n. \quad (6.2)$$

Dabei bezeichnet x_i die Konzentration der Spezies X_i , $x = (x_1, \dots, x_n)^T$ und $p = (k_{+1}, k_{-1}, \dots, k_{+m}, k_{-m})$. In vektorieller Schreibweise lässt sich (6.2) mit $v(x, p)$ als der Vektor aus den einzelnen Reaktionsgeschwindigkeiten und der stöchiometrischen Matrix N als

$$\frac{dx}{dt} = Nv(x, p) \quad (6.3)$$

formulieren. Die *Reaktionsgeschwindigkeit* $v_j(x, p)$ bei Elementarreaktionen ist proportional zur Wahrscheinlichkeit eines reaktiven Zusammenstoßes zwischen den Reaktanden. Dieser ist wiederum proportional zum Produkt der Konzentrationen der Reaktionspartner, die deshalb mit den stöchiometrischen Koeffizienten potenziert sind. Dies wird durch die Geschwindigkeitsgleichung

$$v_j(x, p) = k_{+j} \prod_{l=1}^n x_l^{n'_{lj}} - k_{-j} \prod_{l=1}^n x_l^{n''_{lj}}, \quad j = 1, \dots, m \quad (6.4)$$

ausgedrückt. Die Geschwindigkeitskonstanten k_{+j} und k_{-j} sind abhängig von der Reaktionstemperatur [9], doch da in dieser Arbeit Strukturbildungsprozesse in lebenden menschlichen Immunzellen untersucht werden und somit die Reaktionstemperatur bei 37° konstant ist, kann diese Abhängigkeit vernachlässigt werden.

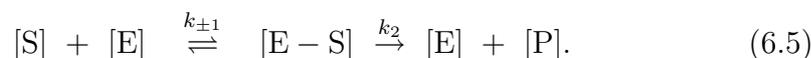
6.2.2 Enzymkinetik

In dieser Arbeit wird ein detailliertes mathematisches Modell der Glykolyse entwickelt und deren nichtlinearer Dynamik, die aus der feinen Regulation der beteiligten Enzyme entsteht, durch mathematische Gleichungen beschrieben. Mit einem Ansatz nach der Massenwirkungskinetik bei der Modellierung von Enzymkinetik können Approximationen erreicht werden, die die notwendige Dynamik beschreiben, aber zu einer minimalen Anzahl von Variablen führen. Dieses Vorgehen soll exemplarisch am Beispiel der sogenannten *Michaelis-Menten-Approximation* [101] erläutert werden.

Michaelis-Menten-Approximation

Bei der Michaelis-Menten-Approximation wird angenommen, dass eine Reaktion vorliegt, bei der enzymkatalysiert ein Substrat zu einem Produkt umgesetzt wird. Ebenfalls wird für die klassische Gleichung Irreversibilität angenommen [19].

Es wird folgende Reaktion betrachtet:



$[E - S]$ bezeichnet hierbei den intermediären Enzym-Substrat-Komplex. Für die zeitliche Konzentrationsänderung der einzelnen Reaktionspartner ergeben sich folgende Differentialgleichungen aus dem Massenwirkungsgesetz:

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{-1}[E - S] - k_{+1}[S][E] \quad (6.6)$$

$$\frac{d[E - S]}{dt} = k_{+1}[S][E] - k_{-1}[E - S] - k_2[E - S] \quad (6.7)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[E - S] =: v, \quad (6.8)$$

mit den Geschwindigkeitkonstanten k_{+1} und k_{-1} für die Hin- und Rückreaktion der ersten Teilreaktion und k_2 für die zweite Teilreaktion. Als *Umsatzgeschwindigkeit* v wird die Produktzunahme pro Zeit definiert. Man nimmt nun an, dass nach einer Anfangsphase der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes diese Konzentration nahezu unverändert bleibt und die Konzentration des Enzyms viel größer als die Substratkonzentration ist. Man kann dann $d[E - S]/dt=0$ (*steady-state*-Annahme) setzen und die Gleichung (6.7) vereinfacht sich zu

$$k_{+1}[E][S] = (k_{-1} + k_2)[E - S].$$

Diese *steady-state*-Annahme ist dadurch gerechtfertigt, dass in der Praxis häufig $k_2 \ll k_{+1}, k_{-1}$ gilt. Unter Ersatz von $[E]$ nach dem Prinzip der Massenerhaltung mit der Gesamtzymkonzentration $[E]_0 := [E] + [E - S]$ ergibt sich für $[E - S]$ der Ausdruck

$$[E - S] = \frac{k_{+1}[S][E]_0}{k_{+1}[S] + k_{-1} + k_2}.$$

Dieser wird in (6.8) eingesetzt, um eine Beziehung zwischen Umsatzgeschwindigkeit und Substratmenge zu erhalten

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[E - S] = \frac{k_2[E]_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_{+1}} + [S]}. \quad (6.9)$$

$(k_{-1} + k_2)/k_{+1}$ wird zu einer gemeinsamen *Michaelis-Menten-Konstante* K_M zusammengefasst. $k_2[E]_0 =: V_{\max}$ ist die Maximalgeschwindigkeit, da hier die gesamte eingesetzte Enzymmenge an der Reaktion (Sättigung) teilnimmt. Mit Hilfe dieser Approximation kann dann die Umsatzgeschwindigkeit der entsprechenden enzymkatalysierten Reaktion durch nur eine Gleichung beschrieben werden. Der Ableitung der Michaelis-Menten-Approximation (6.9) wurde eine irreversibel verlaufende Enzymreaktion mit nur einem Substrat

vorausgesetzt. Da dies aber bei vielen Enzymreaktionen nicht zutrifft, da häufig mehrere Substrate umgesetzt werden, kann eine ähnliche Gleichung auch für irreversible Enzymreaktionen mit zwei Substraten bestimmt werden. Bei einem Zufalls-Zwei-Substratmechanismus, bei dem keine Reihenfolge der Bindung von Substraten vorgegeben ist [19], wird dann unter denselben Annahmen wie bei Gleichung (6.9)

$$v = \frac{V_{\max}[S_1][S_2]}{K_{S_1}K_{S_2} + [S_1]K_{S_2} + [S_2]K_{S_1} + [S_1][S_2]} \quad (6.10)$$

hergeleitet (siehe [19]). Mit Hilfe dieser und weiterer Annahmen lassen sich viele der beobachteten enzymspezifischen Eigenschaften beschreiben und mathematisch behandeln. Für eine detailliertere Einführung und weitere Approximationen für z.B. Reaktionen, die durch Inhibierung reguliert sind, sei auf [19] verwiesen.

6.3 Darstellung des mathematischen Modells

In diesem Kapitel wird nun das in dieser Arbeit entwickelte mathematische Modell in Neutrophilen entwickelt. Dazu wird zu Beginn ein detailliertes Modell des oberen Teils der Glykolyse entwickelt und anschließend ein einfaches Modell der Calcium-Dynamik beschrieben. Abschließend wird die Kopplung dieser beiden Modelle erläutert. Das entwickelte Modell basiert auf [78] und [170], wobei diese Modelle dahingehend modifiziert werden, dass sowohl zeitliche als auch raum-zeitliche Phänomene erklärt werden können.

6.3.1 Modellierung der Glykolyse

Die in Kapitel 6.1 beschriebenen Reaktionen werden nun bis zur GAPDH-Reaktion, in der NADH entsteht, durch mathematische Gleichungen beschrieben. Hier wird besondere Aufmerksamkeit auf die PFK-Regulation gelegt, da durch deren nichtlineare Dynamik ein Teil der Phänomene erklärt werden kann.

Hexokinase (HK)

Die Hexokinase-Reaktion wird durch Annahme der Michaelis-Menten Approximation

$$v_{\text{hk}} = \frac{V_{\text{hk}}[\text{Glc}]}{K_{\text{hk}} + [\text{Glc}]} \quad (6.11)$$

modelliert.

Glucose-6-phosphat-Isomerase (GPI)

Für die Glucose-6-phosphatisomerase-Reaktion wird eine schnelle Gleichgewichtsreaktion angenommen, da dieses Enzym eine hohe Aktivität besitzt [167]. Nimmt man für diese Reaktion über Massenwirkungskinetik Reversibilität an, erhält man

$$v_{\text{gpi}} = k_{\text{gpi}}[\text{G6P}] - k_{\text{gpir}}[\text{F6P}] \quad (6.12)$$

mit den Geschwindigkeitskonstanten k_{gpi} für die Hinreaktion und k_{gpir} für die Rückreaktion. Setzt man nun $v_{\text{gpi}} = 0$, um die Gleichgewichtssituation zu modellieren, erhält man den Ausdruck $[\text{F6P}] = \frac{k_{\text{gpi}}}{k_{\text{gpir}}}[\text{G6P}]$ mit der Gleichgewichtskonstanten $K_{\text{eq}} = \frac{k_{\text{gpi}}}{k_{\text{gpir}}}$.

Phosphofruktokinase (PFK)

Für das dritte Enzym der Glykolyse, Phosphofruktokinase, ist bekannt, dass es einer allosterischen Regulation unterliegt (siehe Kapitel 6.1). Als Folge der allosterischen Produktaktivierung durch FBP wird der sogenannte *half-activation point*, das heißt der Punkt an dem das Enzym die Hälfte der maximalen Aktivierung erreicht hat, zu niedrigeren F6P-Konzentrationen verschoben. Mit steigender Aktivität kommt es aber auch zu einer negativen Regulation, da nicht genügend Substrat zur Verfügung steht, um die Aktivität auszunutzen. Das zweite Substrat dieser Reaktion, ATP, wird nicht modelliert, da es Hinweise darauf gibt, dass PFK unter physiologischen Bedingungen mit ATP gesättigt ist und es somit keinen geschwindigkeitsbestimmenden Einfluss auf die Reaktion hat [105]. Auf Grund der genannten Beobachtungen kann die PFK nicht durch eine einfache Michaelis-Menten-Approximation modelliert werden, sondern es muss diese Regulation berücksichtigt werden.

Darüberhinaus ist bekannt, dass PFK als Funktion von F6P eine S-förmige oder *sigmoide* Bindungs- beziehungsweise Umsatzkinetik zeigt (siehe Abbildung 6.2). Eine Gleichung, die diese Eigenschaft gut beschreibt, ist eine sogenannte *Hill-Gleichung* (vgl. [19]). Bei einer Hill-Gleichung wird angenommen, dass das Enzym mehrere Substrate binden kann und nach dem Massenwirkungsgesetz tritt ein Exponent h_{pfk} in der Michaelis-Menten Gleichung auf, der *Hill-Koeffizient* genannt wird. Um die allosterische Regulation einzubeziehen, ist die Hill-Gleichung nach [56] erweitert. Die Gleichung lautet ausgeschrieben

$$v_{\text{pfk}} = \frac{V_{\text{pfk}}[\text{F6P}]^{h_{\text{pfk}}}}{[\text{F6P}]^{h_{\text{pfk}}} + K_{\text{pfk}}^{h_{\text{pfk}}} \frac{1 + (k_{\text{x}}[\text{FBP}])^{h_{\text{x}}}}{1 + \alpha^{h_{\text{pfk}}} (k_{\text{x}}[\text{FBP}])^{h_{\text{x}}}}}}, \quad (6.13)$$

wobei V_{pfk} die Maximalgeschwindigkeit, h_{pfk} der Hill-Koeffizient und K_{pfk} die Michaelis-Menten-Konstanten der PFK-Reaktion ist. α ist ein Faktor, der die allosterische Regulation berücksichtigt und k_x ist proportional zur Dissoziationskonstanten von PFK und dem Produkt FBP. h_x bestimmt den sigmoiden Verlauf der allosterischen Regulation. Ist $\alpha > 1$, wie im Fall dieses Glykolyse-Modells, erhält man eine Produktaktivierung. Um den möglichen Verlust des sigmoiden Verlaufs bei hohen FBP Konzentrationen zu berücksichtigen und den experimentellen Verlauf besser zu beschreiben, wird kein konstanter Hill-Koeffizient h_{pfk} angenommen, sondern ein Wert h , der von der Konzentration des FBP abhängt

$$h = h_{\text{pfk}} - \underbrace{(h_{\text{pfk}} - h_{\text{act}})}_{\sigma} \left(\frac{[\text{FBP}]}{K_{\text{fba}} + [\text{FBP}]} \right), \quad (6.14)$$

wobei h_{act} den Hill-Koeffizienten bei der maximalen Aktivierung der PFK durch FBP ist. Der letzte Faktor impliziert eine hyperbolische Abhängigkeit von FBP, die aber nicht experimentell bestätigt ist.

Fructosebisphosphataldolase (FBA) und Phosphotrioseisomerase (TIM)

Die Fructosebisphosphataldolase wird wie die Hexokinase durch eine einfache Michaelis-Menten-Gleichung modelliert. Ausgeschrieben lautet sie

$$v_{\text{fba}} = \frac{V_{\text{fba}} [\text{FBP}]}{K_{\text{fba}} + [\text{FBP}]}, \quad (6.15)$$

wobei V_{fba} die Maximalgeschwindigkeit dieser Reaktion und K_{fba} die Michaelis-Menten-Konstante ist.

Die Phosphotrioseisomerase wird auf Grund ihrer hohen Aktivität nicht explizit modelliert, sondern in *steady-state* angenommen und nur indirekt in das Differentialgleichungssystem mit aufgenommen (siehe dazu Kapitel 6.1).

Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

Für die Modellierung der GAPDH-Reaktion wird eine irreversible Reaktion angenommen und diese Gleichung wird durch eine irreversible Michaelis-Menten-Gleichung für zwei Substrate modelliert (siehe Kapitel 6.2.2). Hierfür wird darüberhinaus eine konstante Phosphatkonzentration angenommen, was eine starke Vereinfachung ist, aber da die GAPDH-Reaktion nur einen sehr begrenzten Einfluss auf die Systemdynamik hat [78], ist es eine angebrachte

Approximation. Die Gleichung für die GAPDH-Reaktion lautet damit

$$v_{\text{gapdh}} = \frac{V_{\text{gapdh}}[\text{GAP}][\text{NAD}^+]}{K_{\text{igap}}K_{\text{nad}} + K_{\text{gap}}[\text{NAD}^+] + K_{\text{nad}}[\text{GAP}] + [\text{GAP}][\text{NAD}^+]}, \quad (6.16)$$

mit der Maximalgeschwindigkeit dieser Reaktion V_{gapdh} , den Michaelis-Menten-Konstanten K_{gap} und K_{nad} und einer Inhibierungskonstante K_{igap} [19]. NAD^+ , das ebenfalls in dieser Reaktion umgesetzt wird, wird nicht explizit modelliert, sondern es wird eine konstante Gesamtkonzentration c_{sum} von NADH und NAD^+ angenommen und NAD^+ wird durch Annahme von Massenerhaltung von $[\text{NADH}] + [\text{NAD}^+]$ modelliert. Für beide Spezies, NADH und NAD^+ , werden zusätzlich einfache lineare Abbauterme $k_{\text{NADH}}[\text{NADH}]$ und $k_{\text{NADPH}}[\text{NADPH}]$ angenommen, um ihren zellulären Verbrauch zu modellieren.

Modellierung des Pentosephosphatwegs

Der Pentosephosphatweg wird nicht explizit in das Modell aufgenommen, da durch Studien mit Inhibitoren des HMS gezeigt wurde, dass dieser Reaktionsweg nicht für die nichtlineare Dynamik direkt verantwortlich ist, sondern nur bei der Aktivierung des Neutrophils „angeschaltet“ wird (siehe Kapitel 5.2). Deshalb wird der HMS durch einen einfachen linearen Abbauterm $k_{\text{hms}}[\text{G6P}]$ modelliert, durch den der Verbrauch von G6P durch den HMS beschrieben wird. Da innerhalb des HMS pro Mol G6P zwei Mol NADPH produziert werden (siehe Kapitel 6.1), wird diese Stöchiometrie durch den Produktionsterm $2 * k_{\text{hms}}[\text{G6P}]$ für NADPH berücksichtigt.

6.3.2 Modellierung der Calciumdynamik

Neben der Modellierung der NAD(P)H-Oszillationen und Wellen, für die im vorigen Kapitel ein detailliertes Modell hergeleitet wurde, wird in dieser Arbeit auch die Kopplung der metabolischen Dynamik an die Calcium Signaltransduktion untersucht. Um die periodische Calcium-Dynamik wiederzugeben, wird hier nun ein sehr einfaches kinetisches Modell und dessen Hintergrund erläutert. Es basiert auf dem sogenannten Li-Rinzel Modell [91], das einen Calciumausfluss aus dem intrazellulären *Endoplasmatischen Retikulum* und dem entsprechenden Zurückpumpen in dieses Organell aus dem Cytosol qualitativ beschreibt.

Intrazelluläre Calciumdynamik

Die Signaltransduktion durch cytoplasmisches Ca^{2+} ist eines der wichtigsten bekannten Signal-Systeme in der Biologie, da es in vielen Prozessen funda-

mental wichtig für Leben oder Sterben von Zellen ist. Es ist ein Hauptregulator von vielen zellulären Prozessen, wie z.B. Gen Transkription und dem programmierten Zelltod (Apoptose).

Da Zellen ihre intrazelluläre Calcium-Konzentration niedrig halten müssen, ungefähr $0.1 \mu\text{mol}$, weil Calcium an viele Proteine bindet und deren Funktionalität beeinflusst, muss sein Anstieg kurz und organisiert geschehen, damit keine ungewünschte Aktivierungskaskade von Enzymen ausgelöst wird. Dies wird überwiegend dadurch erreicht, dass es in intrazelluläre Speicher, z.B. das sogenannte Endoplasmatische Retikulum (ER), durch die sogenannten Ca^{2+} -ATPase (SERCA) Pumpen gepumpt wird. Ca^{2+} -ATPase Pumpen existieren auch an der Membran, die dann Ca^{2+} aus der Zelle entfernen. Neben diesen Pumpen, die durch Energieaufwand Ca^{2+} in das ER oder aus der Zelle heraus pumpen, gibt es darüberhinaus auch Kanäle, die Ca^{2+} aus dem ER herausfließen lassen können.

Die beiden hier in der Arbeit untersuchten Kanäle, die Ca^{2+} aus den ER herauspumpen können, sind die Ryanodin-Rezeptoren (RyR) und die IP_3 -Rezeptoren (siehe Abbildung 6.4 für eine Zusammenfassung).

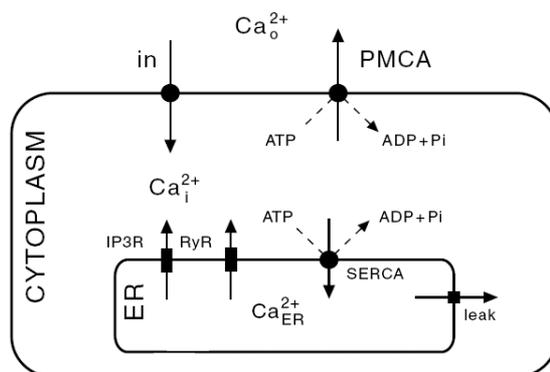


Abbildung 6.4: Schematische Darstellung der Ca^{2+} Transportprozesse. Die Abbildung ist aus [38] entnommen.

Für die mathematische Modellierung wird in dieser Arbeit nur die intrazelluläre Ca^{2+} -Dynamik berücksichtigt und nur der Ausfluss aus dem ER und das Zurückpumpen ins ER beschrieben.

Modellgleichungen

Ein Modell, das die Dynamik qualitativ sehr gut beschreibt, geht auf Li und Rinzel [91] zurück, die eine Vereinfachung des de Young-Keizer Mo-

dells [178] entwickelten. Es basiert auf einer Zeitskalenseparation der Kanalöffnungskinetiken, die aus den unterschiedlichen Bindungskonstanten von Ca^{2+} und IP_3 an die Rezeptoren resultiert. Durch diese Annahme kann ein einfaches mathematisches Modell hergeleitet werden, das qualitativ die in den Neutrophil-Experimenten beobachteten Dynamiken beschreibt [73, 74]. Das Modell benötigt nur zwei dynamische Variablen, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]$ und die Anzahl der Kanäle, die nicht durch Ca^{2+} inaktiviert sind und somit bereit zur Öffnung sind, h . In den Gleichungen wird eine konstante IP_3 Konzentration angenommen, da die Zeitskala der Bindungskinetik von IP_3 sehr schnell ist und sich damit schnell in einem Gleichgewichtszustand befindet. Die Gleichungen sind gegeben durch

$$\begin{aligned}\frac{d[\text{Ca}^{2+}]}{dt} &= \frac{f_i}{\bar{V}_i}(J_{\text{ER}}^{\text{out}} - J_{\text{ER}}^{\text{in}}) \\ \frac{dh}{dt} &= A(K_d - ([\text{Ca}^{2+}] + K_d)h),\end{aligned}\quad (6.17)$$

wobei A ein Parameter zur Kontrolle der relativen Zeitskalen zwischen den beiden Differentialgleichungen ist. f_i/\bar{V}_i kann als effektives Volumen des Cytosols interpretiert werden. Die Ausdrücke für $J_{\text{ER}}^{\text{out}}$ und $J_{\text{ER}}^{\text{in}}$ sind gegeben durch

$$J_{\text{ER}}^{\text{out}} = (L + j_{\text{IP}_3})([\text{Ca}_{\text{ER}}^{2+}] - [\text{Ca}^{2+}]) \quad (6.18)$$

$$J_{\text{ER}}^{\text{in}} = \frac{V_{\text{SERCA}}[\text{Ca}^{2+}]^2}{[\text{Ca}^{2+}]^2 + K_{\text{SERCA}}^2} \quad (6.19)$$

mit

$$j_{\text{IP}_3} = \frac{P_{\text{IP}_3\text{R}}[\text{IP}_3]^3[\text{Ca}^{2+}]^3h^3}{([\text{IP}_3] + K_i)^3([\text{Ca}^{2+}] + K_a)^3}, \quad (6.20)$$

wobei $P_{\text{IP}_3\text{R}}$ die maximale Durchlässigkeit der IP_3 Kanäle, L die ER Durchlässigkeit und V_{SERCA} die maximale SERCA-Pump-Rate beschreibt. Die Konstante K_{SERCA} bezeichnet den Punkt der halben maximalen Aktivität der SERCA Pumpen und K_i , K_a und K_d sind die Dissoziationskonstanten von IP_3 , Ca^{2+} und der Ca^{2+} -Inaktivierung der IP_3 -Rezeptoren. Durch den Term j_{IP_3} kann die Öffnungskinetik der IP_3 -Rezeptoren gut beschrieben werden. Die Ca^{2+} -Konzentration im ER $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ erhält man über die Annahme von Massenerhaltung und einer konstanten Gesamtkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{T}}$ aus $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}} = ([\text{Ca}^{2+}]_{\text{T}} - [\text{Ca}^{2+}]_i)/\sigma$. σ bezeichnet dabei das Verhältnis beider effektiver Volumina (für eine genaue Herleitung dieser Gleichung sei auf [91] verwiesen).

Neben der Dynamik der IP_3 abhängigen Ca^{2+} -Dynamik wird in dieser Arbeit darüberhinaus auch der Ca^{2+} -Ausfluss aus dem ER durch die RyR berücksichtigt, da diese über das Molekül cADP-Ribose (cADPR), das von dem Enzym ADP-ribosyl Cyclase aus NAD^+ produziert wird (siehe [87] und Kapitel 7.6) und somit eine Kopplung an den Metabolismus darstellt, aktiviert werden. Deshalb wird das Modell (6.17) um diese Aktivierung der RyR erweitert. Die ausgeschriebenen Gleichungen lauten

$$J_{\text{ER}}^{\text{out}} = (L + j_{\text{IP}_3} + j_{\text{RyR}}) ([\text{Ca}_{\text{ER}}^{2+}] - [\text{Ca}^{2+}]) \quad (6.21)$$

$$J_{\text{ER}}^{\text{in}} = \frac{V_{\text{SERCA}} [\text{Ca}^{2+}]^2}{[\text{Ca}^{2+}]^2 + K_{\text{SERCA}}^2}, \quad (6.22)$$

wobei

$$j_{\text{RyR}} = \frac{V_{\text{RyR}} [\text{cADPR}]^3}{[\text{cADPR}]^3 + K_{\text{RyR}}^3} \quad (6.23)$$

den durch cADP-Ribose stimulierten Ca^{2+} -Ausfluss aus dem ER beschreibt. Durch diesen Term wird eine Kinetik nach dem Hill-Typ angenommen, der die experimentell beobachtete Effekt der Stimulation der Ryanodin-Rezeptoren durch cADPR [86, 87] qualitativ ausreichend gut beschreibt. V_{RyR} bezeichnet die maximale RyR-Pump-Rate und K_{SERCA} bezeichnet den Punkt der halben maximalen Aktivität der RyR Pumpe. j_{IP_3} ist der Ausdruck aus (6.20).

6.3.3 Kopplung des metabolischen und des Calcium Modells

In Neutrophilen wird eine Kopplung der Dynamik von Ca^{2+} und NAD(P)H , wie zum Beispiel durch Phasenkopplung der auftretenden NAD(P)H - beziehungsweise Ca^{2+} -Oszillationen, beobachtet (siehe Kapitel 5.3). Da in dieser Arbeit diese Kopplung untersucht wird, ist eine Integration beider Modelle nötig. Um dies zu erreichen, wird die Hypothese aufgestellt, dass es einen Ca^{2+} -abhängigen Glucose-Einfluss in die Zelle gibt und über die Produktion von cADP-Ribose aus NAD^+ durch das Enzym ADP-ribosyl Cyclase einen Ca^{2+} -Ausfluss aus dem ER stimuliert wird. In Kapitel 7.6 wird diese Kopplung diskutiert und durch experimentelle Evidenzen belegt. Deshalb sei für die genaue Beschreibung des experimentellen Hintergrunds auf dieses Kapitel verwiesen.

Die Produktion von cADP-Ribose wird durch einfache Massenwirkungskinetik modelliert, da nur der qualitative Effekt modelliert werden soll. Daraus ergibt sich ein linearer Produktionsterm $k_{\text{cADP}}[\text{NAD}^+]$ und ein Term

$k_{\text{cADP}_{\text{ab}}}[\text{cADPR}]$, der den zellüären Konsum beschreiben soll. Wie in Kapitel 6.3.2 beschrieben wird durch cADP-Ribose ein Ca^{2+} -Ausfluss durch Aktivierung von RyR stimuliert, der durch Gleichung (6.23) modelliert wird.

Der Calcium abhängige Einfluss von Glucose in die Zelle wird dadurch modelliert, dass für die numerischen Ergebnisse in Kapitel 7.6, die diesen Aspekt untersuchen, eine Ca^{2+} abhängige intrazelluläre Glucosekonzentration durch

$$[\text{Glc}] = \text{in} + \frac{V_{\text{in}}[\text{Ca}^{2+}]}{K_{\text{in}} + [\text{Ca}^{2+}]} \quad (6.24)$$

beschrieben wird. Durch den Term „in“ wird ein konstanter Einfluss von Glucose aus dem extrazellulären Medium modelliert und durch den Term $\frac{V_{\text{in}}[\text{Ca}^{2+}]}{K_{\text{in}} + [\text{Ca}^{2+}]}$ wird zusätzlich ein Ca^{2+} -abhängiger Einfluss hinzugenommen. Für eine Diskussion des experimentellen Hintergrunds und der Motivation sei ebenfalls auf Kapitel 7.1 und 7.6 verwiesen.

6.3.4 Diskussion der verwendeten Parameter

Unter der Tatsache, dass das entwickelte Modell eher qualitativen Charakter hat, da die meisten Parameter in Neutrophilen quantitativ unbestimmt sind und nur auf ähnliche Parameter in anderen Zellen, wie z.B. Erythrozyten (rote Blutkörperchen), zurückgegriffen werden kann, wurde das Modell durch Variation der individuellen Parameter auf Robustheit der Modellierungsergebnisse in [78] untersucht und herausgefunden, dass viele Parameter nur einen sehr begrenzten Effekt auf die qualitative Systemdynamik haben. Da in dieser Arbeit überwiegend Parameter innerhalb dieser Stabilitätsschranken benutzt werden, wird eine ähnliche Robustheit der numerischen Ergebnisse erzielt.

Weil bei der raumzeitlichen Modellierung unter Verwendung von parabolischen partiellen Differentialgleichungen

$$\partial_t u = f(u) + D\Delta u \quad (6.25)$$

ebenfalls Diffusionskoeffizienten D bestimmt werden müssen und diese für Neutrophile nicht quantitativ bekannt sind, wird die Stokes-Einstein-Gleichung [9] für Newtonsche Flüssigkeiten verwendet

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r}, \quad (6.26)$$

um eine grobe Approximation der Diffusionskonstanten zu erhalten. k_b bezeichnet hierbei die Boltzmannkonstante, T die absolute Temperatur, η die Viskosität und r der Partikelradius. Wählt man eine absolute Temperatur

von 310 K, d.h. 37 °C, eine Viskosität von $\eta = 11\text{mPas}$ [95] und einen approximativen Partikelradius von $r = 400\text{pm}$ der Metaboliten, erhält man eine Approximation des Diffusionskoeffizienten $D \approx 50 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$. Der Partikelradius r kann grob durch die Annahme eines Ringschlusses der betrachteten Zucker und der damit verbundenen sechseckigen Struktur geschätzt werden. Da die entsprechenden sp^3 hybridisierten C-C und C-H Bindungslängen bekannt sind (Bindungslänge C-C: 154 pm, Bindungslänge C-H: 110 pm), lässt sich durch einfache geometrische Überlegungen der Radius des Kreises bestimmen, auf dem alle Ecken des Sechsecks liegen.

Diese Näherung des Diffusionskoeffizienten ergibt aber wahrscheinlich eine Überschätzung des realen Wertes, da der geschätzte Wert die reversible Bindung der Metaboliten zu anderen intrazellulären Kompartimenten, die Hydratisierung der durch die Phosphatgruppen geladenen Metaboliten und den Durchfluss durch eine Vielzahl intrazellulärer Strukturen vernachlässigt. Deshalb wird ein einheitlicher Diffusionskoeffizient $D = 2 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ für alle modellierten Metabolite angenommen, da sie alle eine recht ähnliche chemische Struktur und molekulare Größe besitzen.

Trotzdem ist die Annahme eines einheitlichen Diffusionskoeffizienten für alle Metabolite eine starke Vereinfachung, doch unter dem Aspekt eines qualitativen Modells und einer prinzipiellen Studie der beobachteten raumzeitlichen Dynamik in Neutrophilen ist es ein angebrachter erster Schritt und der einzig zulässige bei dem Fehlen von quantitativen *in vivo* Daten der Reaktionskonstanten und des diffusiven Transports. Darüberhinaus wurde durch numerische Experimente herausgefunden, dass die präsentierten Modellierungsergebnisse insensitiv auf Variationen des Diffusionskoeffizienten im Rahmen eines Faktors 5 sind. Da für die lokalen Konzentrationen der glykolytischen Enzyme angenommen wird, dass sie auf der Zeitskala der beobachteten Phänomene konstant sind, wird Diffusion der Enzyme vernachlässigt.

Kapitel 7

Numerische Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die numerischen Ergebnisse präsentiert, die mit dem im vorigen Kapitel vorgestellten Modell berechnet wurden [152]. Zu Beginn wird gezeigt, dass durch die nichtlineare Regulation der Glykolyse Wellenausbreitung simuliert werden kann, die qualitativ sehr ähnliche Charakteristiken, z.B. Geschwindigkeit und Wellenlänge, wie die experimentell beobachteten Wellen hat. Anschließend wird über geometrische Überlegungen erläutert, wie die Initiierung und die Unidirektionalität der Wellenausbreitung erklärt werden kann. Die nach der Aktivierung des Neutrophils beobachtete Wellenreflektion und Nicht-Auslöschung bei Kollision wird anhand numerischer Ergebnisse diskutiert, die räumlich heterogene Enzymkonzentration annehmen. Diese Annahme ist, wie in diesem Zusammenhang erläutert wird, auf der Basis experimenteller Daten plausibel. Abschließend wird ein Ansatz zur Optimalsteuerung präsentiert mit dessen Hilfe Regulationsmechanismen analysiert werden können. Die dadurch erhaltenen Erkenntnisse motivieren die Annahme eines Calcium abhängigen Glucoseeinfluss, durch den neben der Wellenausbreitung nach räumlicher Mittelung auch NAD(P)H-Oszillationen erhalten werden. Diese Ergebnisse werden dann in einem schlüssigen mathematischen Modell zusammengebracht, mit dem NAD(P)H-Wellen und Oszillationen und deren Periodenveränderung nach Aktivierung simultan erklärt werden können. Alle theoretischen Annahmen werden mit experimentellen Daten aus der Literatur belegt.

7.1 Modellierung der Wellenausbreitung

Zuerst soll nun nur die Wellenausbreitung in adhärennten Neutrophilen betrachtet werden. Ein Beispiel der experimentellen Beobachtungen, die aus Petty's Labor berichtet wurden, ist in Abbildung 7.1 gegeben. NAD(P)H-

Wellen werden immer am Uropodium ausgelöst, propagieren durch die ganze Zelle mit einer Geschwindigkeit von ungefähr $10 - 50 \mu\text{m/s}$ [123, 125, 126] und jede Welle wird ausgelöscht, nachdem sie die Front der Zelle erreicht hat. Anschließend wird eine weitere Welle am Uropodium mit denselben Eigenschaften ausgelöst.

Um die Wellenausbreitung in einem adhärenen Neutrophil zu beschreiben, formulieren wir das Problem

$$\frac{\partial u}{\partial t} = f_{\text{GLYCO}}(u) + D\Delta u \text{ in } \Omega, \quad (7.1)$$

wobei u der Vektor der Metabolite der Glykolyse, d.h. die Variablen des Modells, und f_{GLYCO} das entsprechende kinetische Modell aus Kapitel 6.3.1 bezeichnet. D ist eine Matrix, die die Diffusionskoeffizienten enthält, $\Omega \subset \mathbb{R}^2$ das geometrische Gebiet, d.h. hier das Neutrophil, und Δ der Laplace-Operator, um diffusiven Transport zu beschreiben. Es werden Null-Fluss von-Neumann-Randbedingungen für alle Spezies angenommen, d.h.

$$\frac{\partial u}{\partial n} = 0 \text{ in } \partial\Omega, \quad (7.2)$$

um die Undurchlässigkeit der Membran zu modellieren.

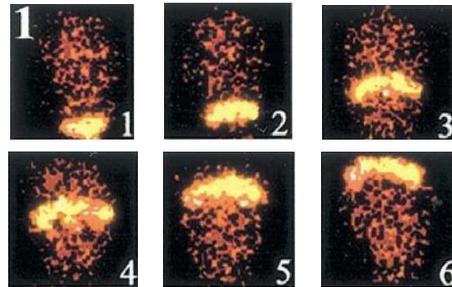


Abbildung 7.1: Raumzeitliche Messungen durch Hochgeschwindigkeitsfluoreszenzmikroskopie in adhärenen polarisierten Neutrophilen. Es ist eine Zeitreihe mit NAD(P)H Fluoreszenzbildern gezeigt. Die Front der Zelle ist nach oben, das Uropodium nach unten ausgerichtet. Zwischen jedem Bild liegt ein Zeitintervall von 100 ms. Die Abbildung ist aus [125] entnommen.

In Abbildung 7.2 ist eine Zeitreihe der Simulationsergebnisse der NAD(P)H-Wellenausbreitung basierend auf dem Glykolyse-Modell (siehe Kapitel 6.3.1) gezeigt. Der Einfachheit halber nehmen wir zuerst ein rechteckiges Gebiet an, das die Gestalt eines adhärenen Neutrophils beschreiben soll, wobei die Ausdehnung in die z -Richtung durch Projektion des Neutrophils auf die xy -Ebene vernachlässigt wird.

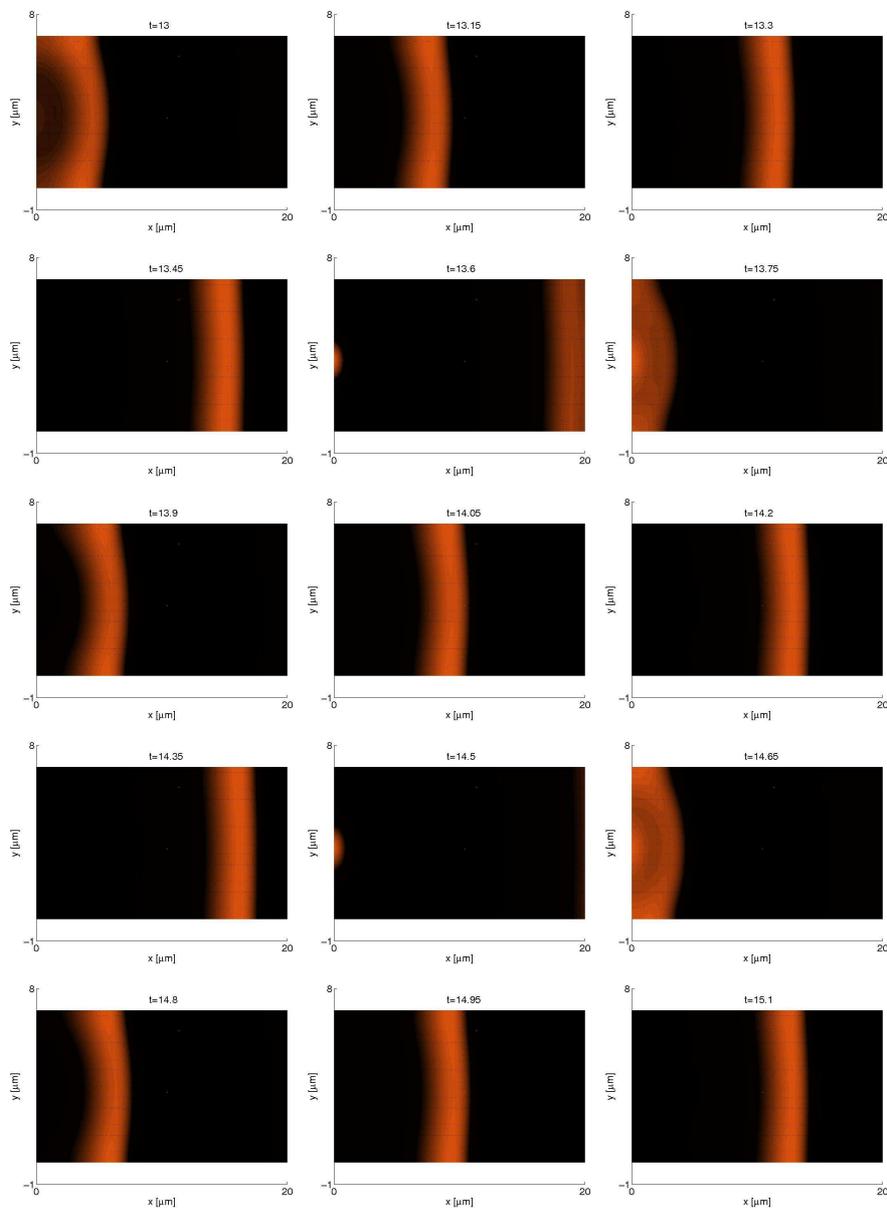


Abbildung 7.2: Zeitreihe (in Sekunden) zu den raumzeitlichen Simulationsergebnissen der NAD(P)H-Wellenausbreitung in Neutrophilen. Die Startwerte sind in Tabelle C.1 gegeben. Es wird $[GLC] = 70 \mu\text{mol}$ in der Mitte des linken Randes und $[GLC] = 5 \mu\text{mol}$ sonst angenommen. Die Daten wurden mit Hilfe der Routinen aus MATLAB[®] [98] visualisiert.

Um die experimentell beobachtete unidirektionale Wellenausbreitung zu beschreiben, ist dies eine angemessene zweidimensionale Approximation, da ein adhärentes Neutrophil eine flache, ausgedehnte Struktur mit einer ungefähren Länge von $20 \mu\text{m}$, Breite von $7 \mu\text{m}$ und Höhe von $2 \mu\text{m}$ annimmt. Zur numerischen Behandlung wird das System (7.1) mit Hilfe finiter Differenzen (siehe Kapitel 4.4.2) auf dem Gebiet $\Omega = [0, 20] \times [0, 7]$ mit einer Schrittweite $h = 0.25 \mu\text{m}$ diskretisiert und mit dem Integrator LIMEX (siehe Kapitel 4.2.2) in Zeitrichtung integriert.

Um die glykolytischen Wellen auszulösen, wird die Glucosekonzentration in der Mitte des linken Randes leicht erhöht. Die präsentierten Simulationsergebnisse zeigen ungefähr die gleichen Welleneigenschaften, d.h. Gestalt, Geschwindigkeit und Wellenlänge, wie die experimentell beobachteten Wellen (siehe Abbildung 7.1). Die Wellen haben eine longitudinale Gestalt, starten immer am Ende der Zelle und propagieren zur Front der Zelle mit einer ungefähren Geschwindigkeit von $27 \mu\text{m/s}$, die vollkommen im experimentell beobachteten Rahmen ist. Nachdem die Welle die Front der Zelle erreicht, wird Wellenauslöschung beobachtet und eine neue Welle startet am Ende der Zelle.

Daraus kann man schließen, dass die Glykolyse und die nichtlineare Regulation der darin involvierten Enzyme die NAD(P)H-Wellendynamik in Neutrophilen verursachen können, wobei die zeitlichen Oszillationen nicht dadurch erklärt werden können, da durch eine Mittelung über das ganze Gebiet keine Oszillationen mit einer Periode von 20 beziehungsweise 10 Sekunden gefunden werden können.

Die Wellenausbreitung in dieser Simulation wurde jedoch per Hand durch eine künstlich erhöhte Glucosekonzentration am Rand als Auslöser initiiert. Diese künstliche Randbedingung wird im nächsten Kapitel beseitigt und durch Argumente zur Geometrie eines adhärennten, polarisierten Neutrophil ersetzt.

7.2 Geometrische Überlegungen

Um eine realistischere planare Geometrie von Neutrophilen zu modellieren, beschreiben wir die zelluläre Gestalt eines adhärennten, polarisierten Neutrophils mit einer weiteren Front (Lamellipodium) und einem dünneren Ende (Uropodium) (siehe Abbildung 7.3, links).

Es wird wieder die Gleichung

$$\frac{\partial u}{\partial t} = f_{\text{GLYCO}}(u) + D\Delta u \text{ in } \Omega \quad (7.3)$$



Abbildung 7.3: Links: Schematische Betrachtung eines polarisierten, adhärenen Neutrophils (gesehen von oben). Der Pfeil markiert die Richtung der Polarisation in Migrationrichtung. Rechts: Visualisierung der intrazellulären Glucosekonzentration, die durch einen einheitlichen Glucose-Einfluss in die asymmetrische zelluläre Gestalt verursacht wird. Die asymmetrische Glucosekonzentration verursacht unidirektionale metabolische Wellenausbreitung, die dadurch immer am Ende der Zelle ausgelöst werden.

simuliert. Erläuterungen zum Problem sind bei Gleichung (7.1) angegeben. Im Gegensatz zum vorherigen Kapitel nehmen wir einen uniformen Einfluss der Glucose über die ganze Zellgeometrie an

$$\frac{\partial[\text{GLC}]}{\partial n} = \text{GLC}_{\text{in}} \text{ in } \partial\Omega. \quad (7.4)$$

Für alle übrigen Metabolite wird wieder eine Null-Fluss von-Neumann-Randbedingungen angenommen (siehe (7.2)).

Als ein Ergebnis der asymmetrischen Geometrie eines polarisierten Neutrophils wird ein erhöhter Glucose-Einfluss pro Volumen am Ende der Zelle im Vergleich zur Front erhalten, was eine asymmetrische intrazelluläre Glucosekonzentration zur Folge hat (siehe Abbildung 7.3, rechts). Somit findet dadurch analog zum vorherigen Kapitel ein autonomes Auslösen von unidirektionalen NAD(P)H-Wellen statt (siehe Abbildung 7.4).

Diese Interpretation kann durch weitere experimentelle Resultate belegt werden. In sphärischen Neutrophilen, die noch nicht auf eine Oberfläche adhäriert sind, wurde durch Petty und Kindzelskii [124] berichtet, dass sphärische Wellen im Punkt der Adhärenz initiiert werden. Diese Wellen entwickeln sich in unidirektionale, longitudinale Wellenausbreitung, nachdem die Zelle ihre flache, ausgedehnte und polarisierte Gestalt angenommen hat (siehe Abbildung 7.5). Somit scheinen die Eigenschaften der Wellenausbreitung abhängig von der zellulären Geometrie zu sein. Unser Modellierungsergebnis demonstriert, dass sich die Komplexität der Initiierung und der Unidirektionalität der NAD(P)H-Wellen durch einfache Überlegungen zur Zellgeometrie, der Hinzunahme des Glucose-Transports durch die Membran als einen zentralen regulatorischen Prozess und der nichtlinearen Dynamik der Glykolyse-Reaktionswegs erklären lässt.

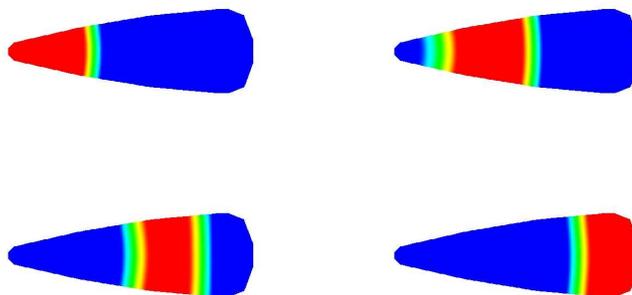


Abbildung 7.4: Numerische Simulation der unidirektionalen NAD(P)H-Wellenausbreitung ausgelöst durch eine inhomogene intrazelluläre Glucosekonzentration. Es ist eine Zeitreihe in Schritten von 0.2 Sekunden gezeigt. Für die Simulation wurde eine Anfangskonzentration $[GLC] = 30 \mu\text{mol}$ verwendet. Alle anderen Anfangskonzentrationen sind in Tabelle C.1 gegeben. Die Simulation wurde mit Hilfe der Finite-Element Bibliothek GASCOIGNE [44] durchgeführt. Visualisierung der Daten erfolgte mit dem Tool VISUSIMPLE [166].

Unabhängig von den Beobachtungen der Wellenphänomene in Neutrophilen durch Petty et al. kann eine solche Interaktion von räumlichen Effekten und nichtlinearer Enzymkinetik als ein wichtiger genereller Mechanismus gesehen werden. Durch ihn kann potentiell die Generierung einer Vielzahl von verschiedenen zellulären Antworten in ein und demselben metabolischen Pfad oder Signaltransduktionsweg verstanden werden.

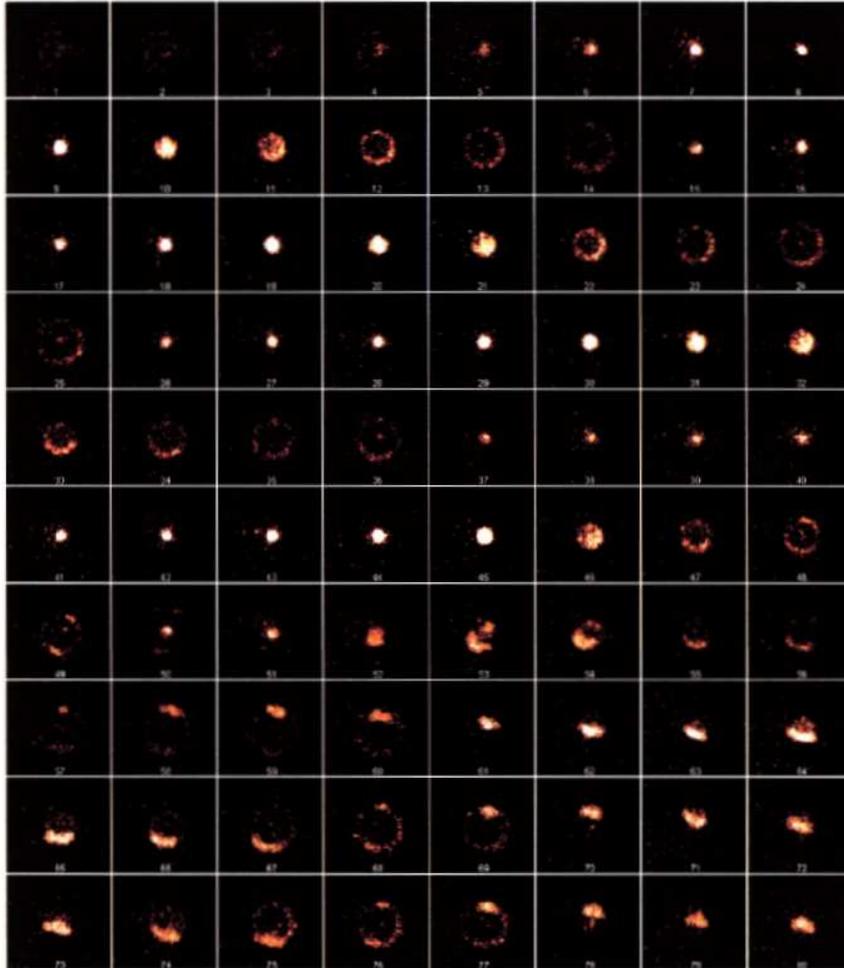


Abbildung 7.5: Raumzeitliche Messungen durch Hochgeschwindigkeitsfluoreszenzmikroskopie in sphärischen Neutrophilen im Moment der Adhärenz. Es ist eine Zeitreihe von NAD(P)H Fluoreszenzbildern gezeigt. Es werden sphärische NAD(P)H-Wellen am Punkt der Adhärenz ausgelöst, die sich in longitudinale, unidirektionale Wellen nach Erreichen des polarisierten Zustands entwickeln. Zwischen jedem Bild liegt ein Zeitintervall von 30 ms. Die Abbildung ist aus [124] entnommen.

7.3 Wellenreflektion aufgrund von Enzymtranslokation

Nach Aktivierung der Neutrophile mittels proinflammatorischen Stimuli werden zwei entgegengesetzt propagierende Wellen beobachtet [125], die andere Charakteristika zeigen als im nicht aktivierten Zustand. Die Wellen werden nach Erreichen des Randes nicht ausgelöscht, sondern reflektiert und kreuzen sie sich ohne sich gegenseitig zu beeinflussen, wenn sie kollidieren (siehe Abbildung 7.6).

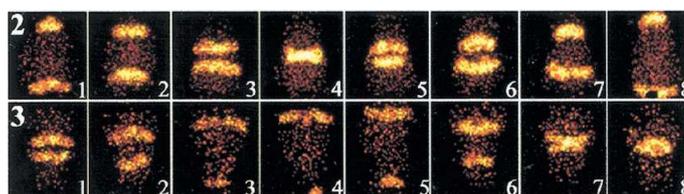


Abbildung 7.6: Raumzeitliche Messungen durch Hochgeschwindigkeitsfluoreszenzmikroskopie in aktivierten, polarisierten Neutrophilen. Es ist eine Zeitreihe von NAD(P)H Fluoreszenzbildern gezeigt. Zwischen jedem Bild liegt ein Zeitintervall von 100 ms. Die Abbildung ist aus [125] entnommen.

Um diese komplexe Wellendynamik im aktivierten Zustand zu verstehen, analysieren wir das quantitative Intensitätsprofil des Wellenkollisionsszenario, das aus experimentellen Daten verfügbar ist (siehe Abbildung 7.7).

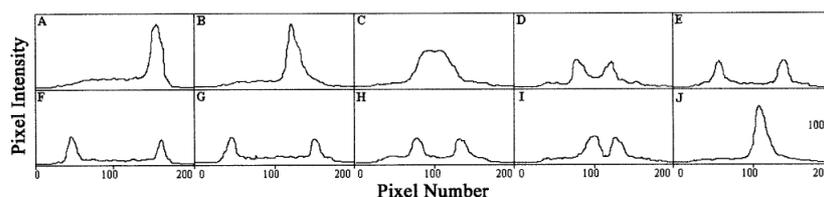


Abbildung 7.7: Quantitatives Intensitätsprofil des Wellenkollisionsszenario aus Abbildung 7.6 (in Sekunden). Die Abbildung ist aus [125] entnommen.

Nach Aufspaltung der einzelnen Welle in zwei entgegengesetzt propagierende Wellen wird eine Intensitätshalbierung der NAD(P)H-Fluoreszenz beobachtet und während der Kollision der entgegengesetzt propagierende Wellen in der Mitte der Zelle summieren sich die beiden Intensitäten auf (siehe Abbildung 7.7).

Theoretische und experimentelle Studien in anderen System, in denen chemische Wellenausbreitung beobachtet wird, demonstrieren die Möglichkeit des Auftretens von Wellenaufspaltung (siehe Kapitel 2.1.2 und [100, 106, 119]), aber Aufspaltung der Intensitäten, d.h. Amplituden der Wellen, ist höchst ungewöhnlich. Daher nehmen wir an, dass die publizierte NAD(P)H-Wellenaufspaltung, Reflektion am Rand und nicht Auslöschung bei Kollision in Neutrophilen ein dreidimensionaler Effekt ist, bei dem die Wellen in unterschiedlichen zellulären Ebenen in vertikaler Richtung aneinander vorbeiwandern.

In Abbildung 7.8 ist eine Approximation einer dreidimensionalen Geometrie eines adhärenen Neutrophils abgebildet.

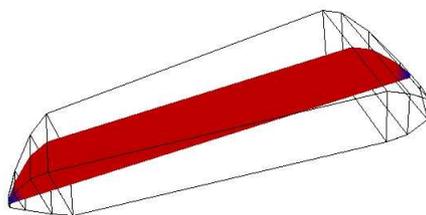


Abbildung 7.8: Approximation einer dreidimensionalen Geometrie eines Neutrophils unter Verwendung von Polygonzügen. Innerhalb des Neutrophils ist die Schnittebene visualisiert (siehe Text für Details), die als zweidimensionaler Simulationsbereich verwendet wird.

Um die numerische Berechnung zu beschleunigen und unter der Annahme einer links-rechts Symmetrie, wird hier eine Schnittebene (schematisiert in Abbildung 7.8) verwendet, durch die der Rechenbereich auf zwei räumliche Dimensionen reduziert wird. In durch proinflammatorische Substanzen aktivierten Neutrophilen wird von Petty et al. Enzymtranslokation, z.B. für die beiden glykolytischen Enzyme Phosphofruktokinase und Hexokinase, zur zellulären Membran beobachtet [59, 69, 71] (siehe Abbildung 7.9). Das erste Enzym des Pentosephosphatwegs, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDase), ist unabhängig vom proinflammatorischen Stimulus in mehr oder weniger großem Ausmaß an der Membran lokalisiert.

Dies wird modelliert, indem wir einen Bereich Ω_o der Weite $\Delta h = 0.5 \mu\text{m}$ an der Zellmembran mit erhöhter relativer Enzymkonzentration annehmen. Dies wird durch erniedrigte maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung $V_{\text{pfk}} = 1000 \mu\text{mol/s}$ und $V_{\text{hk}} = 100 \mu\text{mol/s}$ (siehe Abbildung 7.10) erreicht. Eine asymmetrische Wellenausbreitung wird künstlich durch erhöhte Anfangswerte der Metabolite in der Mitte von Ω_o initiiert (siehe Beschriftung

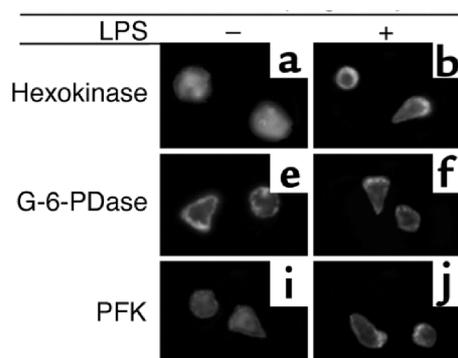


Abbildung 7.9: Immunofluoreszenz Mikroskopie von metabolischen Enzymen in repräsentativen Neutrophilen. Nach Aktivierung des Neutrophils durch den proinflammatorischen Stimulus Lipopolysaccharid (LPS) wird Enzymtranslokation der Hexokinase und Phosphofruktokinase (PFK) beobachtet ((b), (j)). Das erste Enzym des Pentosephosphatwegs Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDase) ist unabhängig vom proinflammatorischen Stimulus an der Membran lokalisiert (f). Die Abbildung ist aus [71] entnommen.

der Abbildung 7.11). Zur Simulation wird dann das so angepasste Problem (7.1) numerisch untersucht.



Abbildung 7.10: Visualisierung der modellierten Enzymtranslokation zur Peripherie nach Aktivierung des Neutrophils durch proinflammatorische Stimuli. Der Bereich des Neutrophils mit erhöhter maximaler Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung V_{pfk} und V_{hk} ist in schwarzer Farbe dargestellt.

In Abbildung 7.11 sind Simulationsergebnisse des Wellenkreuzens und der Wellenreflektion am Rand dargestellt. Es zeigt sich, dass beide Wellen in der Nähe der Membran um den Perimeter der Zelle entgegen des Uhrzeigersinns propagieren. Sieht man dieses Szenario dann von oben oder von unten durch ein Mikroskop ergibt dieses Verhalten die experimentell beobachteten Wellenphänomene [125]. Das entsprechende Aufspalten und die Intensitätsverdopplung beim Kreuzen, beziehungsweise der Wellenamplituden, der Model-

lierungsergebnisse ist in Abbildung 7.12 dargestellt. Hier wird eine Übereinstimmung mit den experimentellen Messungen beobachtet (siehe Abbildung 7.7).

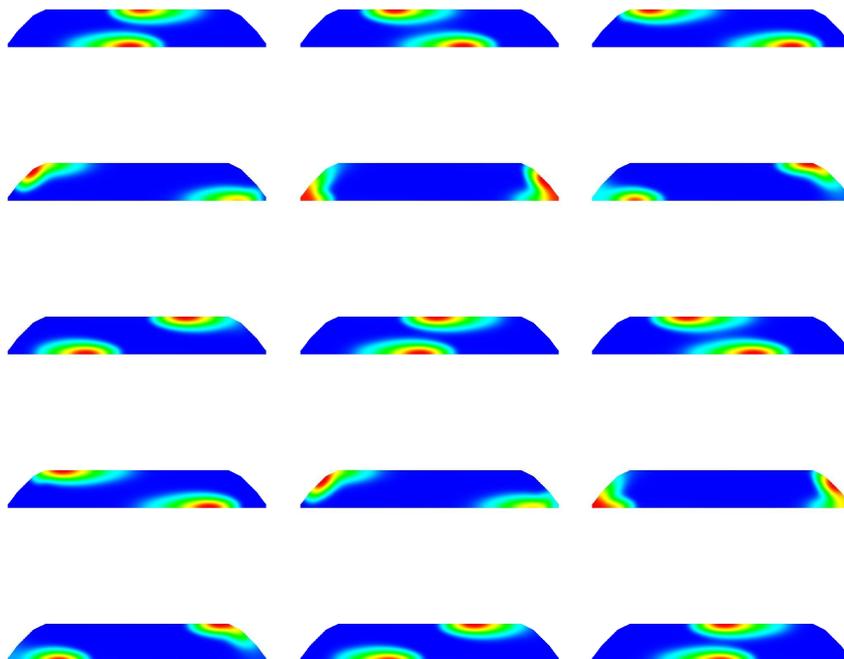


Abbildung 7.11: Numerische Simulationen des Wellenkreuzens verursacht durch Enzymtranslokation in aktivierten Neutrophilen. Eine Zeitreihe in Schritten von 0.05 Sekunden ist dargestellt. Zur Simulation wurde eine Glucosekonzentration $[GLC]=4\ \mu\text{mol}$ verwendet. Als Anfangswerte zur Initiierung des Wellenkreuzens wurden in Ω_o $[G6P]=50\ \mu\text{mol}$ und $[FBP]=0.1\ \mu\text{mol}$ verwendet (siehe Text für Details). Alle anderen Anfangswerte sind in Tabelle C.1 gegeben. Die Simulation wurde mit Hilfe der Finite-Element Bibliothek GASCOIGNE [44] durchgeführt. Die Visualisierung der Daten erfolgte mit Hilfe des Tools VISUSIMPLE [166].

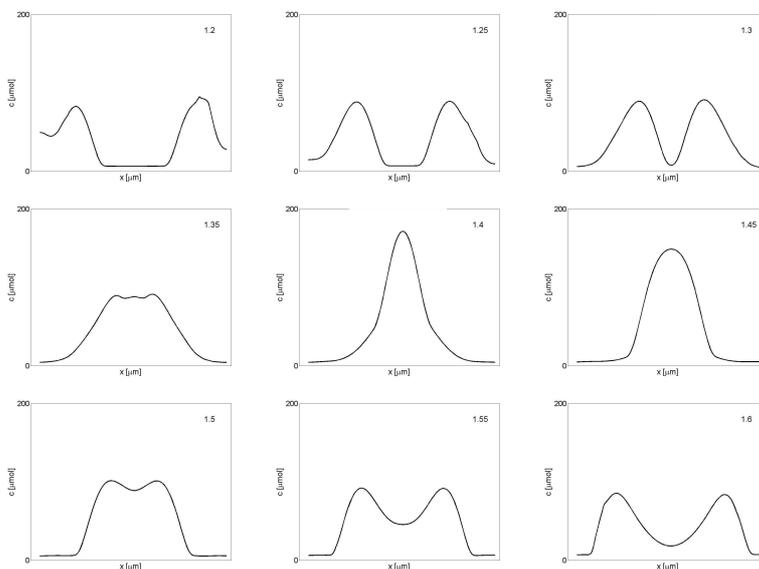


Abbildung 7.12: Intensitätsprofile des Wellenkreuzens, die aus den Simulationsergebnisse aus Abbildung 7.11 aus einer vertikalen Perspektive erhalten wurden.

Fügt man nun in jedem Zeitpunkt mehrere der Schnittebenen aus Abbildung 7.11, wie in Abbildung 7.13 dargestellt, zusammen und betrachtet sie von oben, so wird qualitativ das experimentell beobachtete Verhalten des Wellenkreuzens und der Reflexion am Rand beobachtet (siehe Abbildung 7.14).

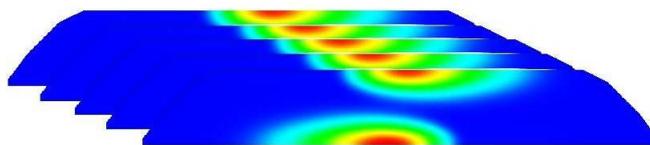


Abbildung 7.13: Schematische Darstellung der Einbindung mehrerer Schnittebenen aus Abbildung 7.11 zu einer Zeitreihe.

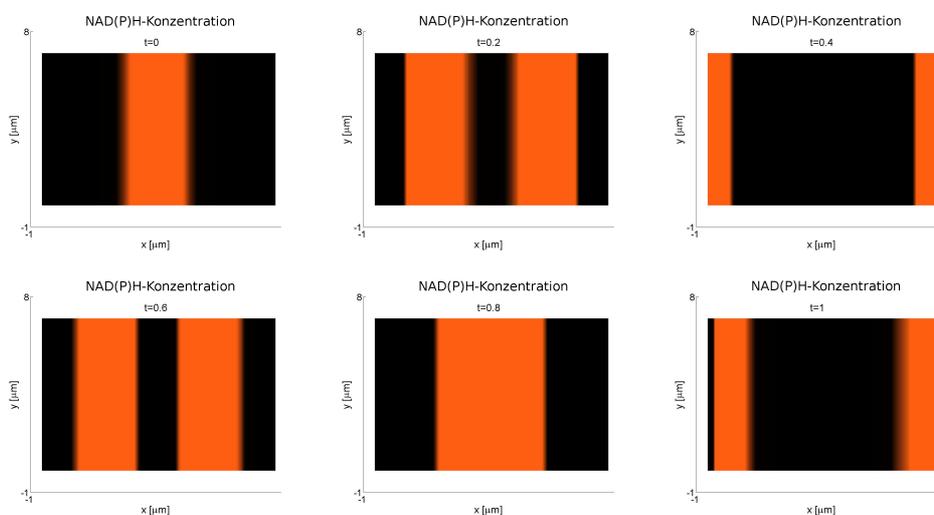


Abbildung 7.14: Zeitreihe (in Sekunden) zu den raumzeitlichen Simulationsergebnissen des NAD(P)H-Wellenkreuzens in Neutrophilen basierend auf den Simulationsergebnissen aus Abbildung 7.11. Die Daten wurden mit Hilfe der Routinen aus MATLAB[®] [98] visualisiert.

7.4 Analyse der Regulation der intrazellulären Glucosekonzentration

Da neben den raumzeitlichen Wellenphänomenen in fluorimetrischen Messungen der ganzen Zelle von Petty et al. auch NAD(P)H-Oszillationen beobachtet wurden, wird nun analysiert welcher Art ein potentieller Mechanismus sein kann, der Oszillationen nach einer räumlichen Mittelung ergibt. Da sich die Oszillationen in einer anderen Zeitskala (20 Sekunden im nicht aktivierten Zustand und 10 Sekunden im aktivierten Zustand) bewegen als die Wellendynamik (ungefähr 600 ms um die Zelle mit einer Länge von 20 μm zu durchlaufen), ergibt die Mittelung der Wellenintensitäten über die ganze Zelle der hier präsentierten numerischen Ergebnisse keine zeitlichen Oszillationen mit vergleichbaren Perioden. In [153] zeigen Slaby et al. wie man mögliche zelluläre Signalpfade mit Hilfe mathematischer Methoden zur optimalen Steuerung analysieren kann, die sich als erfolgreich zur Studie der externen Kontrolle von strukturbildendem Verhalten in biologischen und chemischen Systemen erwiesen [80, 81, 82, 83, 149, 150].

Die Methode der optimalen Steuerung wird angewandt, um eine mögliche Abhängigkeit der glykolytischen NAD(P)H-Oszillationen von dynamisch variierenden Steuerungsparameter zu analysieren [151, 153]. Da in aktivier-

ten Neutrophilen ein dynamisch regulierter Glucose-Zufluss beobachtet wird [161], wird nun untersucht inwieweit sich die Oszillationen durch einen dynamischen Glucose-Zufluss steuern lassen, um sinusförmige Oszillationen mit einer Periode von 20 beziehungsweise 10 Sekunden zu erhalten. Betrachtet wird dazu folgendes Optimalsteuerungsproblem mit fester Endzeit:

$$\min_{x,u} \int_0^{T=22} (x_{\text{NAD(P)H}}(t) - \bar{x}(t))^2 dt$$

unter den Nebenbedingungen

$$\begin{aligned} \dot{x}(t) &= f_{\text{GLYCO}}(t, x(t), u(t)), \quad x(t) \in [0, x_{\text{max}}], \quad t \in [0, 22] \\ x_{\text{NAD(P)H}}(t_0) &= 0.785 \\ x(0) - x(22) &= 0. \end{aligned} \tag{7.5}$$

In diesem Problem sind die Zustände $x \in \mathbb{R}^5$ die Metabolite der Glykolyse, wobei die räumliche Kopplung vernachlässigt wird, da hier der Einfluss eines dynamischen Stimulus auf das rein zeitliche Verhalten untersucht werden soll. Die Steuerung $u \in \mathbb{R}$ ist der Zufluss von Glucose. Der Zielzustand $\bar{x}(t)$ ist dabei eine Sinusfunktion $a \sin(bt + d) + e$ mit den Parametern $a = 0.1$, $b = 0.345$, $d = 0$ und $e = 0.785$, auf die die Oszillationen gesteuert werden sollen.

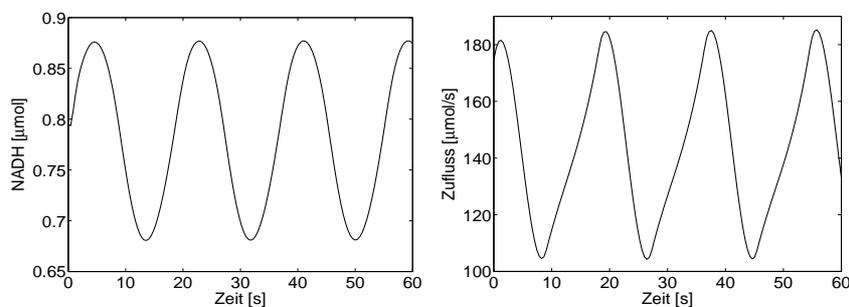


Abbildung 7.15: Steuerung der Oszillationen des Glykolysemodells. Die Berechnungen wurden unter Verwendung des auf Multiple-Shooting basierenden Optimal-Control-Tools MUSCOD-II [88, 22] durchgeführt.

Die letzten beiden Nebenbedingungen wurden für die numerische Berechnung eingefügt. Die erste Nebenbedingung legt die Konzentration von NAD(P)H am Zeitpunkt $t = 0$ fest. Da eine Oszillation durch eine Translation in der Zeit beliebig verschoben werden kann, wird durch diese Nebenbedingung dieser Freiheitsgrad eliminiert. Die zweite Nebenbedingung sichert eine periodische

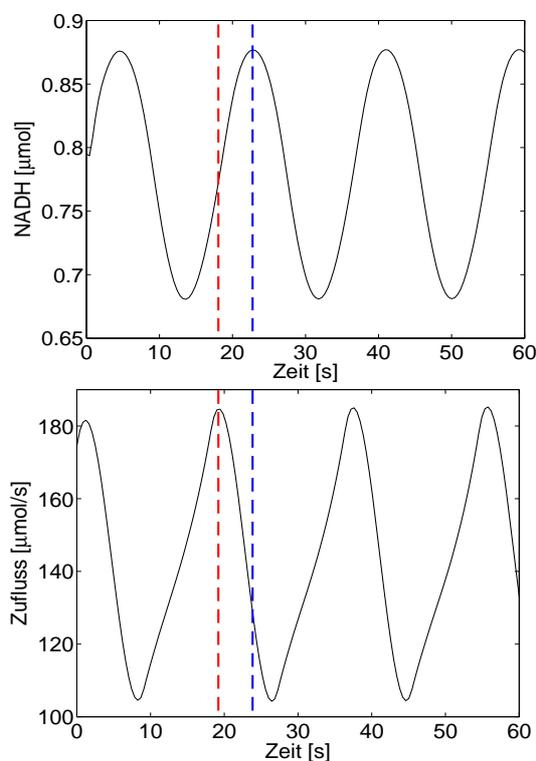


Abbildung 7.16: Phasenverschiebung der Oszillationen der Steuerung (Glucose-Einfluss) und der induzierten NAD(P)H-Oszillationen.

Oszillation mit einer Periode von 22 Sekunden. Diese Periode wurde empirisch über die Lösbarkeit der entsprechenden periodischen Randwertprobleme ermittelt und liegt im Bereich der experimentellen Daten. In Abbildung 7.15 sind die optimierten Oszillationen und die Steuerung abgebildet, die mit Hilfe des Optimalsteuerungspakets `MUSCOD-II` [88] für das System (7.5) berechnet wurden. Dabei wurde als Steuerungsparametrisierung für die direkte Methode der optimalen Steuerung (siehe Kapitel 4.3.1) eine stückweise kubische Funktion angenommen und die Zustände mittels der Multiple-Shooting Technik parametrisiert.

Besonders interessant ist die Phasenverschiebung der beiden Oszillationen von Glucose-Einfluss (input) und NAD(P)H-Oszillation (output) (vgl. Abbildung 7.16). Diese beträgt ungefähr 90° . Dies ist dieselbe Phasenverschiebung, die zwischen NAD(P)H- und Calcium-Oszillationen, die ebenfalls in Neutrophilen gefunden wurden (siehe Kapitel 5.3) [120]. Dieses als *Phasenkopplung* bekannte Phänomen bleibt nach experimentellen Daten auch nach Aktivierung der Neutrophile bestehen, obwohl ein Anstieg der Oszillationsfre-

quenz beider Oszillationen beobachtet wird. Dies legt einen hypothetischen Zusammenhang durch eine direkte Kopplung beider Oszillatoren nahe. Es ist bekannt, dass durch Frequenz und Gestalt der Calcium-Oszillationen Informationen in der Zelle kodiert werden [162]. Da die Phasenverschiebung der periodischen Steuerung ähnlich der experimentell beobachteten ist, ist es theoretisch möglich, dass durch Calcium-Signale die Oszillationen und die Wellenausbreitung beeinflusst werden. Ein hypothetischer Zusammenhang wäre, dass die Glucose Transporter der Zelle durch eine erhöhte Calciumkonzentration aktiviert werden und es somit zu einem dynamisch regulierten Einfluss kommt. Deshalb ist es nahe liegend, dass ein direkter Zusammenhang zwischen den Calcium- und den NAD(P)H-Dynamiken in Form einer Interaktion besteht. Die Autoren von [78] vermuten, dass der Metabolismus eventuell durch Ca^{2+} beeinflusst wird, aber durch den hier präsentierten Modellierungsansatz werden umgekehrt zusätzliche Hinweise auf einen möglichen direkten Einfluss von Ca^{2+} auf den Metabolismus über einen dynamisch regulierten Glucose-Einfluss gefunden. Dieser Mechanismus findet eventuell durch eine Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der Glucose Transporter (GLUT) in der Plasmamembran statt. Die Annahme einer periodischen Stimulation des Glucose-Einflusses durch Ca^{2+} wird durch experimentelle Messungen eines dynamisch regulierten Glucose-Einflusses [161] und der Tatsache, dass Ca^{2+} in dieser Regulation involviert ist [114] belegt. Diese Hypothese und die gegenseitige Beeinflussung des Metabolismus und des Ca^{2+} -Signalpfades werden im Detail im Kapitel 7.6 diskutiert.

7.5 NAD(P)H-Oszillationen basierend auf einer dynamisch regulierten Glucosekonzentration

Um sowohl Wellenausbreitung als auch zeitliche Oszillationen in einem integrierten Modellansatz zu beschreiben, wird hier nun auf den nicht aktivierten Zustand mit unidirektionaler Wellenausbreitung und 20s-Oszillationen fokussiert. Die im letzten Kapitel motivierte dynamische Glucose-Konzentration wird durch einen periodischen Glucose-Gehalt innerhalb der Zelle durch einen künstlichen Term $[\text{GLC}] = a \sin(\frac{\pi}{10}t) + c$ (mit Parametern a und c , die so gewählt werden, damit sie die experimentell beobachteten Charakteristika der NAD(P)H-Oszillationen wiedergeben) beschrieben. Zur mathematischen Beschreibung wird das System (7.1) durch diese periodische Beeinflussung erweitert und zur numerischen Behandlung wird es mit Hilfe finiter Differenzen (siehe Kapitel 4.4.2) auf dem Gebiet $\Omega = [0, 20] \times [0, 7]$ mit einer

Schrittweite $h = 0.25 \mu\text{m}$ diskretisiert und mit dem Integrator LIMEX (siehe Kapitel 4.2.2) in Zeitrichtung integriert.

Da die Glykolyse an sich ein oszillierendes System ist und dieser Prozess in unserem Fall hier periodische Wellenlösungen produziert, ist ein periodisches Beeinflussen dieses Reaktionswegs, so dass der Wellenausbreitung eine sinusoidale Oszillation überliegt, ein interessantes Modellierungsergebnis, weil dies nicht typischerweise in nichtlinearen Systemen beobachtet wird. Hier kann eine kleine Veränderungen der Parameterwerte in einer Vielzahl von dynamischem Verhalten bis hin zum Chaos resultieren [159]. Die Untersuchung der Dynamiken in Abhängigkeit von Parameterwerten ist ein eigenes Gebiet, das *Bifurkationstheorie* genannt wird.

In Abbildung 7.17 sind 20s-Oszillationen dargestellt, die aus der Mittelung der NAD(P)H-Konzentration über die ganze Zelle resultieren. Den Oszillationen unterliegt periodische Wellenausbreitung (siehe Anhang D.1), wobei durch die periodische Beeinflussung durch eine dynamische Glucose-Konzentration Wellen mit oszillierenden Amplituden entstehen. Dies ist konsistent mit experimentellen Beobachtungen [125]. Durch einen solchen Mechanismus kann auch der aktivierte Zustand mit Oszillationen mit einer Periode von 10 Sekunden und Koexistenz von Wellen erklärt werden.

7.6 Kopplung von Metabolismus und Calciumdynamik

Um ein autonomes Modell zu entwickeln, das sowohl die Wellenausbreitung als auch die zeitlichen Oszillationen beschreiben kann, wird der im vorigen Kapitel entwickelte Ansatz eines Ca^{2+} -abhängigen Glucose-Einflusses, durch den oszillierende Wellenamplituden entstehen, erweitert. Aus experimentellen Messungen ist bekannt, dass die Aktivierung der Neutrophile durch Chemotaktoren oder proinflammatorische Cytokine zu einer Aktivierung des Pentosephosphatwegs führt (siehe Kapitel 5.2 und [71, 72, 78, 134] und Referenzen darin).

Um zu analysieren, ob ein solcher Aktivierungsmechanismus das Umschalten der Oszillationen mit einer Periode von 20 Sekunden auf 10 Sekunden nach Aktivierung, das experimentell beobachtet wird (siehe Abbildung 7.18 und [78]), erklären kann, wird das raumzeitliche metabolische Modell um intrazelluläres Calcium erweitert. Es gibt experimentelle Hinweise darauf, dass der cADP-Ribose (cADPR) abhängige Ca^{2+} -Einfluss eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis der Neutrophile spielt [118]. cADPR wird aus NAD^+ durch das Enzym CD38 synthetisiert und ist dafür bekannt einen Ca^{2+} -Ausfluss

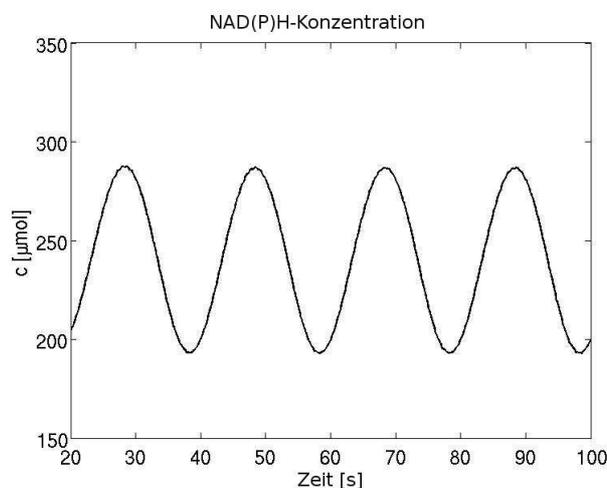


Abbildung 7.17: NAD(P)H-Oszillationen, die aus der Mittelung über die ganze Zelle in jedem Zeitpunkt resultieren. Dies ist ein Ergebnis der unterliegenden Wellenausbreitung mit oszillierenden Amplituden, die durch eine periodische Glucosekonzentration verursacht wird. Die verwendeten Parameter sind $[GLC] = a \sin(\frac{\pi}{10}t) + c$: $a = 2$, $c = 5$. (siehe Text). Anfangswerte sind in Tabelle C.1 gegeben und wir verwenden $[GLC] = 70 \mu\text{mol}$ in der Mitte des linken Randes als Auslöser der Wellen und $[GLC] = 5 \mu\text{mol}$ sonst.

aus intrazellulären Speichern zu initiieren [42, 87] (siehe Abbildung 7.18 für eine schematische Darstellung der Kopplung). Somit wird folgendes Problem behandelt:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} &= f_{\text{GLYCO}}(u) + D\Delta u \text{ in } \Omega \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= f_{\text{Ca}^{2+}}(v) \text{ in } \Omega, \end{aligned}$$

wobei u der Vektor der Metabolite der Glykolyse einschließlich cADPR, d.h. die Variablen des Glykolyse-Modells, und v die Variablen des Ca^{2+} -Modells beschreiben. f_{GLYCO} und $f_{\text{Ca}^{2+}}$ sind die entsprechenden kinetischen Terme aus den Kapiteln 6.3.1 und 6.3.2. D ist eine Matrix, die die Diffusionskoeffizienten enthält, $\Omega \subset \mathbb{R}^2$ das geometrische Gebiet, d.h. hier das Neutrophil und Δ der Laplace-Operator, um diffusiven Transport zu beschreiben. Da nur das Kopplungsverhalten des Metabolismus und einer räumlich homogenen Ca^{2+} -Dynamik untersucht werden soll, wird für Ca^{2+} auf eine räumliche Modellierung verzichtet. Es werden Null-Fluss von-Neumann-Randbedingungen für alle Spezies angenommen, um die Nichtdurchlässigkeit der Membran zu

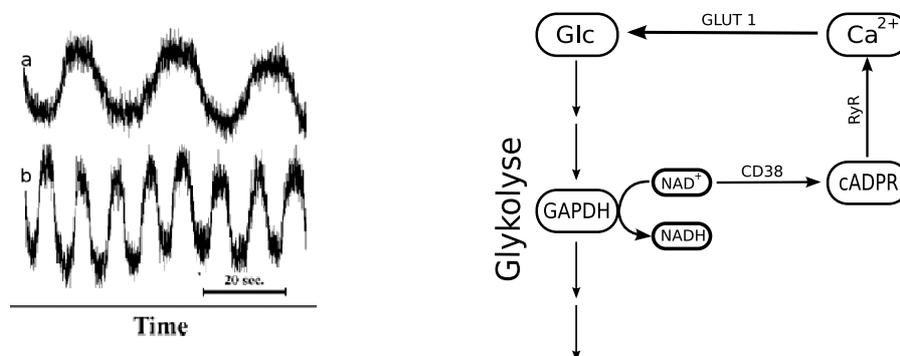


Abbildung 7.18: Links: Intrazelluläre NAD(P)H-Oszillationen. Nach Aktivierung des Neutrophils wird eine Frequenzerhöhung von einer Periode von 20 (a) auf 10 Sekunden (b) beobachtet. Die Abbildung ist aus [70] entnommen. Rechts: Schematische Darstellung der Kopplung des Metabolismus mit der Ca^{2+} -Dynamik durch cADPR.

modellieren. Die Glucose-Konzentration wird nur als (räumlich inhomogener) zeitvariabler Parameter in das Modell mit aufgenommen. Zur mathematischen Behandlung wird das System (7.6) mit Hilfe finiter Differenzen (siehe Kapitel 4.4.2) auf dem Gebiet $\Omega = [0, 20] \times [0, 7]$ mit einer Schrittweite $h = 0.25 \mu\text{m}$ diskretisiert und mit dem Integrator LIMEX (siehe Kapitel 4.2.2) in Zeitrichtung integriert.

Durch Hinzunahme der Calcium-Kopplung in das Modell können die raumzeitliche Wellenausbreitung und zusätzlich die zeitlichen Oszillationen erklärt werden. Man erhält ebenfalls eine Frequenzerhöhung der zeitlichen Oszillationen nach Aktivierung des Pentosephosphatwegs (siehe Abbildung 7.19, links). Dieser zeitlichen Oszillation unterliegt wiederum eine raumzeitlichen periodische Wellenausbreitung (siehe Abbildung D.2), wobei sich der aktivierte und der nicht-aktivierte Zustand dadurch unterscheiden, dass die Amplituden der Wellen mit einer Frequenz von 20 Sekunden beziehungsweise 10 Sekunden oszillieren.

In [78] werden simultane fluorimetrische Messungen der NAD(P)H- und Ca^{2+} -Dynamik präsentiert (siehe Abbildung 7.19, rechts). Hier kann nach Aktivierung des Neutrophils (Pfeil) eine Frequenzerhöhung beider Oszillatoren beobachtet werden, wobei die Phasenkopplung erhalten bleibt. Beides kann mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Modells im Einklang mit der NAD(P)H-Wellenausbreitung erklärt werden. Darüberhinaus scheint nach Aktivierung zuerst ein Minimum der NAD(P)H-Oszillation erreicht werden

zu müssen, bevor das Aktivierungssignal zu einer Frequenzerhöhung führen kann. Da in einem Minimum der NAD(P)H-Oszillation die zelluläre NAD⁺-Konzentration ein Maximum erreicht, folgt aus dem eben beschriebenen Mechanismus ein Anstieg der cADPR-Konzentration, das aus NAD⁺ synthetisiert wird, der einen Ca²⁺-Ausstoß aus den intrazellulären Speichern zur Folge hat. Anschließend wird durch Ca²⁺ ein stärkerer Glucose Einfluss stimuliert. Dadurch erfolgt eine wechselseitige Stabilisierung beider Oszillatoren.

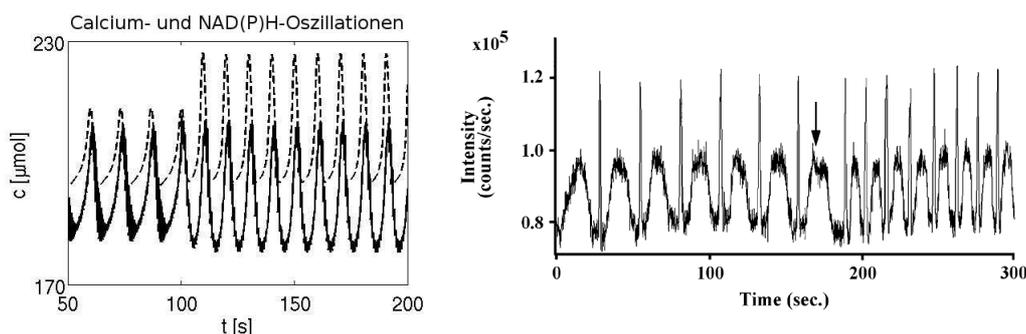


Abbildung 7.19: Links: Simultane NAD(P)H- und Ca²⁺-Oszillationen aus Modell-Simulationen, die aus der Mittelung über die ganze Zelle zu jedem Zeitpunkt resultieren. Dies ist ein Ergebnis aus der unterliegenden NAD(P)H-Wellenausbreitung mit oszillierenden Amplituden, die durch einen getriebenen Ca²⁺-aktivierten periodischen Glucose-Einfluss in die Zelle entstehen. Am Zeitpunkt $t=100$ wird der Pentosephosphatweg durch eine Änderung von $k_{\text{hms}} = 0$ zu $k_{\text{hms}} = 2$ aktiviert. Gestrichelte Linien bezeichnen die Ca²⁺-Oszillationen. Die Ca²⁺-Konzentration wird durch den Term $(190+50[\text{Ca}^{2+}])$ skaliert, um eine bessere Visualisierung zu erreichen. Anfangswerte sind Tabellen C.1 gegeben und wir verwenden $[\text{GLC}] = 80 \mu\text{mol}$ in der Mitte des linken Randes als Auslöser der Wellendynamik. Rechts: Simultane fluorimetrische Messungen der NAD(P)H- und Ca²⁺-Oszillationen. Nach Aktivierung (Pfeil) wird eine Frequenzerhöhung beider Oszillatoren beobachtet. Die rechte Abbildung ist aus [78] entnommen.

Die Frequenzerhöhung beider Oszillatoren kann durch diesen Mechanismus ebenfalls erklärt werden. Wird das Neutrophil aktiviert, d.h. der Pentosephosphatweg aktiviert, so steht in diesem Moment weniger Substrat für den Fluss durch die Glykolyse zur Verfügung. Dies führt zu einem beschleunigten Absinken der zellulären NADH-Konzentration. Dadurch steigt die zelluläre NAD⁺-Konzentration an, die die cADPR-Produktion angeregt und dadurch werden die RyR aktiviert und ein Calcium-Ausfluss erfolgt. Durch den Calcium-abhängigen Glucose-Einfluss erfolgt die Rückkopplung auf den Metabolismus und es wird eine Frequenzerhöhung beobachtet.

Weitere experimentelle Hinweise auf einen solchen Mechanismus werden durch Experimente gegeben, bei denen eine Aktivierungssubstanz zu unterschiedlichen Phasen der Oszillationen auf das Neutrophil gegeben wird [8] (siehe Abbildung 7.20). Hier wird ebenfalls beobachtet, dass nach Zugabe einer chemotaktischen Substanz nach einer kurzen Phase der Signaltransduktion, bei der das Signal über die Rezeptoren nach innen propagiert werden muss, immer zuerst ein Minimum der NAD(P)H-Oszillation erreicht werden muss, damit die Frequenzerhöhung stattfinden kann. Dies ist konsistent mit den präsentierten numerischen Ergebnissen.

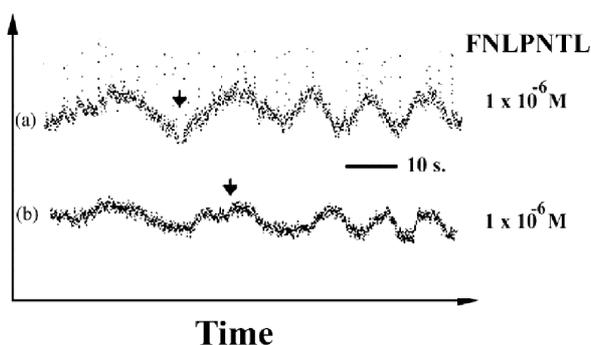


Abbildung 7.20: Intrazelluläre NAD(P)H-Oszillationen während der Zugabe des chemotaktischen Peptids FNLPTL zu unterschiedlichen Phasen (gekennzeichnet durch einen Pfeil). Die Abbildung ist aus [8] entnommen.

Im Sinne eines einheitlichen Modells des dynamischen Verhaltens in Neutrophilen postulieren wir somit einen Mechanismus, der einen Ca^{2+} kontrollierten Glucose-Einfluss in die Zelle enthält. Diese Regulation kann möglicherweise auf der Ca^{2+} -induzierten Phosphorylierung der Glucose-Transporter GLUT [5] oder einer Ca^{2+} -aktivierten Fusion von intrazellulären Vesikeln mit der Plasmamembran [143] basieren, die GLUT-Transporter beinhalten. Eine Ca^{2+} -Abhängigkeit der Regulation des Glucose-Transports über die Membran in proinflammatorisch aktivierten Neutrophilen wird auch durch experimentelle Studien belegt [115], in denen die Autoren ein Ca^{2+} -Ionophor, das die Permeabilität der biologischen Membran mit einer hohen Selektivität für divalente Kationen wie Ca^{2+} [6] erhöht, einsetzen. Da die Aktivierung der Neutrophile auch mit Änderungen in der metabolischen Aktivität korreliert [78, 134], untermauert dies einen Effekt des Ca^{2+} -Signalpfades auf den Metabolismus durch einer Regulation des Glucose-Transports durch die Membran.

Ein gesteigerter Glucose-Transport durch die Plasmamembran ist darüberhinaus als ein wichtiger Teil der Regulation der metabolischen Aktivität bekannt. Deshalb wurde er im Detail studiert (siehe [62] für einen Review der metabolischen Regulation des Glucose-Transports). Interessanterweise werden in aktivierten Neutrophilen erhöhte Glucosekonzentrationen experimentell gemessen [143, 161] und daher scheint die Glucose-Transportrate mit Hinblick auf die Aktivierung reguliert zu sein. Glucose-Transport in die Zellen wird durch eine Familie von homologen Glycoproteinmolekülen vermittelt, die GLUT genannt werden. In Neutrophilen sind experimentell nur GLUT-1 gefunden worden [143] und für diese GLUT-1 wurde eine Abhängigkeit der Glucose-Aufnahme von Ca^{2+} gemessen [103]. Eine Ca^{2+} -abhängige Glucose-Aufnahme über den Transporter GLUT-1 wird darüberhinaus in menschlichen megakaryocytischen Zelllinien [97], Leberzelllinien der Ratte [103] und Hautzellen der Ratte [129] durch einen bis heute unbekanntem Mechanismus beobachtet. Der cADPR-kontrollierte Ca^{2+} -Einfluss aus intrazellulären Speichern wird ebenfalls durch reichhaltige Experimente aus der Literatur belegt ([86, 87, 144] und Referenzen darin).

7.7 Diskussion der Ergebnisse

In den vorigen Kapiteln wurde ein detailliertes Modell der Strukturbildungsprozesse in Neutrophilen und seine numerische Simulation vorgestellt. Mit diesem Modell konnten die von Petty et al. beobachteten Wellenphänomene mit deren spezieller Charakteristika (wie z.B. Unidirektionalität und Wellenreflektion nach Aktivierung), aber auch die zeitlichen Oszillationen, die bei fluorimetrischen Messungen der ganzen Zelle nach räumlicher Mittelung gemessen wurden, erklärt werden. Da in neueren Veröffentlichungen die Reproduzierbarkeit der dynamischen Phänomene diskutiert wird [54, 132], können durch die hier entwickelten theoretischen Überlegungen zumindest die theoretischen Voraussetzungen für die Existenz derartiger Phänomene bestätigt werden.

Unabhängig von den publizierten Daten von Petty et al. wurde aber auch in anderen experimentellen Arbeiten in Neutrophilen dynamische Strukturbildungsphänomene beobachtet (siehe Kapitel 5.3). Die in dieser Arbeit präsentierten Modellierungsergebnisse können somit auch als eine mechanistische Studie allgemein beobachteter strukturbildender Dynamiken in Neutrophilen herangezogen werden.

Da keinerlei Neutrophil-spezifische Annahmen bei der Modellbildung gemacht wurden, könnten diese Strukturen auch in anderen Zelltypen auftreten. Vor allem die in dieser Arbeit präsentierten geometrischen Überlegungen un-

terliegen möglicherweise einem prinzipiellen Mechanismus in biochemischen Systemen, um eine Vielzahl von Signalen gezielt und eindeutig verarbeiten zu können. Dass lokale Gradienten oder Dynamiken, wie z.B. durch Wellenausbreitung, intrazellulär auftreten und auch Funktionen inne haben müssen, ist offensichtlich, da die Natur eine Vielzahl von zellulären Strukturen hervorgebracht hat, durch die lokale Dynamiken entstehen. Nimmt man Überlegungen zu räumlichen Strukturen in biologische Betrachtungsweisen mit auf und versucht sie vor allem in einen dynamischen intrazellulären Zusammenhang zu bringen, läßt sich mit einem solchen Ansatz wahrscheinlich ein besseres Verständnis der Dynamik des Lebens erreichen.

In dieser Arbeit wird versucht eine Vielzahl komplexer dynamische Phänomene konsistent in einem integralen Modellierungsansatz zu beschreiben. Ein solcher Ansatz ist nötig, da nur durch systematische Überlegungen, die alle experimentellen Daten berücksichtigen, ein ganzheitliches Verständnis erreicht werden kann. Leider wird dieser Ansatz in einer Vielzahl von Fällen vor allem in der in der heutigen Zeit aktuellen *Systembiologie* nicht berücksichtigt.

Kapitel 8

Zusammenfassung und Ausblick

8.1 Zusammenfassung der Arbeit

In dieser Arbeit wird raumzeitliche Modellierung und numerische Simulation z.B. mit Hilfe von Finite-Elemente-Methoden angewandt, um mögliche biochemische Mechanismen zu untersuchen, die den exotischen experimentell beobachteten metabolischen Wellen- und Oszillationsdynamiken in Neutrophilen, speziellen Immunzellen der angeborenen Immunität, unterliegen. Obwohl die Strukturbildung in Neutrophilen aktuell Teil einer Kontroverse ist, konnte durch diese Studie zumindest eine theoretische Basis geschaffen werden, die der Dynamik potentiell zugrunde liegt und die verschiedenen Phänomene erklären kann.

Da bekannt ist, dass der Energiehaushalt der Neutrophile überwiegend durch anaerobe Glykolyse bestritten wird, und da experimentelle Hinweise existieren, die die nichtlinearen strukturbildenden Dynamiken mit diesem Reaktionsweg in Verbindung bringen, wird ein detailliertes kinetisches Modell der Glykolyse entwickelt. Dieses kinetische Modell wird um diffusiven Transport der glykolytischen Metabolite erweitert, um eine raumzeitliche Beschreibung der Prozesse zu ermöglichen.

Es wird zuerst demonstriert, dass das Modell fähig ist, NAD(P)H-Wellen mit der experimentell beobachteten Charakteristik, wie z.B. Gestalt, Geschwindigkeit und Wellenlänge, zu produzieren. Durch Hinzunahme eines regulierten Glucose-Transports durch die zelluläre Membran, kann die exklusive Auslösung der NAD(P)H-Wellen am Uropodium und deren Unidirektionalität durch geometrische Überlegungen zur realistischen zellulären Morphologie erklärt werden. Nimmt man einen räumlich homogenen Glucose-Einfluss über die Plasmamembran an, wird die unidirektionale NAD(P)H-Wellenausbreitung durch einen höheren Glucose-Einfluss pro Volumen am

Ende der Zelle ausgelöst, da polarisierte Neutrophile charakteristisch ein dünneres Ende und eine breitere Front ausbilden.

Mit Hilfe des Modells ist es ebenfalls möglich, das experimentell beobachtete Wellenkreuzen und die Reflektion am Rand in proinflammatorisch aktivierten Neutrophilen zu erklären. Durch die Berücksichtigung einer Enzymtranslokation zur zellulären Peripherie, die in proinflammatorisch aktivierten Neutrophilen experimentell beobachtet wird, wird gezeigt, dass das Wellenkreuzen und die Reflektion am Rand dadurch zu Stande kommen kann, dass basierend auf der heterogenen Enzymverteilung eine Wellenausbreitung am Rand und somit –aus der Vertikale betrachtet– in unterschiedlichen zellulären Ebenen stattfindet. Das Wellenkreuzen und die Randreflektion resultieren dann aus der dreidimensionalen Geometrie eines Neutrophils. Dieser Mechanismus ist mit experimentellen quantitativen Intensitätsprofilen konsistent. Hier wird eine systematische Halbierung der Wellenintensität beim Aufspalten und eine Intensitätsverdopplung beim Kreuzen beobachtet, die durch diesen Mechanismus theoretisch erklärbar ist.

Für Neutrophile wird neben den raumzeitlichen Wellenphänomenen auch von rein zeitlichen Dynamiken in Form von Oszillationen berichtet. Da sich die Wellendynamik (ungefähr 600 ms um die Zelle mit einer Länge von $20\ \mu\text{m}$ zu durchlaufen) in einer anderen Zeitskala als die zeitlichen Oszillationen (20 Sekunden Periode im nicht aktivierten Zustand und 10 Sekunden Periode im aktivierten Zustand) bewegt, kann über den Wellenmechanismus eine 20s- beziehungsweise 10s-Oszillation nicht erklärt werden. In dieser Arbeit wird deshalb ein hypothetischer Mechanismus entwickelt und diskutiert, der einen periodischen Calcium-abhängigen Glucose-Einfluss in die Zelle annimmt, der die metabolische raumzeitliche Dynamik forciert. Darüberhinaus wird eine Feedback-Kopplung zum Calcium-Signalpfad über die Synthese von cADPR postuliert, das aus NAD^+ synthetisiert wird und für die Regulation des Calcium-Einflusses aus intrazellulären Speichern bekannt ist. Mit Hilfe dieses Mechanismus kann gezeigt werden, dass das experimentell beobachtete Umschalten der NAD(P)H- und Calcium-Oszillationen von einer Periode von 20 Sekunden auf 10 Sekunden nach proinflammatorischer Aktivierung erklärt werden kann. Die Annahme einer periodischen Forcierung des Glucose-Einflusses durch Calcium ist durch das Wissen motiviert, dass eine dynamische Regulation des Glucose-Transports in Neutrophilen experimentell beobachtet wird. Darüberhinaus ist bekannt, dass Calcium an dieser Regulation beteiligt ist. In dieser Arbeit wird dazu ein Ansatz präsentiert, in dem mathematische Optimalsteuerungstechniken, die die direkte Methode der optimalen Steuerung und Multiple-Shooting-Techniken verwenden, angewandt werden, um Einflüsse dynamisch variierender Parameter wie der Glucose-Konzentration im Hinblick auf die experimentell gefundenen Phäno-

mene zu analysieren. Hier zeigt sich, dass experimentell beobachtete harmonische NAD(P)H-Oszillationen durch eine periodische Glucose-Konzentration erhalten werden können. Der periodische Zufluss zeigt dabei dieselbe Phasenbeziehung zur NAD(P)H-Oszillation wie die für den NAD(P)H- und Calcium-Oszillator experimentell beobachtete Beziehung. Aus diesen Ergebnissen kann somit geschlossen werden, dass ein plausibler biochemischer Mechanismus eine Calcium-abhängige periodische Aktivierung des Glucose-Transports über die zelluläre Membran sein kann.

Im Allgemeinen wird in dieser Arbeit ein konsistentes raumzeitliches Modell entwickelt, das die Strukturbildungsprozesse und deren speziellen Charakteristika, wie z.B. Frequenzerhöhung und Wellenkreuzen bei proinflammatorischer Aktivierung, in Neutrophilen schlüssig beschreibt und einen möglichen zellulären Mechanismus vorschlägt.

8.2 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten theoretischen Modellierungsergebnisse basieren zum Teil auf Parameter, die zwar in anderen Zellsystemen bekannt sind, aber für Neutrophile nicht untersucht sind. So muss in zukünftigen Studien vor allem eine experimentelle Validierung der numerischen Ergebnisse erfolgen. Neben weiteren experimentellen Studien zum strukturbildenden Verhalten in Neutrophilen, die ein systematischeres Bild über das Auftreten der Strukturen und deren Eigenschaften liefern könnten, könnten zur experimentellen Validierung der theoretischen Ergebnisse vor allem Studien mit Inhibitoren der involvierten Reaktionswege und deren Einfluss auf die metabolische Dynamik neue Erkenntnisse bringen. Ein einfaches Experiment wäre eine Studie zur Inhibierung der Calcium-Dynamik und dessen Einfluss auf die metabolischen Oszillationen und Wellen. Der Einfluss des Calcium-Einflusses auf die metabolische Dynamik könnte durch die Herstellung eines Calcium-freien extrazellulären Mediums durch EDTA geschehen, da gezeigt wurde, dass der extrazelluläre Einfluss in die Calciumdynamik involviert ist [31]. Ein Experiment, mit dem die theoretische Annahme eines dynamischen Glucose Einflusses in die Zelle untersucht werden könnte, wäre die fluorimetrische Messung der intrazellulären Glucose Konzentration. Dies könnte eventuell mittels eines geeigneten Glucose-Nanosensors, wie z.B. der in [39] entwickelte Sensor, untersucht werden, der bereits bei intrazellulären Glucose-Oszillationen in COS-7 Zellen Anwendung gefunden hat. Dadurch könnte eine dynamische Glucose Konzentration experimentell untersucht werden. Eine systematische Studie der an der Dynamik beteiligten Prozesse könnte zu einem fundamentalen Verständnis dieses in unserer Immu-

nabwehr sehr wichtigen Zelltyps führen.

Die in dieser Arbeit präsentierte Untersuchung einer raumzeitlichen Dynamik, die durch Mittelung über den ganzen zellulären Bereich eine rein zeitliche Dynamik hervorbringt, muss in Zukunft wichtiger Teil der biologischen Studien werden, da offensichtlich ist, dass räumliche Organisation ein wichtiger Teil der zellulären Dynamiken darstellt und diese nicht durch räumlich gemittelte Messungen mit Hilfe von Modellierung verstanden werden kann, wie es in einer Vielzahl der aktuellen Studien der Fall ist.

Neben dem molekularen Verständnis der beobachteten Dynamik stellt sich auch die Frage, ob die nichtlineare Dynamik und die strukturbildenden Phänomene ein generelles, zelluläres Prinzip mit wichtiger physiologischer Relevanz sind. Es ist nicht klar, ob strukturbildendes Verhalten eher zufällig aus den durch die Evolution entstandenen zellulären Strukturen entsteht oder ob dieses dynamische Verhalten eventuell ein wichtiges Prinzip der zelluläre Signaltransduktion ist, um die Reichhaltigkeit der in einer Zelle eingehenden Signale zu kodieren.

Anhang A

Modellgleichungen

A.1 Glykolyse

Reaktions-Nummer	Name	Kinetik
R1	HK	$\frac{V_{hk}[\text{Glc}]}{K_{hk} + [\text{Glc}]}$
R2	PFK	$\frac{V_{\text{pfk}}[\text{F6P}]^h}{[\text{F6P}]^h + K_{\text{pfk}}^h \frac{1 + (k_x[\text{FBP}])^{h_x}}{1 + \alpha^h (k_x[\text{FBP}])^{h_x}}}$ $h = h_{\text{pfk}} - \sigma \frac{[\text{FBP}]}{K_{\text{fba}} + [\text{FBP}]}$
R3	FBA	$\frac{V_{\text{fba}} [\text{FBP}]}{K_{\text{fba}} + [\text{FBP}]}$
R4	GAPDH	$\frac{V_{\text{gapdh}}[\text{GAP}][\text{NAD}^+]}{K_{\text{igap}}K_{\text{nad}} + K_{\text{gap}}[\text{NAD}^+] + K_{\text{nad}}[\text{GAP}] + [\text{GAP}][\text{NAD}^]}$

Tabelle A.1: Modellgleichungen für das Glykolyse-Modell.

A.2 Calcium-Signaltransduktion

Spezies	Kinetik
$[Ca^{2+}]$	$\frac{f_i}{V_i} \left(L + \frac{P_{IP_3R} [IP_3]^3 [Ca^{2+}]^3 h^3}{([IP_3] + K_i)^3 ([Ca^{2+}] + K_a)^3} + \frac{V_{RyR} [cADPR]^3}{[cADPR]^3 + K_{RyR}^3} \right) \cdot$ $([Ca_{ER}^{2+}] - [Ca^{2+}]) - \frac{f_i}{V_i} \left(\frac{V_{SERCA} [Ca^{2+}]^2}{[Ca^{2+}]^2 + K_{SERCA}^2} \right)$
h	$A(K_d - ([Ca^{2+}] + K_d)h)$
$[Ca_{ER}^{2+}]$	$\frac{[Ca^{2+}]_T - [Ca^{2+}]}{\sigma}$

Tabelle A.2: Modellgleichungen für das Calcium-Modell.

Anhang B

Modellparameter

Kinetischer Parameter	Parameterwert	Kinetischer Parameter	Parameterwert
V_{hk}	250 $\mu\text{mol/s}$	K_{hk}	47 μmol
K_{eq}	3.5	V_{pfk}	8000 $\mu\text{mol/s}$
K_{pfk}	2000 μmol	k_x	10
h_x	2.5	K_{fba}	5 μmol
α	5	h_{pfk}	2.5
σ	1.5	V_{fba}	400 $\mu\text{mol/s}$
V_{gapdh}	7000 $\mu\text{mol/s}$	K_{igap}	3210 μmol
K_{nad}	50 μmol	K_{gap}	98 μmol
k_{NADH}	5 s^{-1}	c_{sum}	5000 μmol
k_{NADPH}	5 s^{-1}	GLC_{in}	100 $\mu\text{mol/s}$
k_{hms}	0.01 s^{-1}	\bar{V}_i	4 pL
f_i	0.01 pL/s	P_{IP_3R}	26640 amol/s
L	0.37 pL/s	K_a	0.4 amol
K_i	1 amol	K_{RyR}	0.1 amol
V_{RyR}	16 amol/s	K_{SERCA}	0.2 amol
V_{SERCA}	400 amol/s	K_d	0.4 amol
A	0.8	Ca_T^{2+}	4 μmol
σ	0.185	k_{cadp}	0.003 s^{-1}
$[IP_3]$	0.4 μmol	in	16 μmol
k_{cadpc}	35 s^{-1}	K_{in}	1 μmol
V_{in}	18 $\mu\text{mol/s}$		

Tabelle B.1: Parameterwerte für die verwendeten Modellgleichungen. Änderungen der Parameterwerte sind in den Unterschriften der Abbildungen angegeben.

Anhang C

Startwerte

Spezies	Startwert
[G6P]	200 μmol
[FBP]	0.01 μmol
[GAP]	10 μmol
[NADH]	10 μmol
[NADPH]	1 μmol
[Ca ²⁺]	0.2 μmol
[h]	0.9 μmol
[cADPR]	1 μmol

Tabelle C.1: Allgemeine Startwerte für die numerischen Simulationen. Abweichende Werte sind im Text oder in den Legenden der entsprechenden Abbildungen angegeben.

Anhang D

Weitere Abbildungen

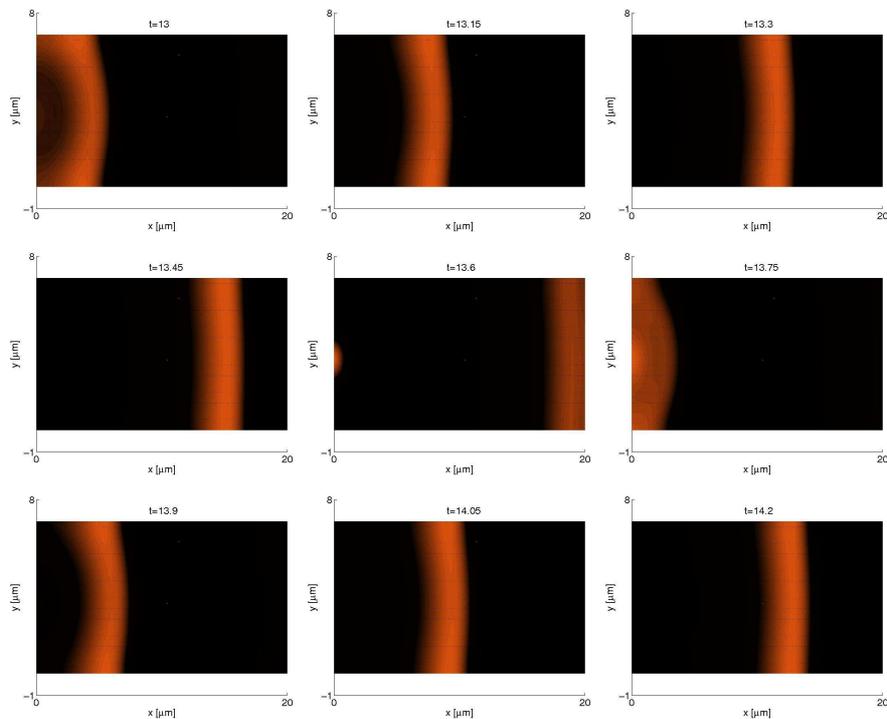


Abbildung D.1: Zeitreihe (in Sekunden) zu den raumzeitlichen Simulationsergebnissen der NAD(P)H Wellenausbreitung in Neutrophilen, die der in Kapitel 7.5 präsentierten zeitlichen Oszillationen unterliegt. Die Startwerte sind in Tabelle C.1 gegeben. Es wird $[GLC]=70\ \mu\text{mol}$ in der Mitte des linken Randes und $[GLC]=5\ \mu\text{mol}$ sonst angenommen. Die Daten wurden mit Hilfe der Routinen aus MATLAB[®] [98] visualisiert.

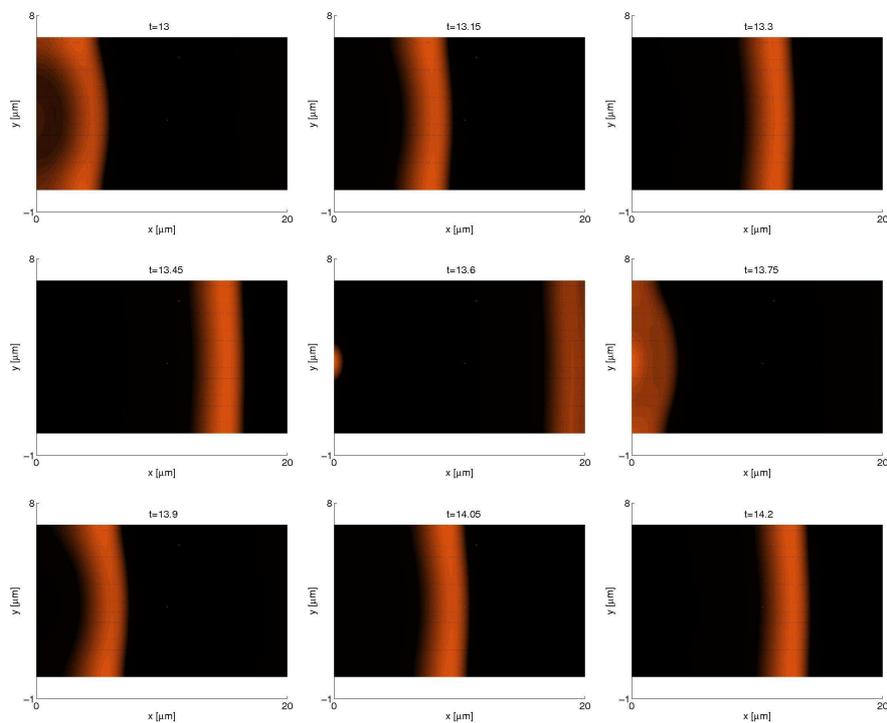


Abbildung D.2: Zeitreihe (in Sekunden) zu den raumzeitlichen Simulationsergebnissen der NAD(P)H Wellenausbreitung in Neutrophilen, die der in Kapitel 7.6 präsentierten zeitlichen Oszillationen unterliegt. Die Startwerte sind in Tabelle C.1 gegeben. Es wird $[GLC] = 70 \mu\text{mol}$ in der Mitte des linken Randes und $[GLC] = 5 \mu\text{mol}$ sonst angenommen. Die Daten wurden mit Hilfe der Routinen aus MATLAB[®] [98] visualisiert.

Anhang E

Index der Symbole und Akronyme

E.1 Symbole

\mathbb{C}^-	die linke Halbebene der komplexen Zahlenebene
$\mathcal{C}^k(D)$	Menge der auf D k mal stetig differenzierbarer Funktionen
D	Matrix der Diffusionskoeffizienten
$Df(x)$	Jacobimatrix der Funktion $f(x)$
Δ	Laplace-Operator
f	Rechte Seite einer ODE oder PDE
\mathcal{L}	Lagrangefunktion
λ	Langrangemultiplikator
∇	Gradient einer Funktion
∇_x^2	Hesse-Matrix einer Funktion
$O(u_0)$	Orbit durch u_0
Ω	Allgemeines Gebiet
$\partial\Omega$	Rand eines Gebiets
\mathcal{O}	Landau Symbol „Groß O“
φ	Evolutionoperator eines dynamischen Systems auch lichtsensitiver Parameter der BZR auch Testfunktion
\mathbb{R}	Menge der reellen Zahlen
$\operatorname{Re}(\lambda)$	Realteil von λ
s	Variable der „Wecker-Differentialgleichung“
t	Zeitvariable
V	Sobolew-Raum
u	Steuerungsfunktion

x	Raumvariable
$[x]$	Intrazelluläre Konzentration einer Spezies x
y	Raumvariable

E.2 Akronyme

6-AN	6-Aminonicotinamid
ATP	Adenosintriphosphat
1,3-BPG	1,3-Bisphosphoglycerat
BZR	Belousov-Zhabotinsky-Reaktion
cADPR	cyklische Adenosindiphosphatribose
CIMR	Chlorid-Iodid-Malonsäure
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DPI	Diphenyleneiodonium
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBA	Fructosebisphosphataldolase
FBP	Fructose-1,6-bisphosphat
FMLP	N-formyl-MET-LEU-PHE
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glucosetransporter
GTP	Guaninnucleotid
G6P	Glucose-6-Phosphat
G6PDase	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GPI	Glucose-6-Phosphat-Isomerase
HK	Hexokinase
HMS	Pentosephosphatweg (engl. Hexose-Monophosphate-Shunt)
IL-1	Interleukin-1
IP ₃	Inositoltriphosphat
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAD(P)H	Summe aus NADH und NAD(P)H
ODE	Gewöhnliche Differentialgleichung (engl. ordinary differential equation)
PDE	Partielle Differentialgleichung (engl. partial differential equation)
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFK	Phosphofruktokinase

2-PGA	2-Phosphoglycerat
3-PGA	3-Phosphoglycerat
PO	Peroxidase-Oxidase
5PR	Ribulose-5-Phosphat
RNS	Reaktive Stickstoffintermediate
ROS	Reaktive Sauerstoffintermediate
RyR	Ryanodinrezeptor
SERCA	Sarco/Endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase
TALase	Transaldolase
TIM	Phosphotrioseisomerase
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

Literaturverzeichnis

- [1] A. K. Abbas, A. H. Lichtman und S. Pilai. *Cellular and molecular immunology*. Saunders, 2007.
- [2] Y. Adachi, A. L. Kindzelskii, G. Cookingham, S. Shaya, E. C. Moore, R. F. Todd und H. R. Petty. “Aberrant neutrophil trafficking and metabolic oscillations in severe pyoderma gangrenosum”. *Journal of Investigative Dermatology*, Bd. 111(2), S. 259–268, 1998.
- [3] Y. Adachi, A. L. Kindzelskii, N. Ohno, T. Yadomae und H. R. Petty. “Amplitude and frequency modulation of metabolic signals in leukocytes: Synergistic role of IFN- γ in IL-6- and IL-2-mediated cell activation”. *Journal of Immunology*, Bd. 163, S. 4367–4374, 1999.
- [4] K. I. Agladze, V. I. Krinsky, A. V. Panfilov, H. Linde und L. Kuhnert. “Three-dimensional vortex with a spiral filament in a chemically active medium”. *Physica D (Amsterdam)*, Bd. 39, S. 38–42, 1989.
- [5] N. Ahmed, M. Kansara und V. Berridge. “Acute regulation of glucose transport in a monocyte-macrophage cell line: GLUT-3 affinity for glucose is enhanced during the respiratory burst”. *Biochemical Journal*, Bd. 327, S. 369–375, 1997.
- [6] K. E. O. Akerman, M. O. Proudlove und A. L. Moore. “Evidence for a Ca^{2+} gradient across the plasma membrane of wheat protoplasts”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Bd. 113(1), S. 171–177, 1983.
- [7] B. Alberts, D. Bray und K. Hopkin. *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. Wiley-VCH Verlag, 2005.
- [8] E. Albrecht, A. L. Kindzelskii und H. R. Petty. “Signal processing times in neutrophil activation: dependence on ligand concentration and the relative phase of metabolic oscillations”. *Biophysical Chemistry*, Bd. 106(3), S. 211–219, 2003.

- [9] P. W. Atkins. *Physical chemistry*. Oxford University Press, vierte Ausg., 1990.
- [10] B. Aulbach. *Gewöhnliche Differentialgleichungen*. Elsevier, München, 2004.
- [11] G. Avigad. “Stimulation of yeast phosphofructokinase activity by fructose-2,6-bisphosphate”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Bd. 102, S. 985–991, 1981.
- [12] B. M. Bablor, J. D. Lambeth und W. Nauseef. “The neutrophil NADPH oxidase”. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Bd. 397(2), S. 342–344, 2002.
- [13] P. Ball. *The self made tapestry: Pattern formation in nature*. Oxford University Press, Oxford, UK, 2001.
- [14] M. Bär. *Complex patterns in reaction-diffusion-systems*. Habilitationsschrift, Technische Universität Dresden, 2001.
- [15] M. Bär, M. Eiswirth, H. H. Rotermund und G. Ertl. “Solitary-wave phenomena in an excitable surface reaction”. *Physical Review Letters*, Bd. 69(6), S. 945–948, 1992.
- [16] A. N. Barclay. “Membrane proteins with immunoglobulin-like domains—a master superfamily of interaction molecules”. *Seminars in Immunology*, Bd. 15(4), S. 215–223, 2003.
- [17] E. Ben-Jacob, I. Cohen und H. Levine. “Cooperative self-organization of microorganism”. *Advances in Physics*, Bd. 49, S. 395–554, 2000.
- [18] M. J. Berridge und A. Galione. “Cytosolic calcium oscillators”. *FASEB Journal*, Bd. 2, S. 3074–3082, 1988.
- [19] H. Bisswanger. *Enzyme kinetics*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2002.
- [20] H. G. Bock. *Randwertproblemmethoden zur Parameteridentifizierung in Systemen nichtlinearer Differentialgleichungen*. Doktorarbeit, Bonner Mathematische Schriften, Universität Bonn, 1987.
- [21] H. G. Bock. *Numerische Mathematik 1*. Vorlesungsskript, Universität Heidelberg, 2002.
- [22] H. G. Bock und K. J. Plitt. “A multiple shooting algorithm for direct solution of optimal control problems”. In “Proceedings of the Ninth IFAC World Congress, Budapest”, Pergamon, Oxford, 1984.

- [23] E. O. Budrene und H. C. Berg. “Dynamics of formation of symmetrical patterns by chemotactic bacteria”. *Nature*, Bd. 376, S. 49–53, 1995.
- [24] N. D. Burg und M. H. Pillinger. “The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity”. *Clinical Immunology*, Bd. 99, S. 7–17, 2001.
- [25] M. A. Cassatella. “The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils”. *Immunology Today*, Bd. 16, S. 21–26, 1995.
- [26] V. Castets, E. Dulos, J. Boissonade und P. de Kepper. “Experimental evidence of a sustained standing Turing-type nonequilibrium chemical pattern”. *Physical Review Letters*, Bd. 64, S. 2953–2956, 1990.
- [27] E. J. Crampin, S. Schnell und P. E. McSharry. “Mathematical and computational techniques to deduce complex biochemical reaction mechanism”. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Bd. 86, S. 77–112, 2004.
- [28] M. C. Cross und P. C. Hohenberg. “Pattern formation outside of equilibrium”. *Reviews of Modern Physics*, Bd. 65(3), S. 851–1112, 1993.
- [29] C. F. Curtiss und J. O. Hirschfelder. “Integration of stiff equations”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 38, S. 235–243, 1952.
- [30] G. G. Dahlquist. “A special stability problem for linear multistep methods”. *BIT*, Bd. 3, S. 27–43, 1963.
- [31] E. V. Davies, A. K. Campell und M. B. Hallett. “Ca²⁺ oscillations in neutrophils triggered by immune complexes result from Ca²⁺ influx”. *Immunology*, Bd. 82, S. 57–62, 1994.
- [32] P. Deuffhard und F. Bornemann. *Numerische Mathematik 2. Gewöhnliche Differentialgleichungen*. De Gruyter, Berlin, 2002.
- [33] P. Deuffhard und U. Nowak. “Extrapolation integrators for quasilinear implicit ODE’s”. In “Large Scale Scientific Computing”, S. 37–50. Birkhäuser, Boston, Basel, Stuttgart, P. Deuffhard, B. Engquist (Ed.), 1987. URL <ftp://elib.zib.de/pub/elib/codelib/limex>.
- [34] M. U. Ehrenguber, P. Boquet, T. D. Coates und D. A. Deranleau. “ADP-ribosylation of Rho enhances actin polymerization-coupled shape oscillations in human neutrophils”. *FEBS Letters*, Bd. 372, S. 161–164, 1995.

- [35] M. U. Ehrenguber, D. A. Deranleau und T. D. Coates. "Shape oscillations: a fundamental response of human neutrophils stimulated by chemotactic peptides?" *FEBS Letters*, Bd. 359, S. 229–232, 1995.
- [36] M. U. Ehrenguber, D. A. Deranleau und T. D. Coates. "Shape oscillations of human neutrophil leukocytes: Characterization and relationship to cell motility". *Journal of Experimental Biology*, Bd. 199, S. 741–747, 1996.
- [37] G. Ertl. "Oscillatory kinetics and spatiotemporal self-organization in reactions at solid surfaces". *Science*, Bd. 254, S. 1750–1755, 1991.
- [38] C. P. Fall, E. S. Marland und J. M. Wagner. *Computational cell biology*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 2002.
- [39] M. Fehr, S. Lalonde, I. Lager, M. W. Wolff und W. B. Frommer. "In vivo imaging of the dynamics of glucose uptake in the cytosol of COS-7 cells by fluorescent nanosensors". *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 278, S. 19127–19133, 2003.
- [40] R. J. Field, R. M. Noyes und E. Körös. "Oscillations in chemical systems 2: Thorough analysis of temporal oscillations in Bromate-Cerium-Malonic acid system". *Journal of the American Chemical Society*, Bd. 94, S. 8649–8664, 1972.
- [41] R. FitzHugh. "Impulses and physiological states in theoretical models of nerve membrane". *Biophysical Journal*, Bd. 1, S. 445–466, 1961.
- [42] A. Galione und G. C. Churchill. "Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores". *Cell Calcium*, Bd. 32(5-6), S. 343–354, 2002.
- [43] J. I. Gallin. "The Neutrophil". In "Immunological Diseases", S. 737–788. Little, Brown and Co., Boston, MA, USA, M. Samter and D.W. Talmage and M.M Frank and K.F. Austen and H.N. Claman (Ed.), 1988.
- [44] GASCOIGNE. A C++ numerics library for scientific computing, <http://www.gascoigne.de/>.
- [45] G. Gerisch. "Periodische Signale steuern die Musterbildung in Zellverbänden". *Naturwissenschaften*, Bd. 58, S. 430–438, 1971.
- [46] A. Gierer und H. Meinhardt. "Theory of biological pattern formation". *Kybernetik*, Bd. 12, S. 30–39, 1972.

- [47] A. Goldbeter. *Biochemical oscillations and cellular rhythms: the molecular bases of periodic and chaotic behavior*. Cambridge University Press, Cambridge, 1996.
- [48] A. Goldbeter. *Biochemical oscillations and cellular rhythms: The molecular bases of periodic and chaotic behaviour*. Cambridge University Press, Cambridge, 1996.
- [49] G. Guriya, A. Kiyatkin und S. Müller. “Splitting of the autowave in the Belousov-Zhabotinsky chemical system”. *Biofizika*, Bd. 38, S. 461–465, 1993.
- [50] S. P. Han. “Superlinearly convergent variable-metric algorithms for general nonlinear programming problems”. *Mathematical Programming*, Bd. 11, S. 263–282, 1976.
- [51] P. E. Hardin, J. C. Hall und M. Rosbash. “Feedback of *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels”. *Nature*, Bd. 343, S. 536–540, 1990.
- [52] M. Hermann. *Numerik gewöhnlicher Differentialgleichungen. Anfangs- und Randwertprobleme*. Oldenburg, München, 2004.
- [53] B. Hess und A. Boiteux. “Oscillatory phenomena in biochemistry”. *Annual Review in Biochemistry*, Bd. 40, S. 237–258, 1971.
- [54] E. J. Hillson und M. B. Hallett. “Localised and rapid Ca²⁺ micro-events in human neutrophils: Conventional Ca²⁺ puffs and global waves without peripheral-restriction or wave cycling”. *Cell Calcium*, Bd. 41, S. 525–536, 2007.
- [55] A. L. Hodgkin und A. F. Huxley. “A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve”. *Journal of Physiology*, Bd. 117, S. 500–544, 1952.
- [56] J.-H. Hofmeyr und A. Cornish-Bowden. “The reversible Hill equation: how to incorporate cooperative enzymes into metabolic models”. *Computer Applications in the Biosciences*, Bd. 13, S. 377–385, 1997.
- [57] A. V. Holden, M. Markus und H. G. Othmer, (Ed.). *Nonlinear wave processes in excitable media*. Plenum Press, New York, 1991.
- [58] J.-B. Huang, J. Espinoza, R. Romero und H. R. Petty. “Transaldolase ist part of a supramolecular complex containing glucose-6-phosphate

- dehydrogenase in human neutrophils that undergoes retrograde trafficking during pregnancy". *Metabolism Clinical and Experimental*, Bd. 54, S. 1027–1033, 2005.
- [59] J.-B. Huang, A. L. Kindzelskii und H. R. Petty. "Hexokinase translocation during neutrophil activation, chemotaxis, and phagocytosis: disruption by cytochalasin D, dexamethasone, and indomethacin". *Cellular Immunology*, Bd. 218, S. 95–106, 2002.
- [60] T. E. Hugli. "Chemotaxis". *Current Opinion in Immunology*, Bd. 2, S. 19–27, 1989.
- [61] R. Imbühl und G. Ertl. "Oscillatory kinetics in heterogeneous Catalysis". *Chemical Reviews*, Bd. 95, S. 697–733, 1995.
- [62] F. Ismail-Beigi. "Metabolic regulation of glucose transport". *Journal of Membrane Biology*, Bd. 135, S. 1–10, 1993.
- [63] R. Jacob. "Imaging cytoplasmic free calcium in histamine stimulated endothelial cells and in fMet-Leu-Phe stimulated neutrophils". *Cell Calcium*, Bd. 11, S. 241–249, 1990.
- [64] M. E. E. Jaconi, R. W. Rives, W. Schlegel, C. B. Wollheim, D. Pittet und P. D. Lew. "Spontaneous and chemoattractant-induced oscillations of cytosolic adherent human neutrophils". *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 263(22), S. 10 557–10 560, 1988.
- [65] U. Jäger, H. Gruler und B. Bültmann. "Morphological changes and membrane potential of human granulocytes under influence of chemotactic peptide and/or Echo-Virus, Type 9". *Journal of Molecular Medicine*, Bd. 66, S. 434–436, 1988.
- [66] C. Janeway. *Immunobiology*. Garland Science, 6. Ausg., 2004.
- [67] R. Kapral und K. Showalter, (Ed.). *Chemical waves and patterns*. Kluwer, Dordrecht, 1994.
- [68] J. Keener und J. Sneyd. *Mathematical physiology*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 1998.
- [69] A. L. Kindzelskii, A. J. Clark, J. Espinoza, N. Maeda, Y. Aratani, R. Romero und H. R. Petty. "Myeloperoxidase accumulates at the neutrophil surface and enhances cell metabolism and oxidant release during pregnancy". *European Journal of Immunology*, Bd. 36, S. 1–10, 2006.

- [70] A. L. Kindzelskii, V. M. Elner, S. G. Elner, D. Yang, B. A. Hughes und H. R. Petty. “Human, but not bovine, photoreceptor outer segments prime human retinal pigment epithelial cells for metabolic activation and massive oxidant release in response to lipopolysaccharide and interferon- γ ”. *Experimental Eye Research*, Bd. 79, S. 431–435, 2004.
- [71] A. L. Kindzelskii, J. B. Huang, T. Chaiworapongsa, R. M. Fahmy, Y. M. Kim, R. Romero und H. R. Petty. “Pregnancy alters glucose-6-phosphate dehydrogenase trafficking, cell metabolism, and oxidant release of maternal neutrophils”. *Journal of Clinical Investigation*, Bd. 110(12), S. 1801–1811, 2002.
- [72] A. L. Kindzelskii und H. R. Petty. “Apparent role of traveling metabolic waves in oxidant release by living neutrophils”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 99(14), S. 9207–9212, 2002.
- [73] A. L. Kindzelskii und H. R. Petty. “Intracellular calcium waves accompany neutrophil polarization, formylmethionylleucylphenylalanine stimulation, and phagocytosis: A high speed microscopy study”. *Journal of Immunology*, Bd. 170, S. 64–72, 2003.
- [74] A. L. Kindzelskii und H. R. Petty. “Ion channel clustering enhances weak electric field detection by neutrophils: apparent roles of SKF96365-sensitive cation channels and myeloperoxidase trafficking in cellular responses”. *European Biophysical Journal*, Bd. 35(1), S. 1–26, 2005.
- [75] H. Kitano. “Computational systems biology”. *Nature*, Bd. 420, S. 206–210, 2002.
- [76] H. Kitano. “Systems biology: a brief overview”. *Science*, Bd. 295, S. 1662–1664, 2002.
- [77] P. Knabner und L. Angermann. *Numerik partieller Differentialgleichungen*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 2002.
- [78] U. Kummer, J. Zobeley, J. C. Brasen, R. Fahmy, A. L. Kindzelskii, A. R. Petty, A. J. Clark und H. R. Petty. “Elevated glucose concentration promote receptor-independent activation of adherent human neutrophils: An experimental and computational approach”. *Biophysical Journal*, Bd. 92, S. 2597–2607, 2007.

- [79] Y. A. Kuznetsov. *Elements of applied bifurcation theory*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 2004.
- [80] D. Lebiedz und U. Brandt-Pollmann. “Manipulation of self aggregation patterns and waves in a reaction-diffusion-system by optimal boundary control strategies”. *Physical Review Letters*, Bd. 91, p. 208 301, 2003.
- [81] D. Lebiedz und U. Brandt-Pollmann. “Dynamic control and signal processing in chemical reaction systems by tuning self-organization behaviour”. *Chaos*, Bd. 14, S. 611–616, 2004.
- [82] D. Lebiedz und H. Maurer. “External optimal control of self-organization dynamics in a chemotaxis reaction diffusion system”. *Systems Biology*, Bd. 2, S. 222–229, 2004.
- [83] D. Lebiedz, S. Sager, H. G. Bock und P. Lebiedz. “Annihilation of limit cycle oscillations by identification of critical phase resetting stimuli via mixed-integer optimal control methods”. *Physical Review Letters*, Bd. 95, S. 108 303 (1–4), 2005.
- [84] J. Lechleiter, S. Girard, E. Peralta und D. Clapham. “Spiral calcium wave propagation and annihilation in *Xenopus laevis* oocytes”. *Science*, Bd. 252, S. 123–126, 1992.
- [85] B. Lederer, S. Vissers, E. van Schafting und H.-G. Hers. “Fructose-2,6-bisphosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Bd. 103, S. 1281–1287, 1981.
- [86] H. C. Lee. “Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP”. *Physiological Reviews*, Bd. 77(4), S. 1133–1164, 1997.
- [87] H. C. Lee. *Cyclic ADP-Ribose and NAADP*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 2002.
- [88] D. B. Leineweber. *Theory of MUSCOD in a nutshell*. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, 1995.
- [89] D. P. Lew. “Receptor signalling and intracellular calcium in neutrophil activation”. *European Journal of Clinical Investigation*, Bd. 19, S. 338–346, 1989.
- [90] D. P. Lew, T. Andersson, J. Hed, F. D. Virgilio, T. Pozzan und O. Stendahl. “Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent phagocytosis in human neutrophils”. *Nature*, Bd. 315, S. 509–511, 1985.

- [91] Y.-X. Li und J. Rinzel. “Equations for InsP₃ receptor-mediated $[Ca^{2+}]_i$ oscillations derived from a detailed kinetic model: A Hodgkin-Huxley like formalism”. *Journal of Theoretical Biology*, Bd. 166, S. 461–473, 1994.
- [92] H. Linde und H. Engel. “Autowave propagation in heterogeneous active media”. *Physica D (Amsterdam)*, Bd. 49, S. 13–20, 1991.
- [93] G. Löffler, P. E. Petrides und P. C. Heinrich. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 2006.
- [94] V. M. Loitto. *Towards a refined model of neutrophil motility*. 670, PhD-Thesis, University of Linköping, Linköping, Sweden, 2001.
- [95] K. Luby-Phelps. “Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: Volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area”. *International Review of Cytology*, Bd. 192, p. 189, 2000.
- [96] T. Mair und S. C. Müller. “Traveling NADH and proton waves during oscillatory glycolysis in vitro”. *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 271(2), S. 627–630, 1996.
- [97] T. Maraldi, M. Rugolo, D. Fiorentini, L. Lundi und G. Hakim. “Glucose transport activation in human hematopoietic cells M07e is modulated by cytosolic calcium and calmodulin”. *Cell Calcium*, Bd. 40, S. 373–381, 2006.
- [98] MATLAB®. The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA <http://www.mathworks.com>.
- [99] T. B. McCall, N. K. Boughton-Smith, R. M. Palmer, B. J. Whittle und S. Moncada. “Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion”. *Biochemical Journal*, Bd. 261, S. 293–296, 1989.
- [100] H. Meinhardt. *Models of biological pattern formation*. Academic Press, London, 1982.
- [101] L. Michaelis und M. L. Menten. “Die Kinetik der Invertinwirkung”. *Biochemische Zeitschrift*, Bd. 49, S. 333–369, 1913.
- [102] M. Mimura, M. Nagayama und T. Ohta. “Non-annihilation of travelling pulses in a reaction-diffusion system”. *Methods and Applications of Analysis*, Bd. 9(4), S. 493–516, 2002.

- [103] Y. Mitani, A. Behrooz, G. R. Dubyak und F. Ismail-Beigi. “Stimulation of GLUT-1 glucose transporter expression in response to exposure to calcium ionophore A-23187”. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, Bd. 269(5 Pt 1), S. C1228–C1234, 1995.
- [104] J. Monod, J. Wyman und J.-P. Changeux. “On the nature of allosteric transition: a plausible model”. *Journal of Molecular Biology*, Bd. 12, S. 88–118, 1965.
- [105] P. J. Mulquiney und P. W. Kuchel. “Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations: equations and parameter refinement”. *Biochemical Journal*, Bd. 342, S. 581–596, 1999.
- [106] A. P. Munuzuri, V. Perez-Villar und M. Markus. “Splitting of auto-waves in an active medium”. *Physical Review Letters*, Bd. 79(10), S. 1941–1944, 1997.
- [107] J. D. Murray. *Mathematical biology I*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 2002.
- [108] J. D. Murray. *Mathematical biology II*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 2003.
- [109] G. Nicolis. *Introduction to nonlinear science*. Cambridge University Press, Cambridge, 1997.
- [110] G. Nicolis und I. Prigogine. *Self-organization in nonequilibrium systems*. Wiley, New York, 1977.
- [111] G. Nicolis und I. Prigogine. *Exploring Complexity*. Freeman, New York, 1989.
- [112] K. Nielsen, P. G. Sorensen, F. Hynne und H. G. Busse. “Sustained oscillations in glycolysis: an experimental and theoretical study of chaotic and complex periodic behavior and of quenching of simple oscillations”. *Biophysical Chemistry*, Bd. 72, S. 49–62, 1998.
- [113] L. Nocedal und S. J. Wright. *Numerical optimization*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 1999.
- [114] J. T. O’Flaherty, S. Cousart, C. L. Swendsen, L. R. DeChatelet, D. A. Bass., S. H. Love und C. E. McCall. “Role of Ca²⁺ and Mg²⁺ in neutrophil hexose transport”. *Biochimica et Biophysica Acta*, Bd. 640, S. 223–30, 1981.

- [115] Y. Okuno und J. Gliemann. “Effect of chemotactic factors on hexose transport in polymorphonuclear leucocytes”. *Biochimica et Biophysica Acta*, Bd. 941, S. 157–164, 1988.
- [116] L. F. Olsen, U. Kummer, A. L. Kindzelskii und H. R. Petty. “A model of the oscillatory metabolism of activated neutrophils”. *Biophysical Journal*, Bd. 84(1), S. 69–81, 2003.
- [117] G. M. Omann, M. M. Porasik und L. A. Skalar. “Oscillating actin polymerization/depolymerization responses in human polymorphonuclear leukocytes”. *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 264(28), S. 16 355–16 358, 1989.
- [118] S. Partida-Sanchez, A. Gasser, R. Fliegert, C. C. Siebrands, W. Dammernann, G. Shi, B. J. Mousseau, A. Sumoza-Toledo, H. Bhagat, T. F. Walseth, A. H. Guse und F. E. Lund. “Chemotaxis of mouse bone marrow neutrophils and dendritic cells is controlled by adp-ribose, the major product generated by the CD38 enzyme reaction”. *Journal of Immunology*, Bd. 179(11), S. 7827–7839, 2007.
- [119] V. Petrov, S. K. Scott und K. Showalter. “Excitability, wave reflection, and wave splitting in a cubic autocatalysis reaction-diffusion system”. *Philosophical Transactions: Physical Sciences and Engineering*, Bd. 347(1685), S. 631–642, 1994.
- [120] H. R. Petty. “Oscillatory signals in migrating neutrophils: effects of time-varying chemical and electric fields”. In “Self-Organized Biological Dynamics & Nonlinear Control”, S. 173–192. Cambridge: Cambridge University Press, J. Walleczek (Ed.), 2000.
- [121] H. R. Petty. “Neutrophil oscillations: temporal and spatiotemporal aspects of cell behavior”. *Immunologic Research*, Bd. 23, S. 85–94, 2001.
- [122] H. R. Petty. “Applications of high speed microscopy in biomedical research”. *Optics & Photonics News*, January 2004.
- [123] H. R. Petty. “Spatiotemporal chemical dynamics in living cells: From information trafficking to cell physiology”. *BioSystems*, Bd. 83, S. 217–224, 2006.
- [124] H. R. Petty und A. L. Kindzelskii. “High-Speed imaging of sustained metabolic target patterns in living neutrophils during adherence”. *The Journal of Physical Chemistry B*, Bd. 104, S. 10 952–10 955, 2000.

- [125] H. R. Petty und A. L. Kindzelskii. “Dissipative metabolic patterns respond during neutrophil transmembrane signaling”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 98(6), S. 3145–3149, 2001.
- [126] H. R. Petty, R. G. Worth und A. L. Kindzelskii. “Imaging sustained dissipative patterns in the metabolism of individuell living cells”. *Physical Review Letters*, Bd. 84(12), S. 2754–2757, 2000.
- [127] M. J. D. Powell. “A fast algorithm for nonlinearly constrained optimization calculations”. In “Lecture Notes in Mathematics”, *Springer, New York, Berlin, Heidelberg*, Bd. 630, S. 144–157. G.A. Watson (Ed.), 1978.
- [128] I. Prigogine und R. Lefever. “Symmetry breaking instabilities in dissipative systems”. *Journal of Chemical Physics*, Bd. 48(4), S. 1695–1700, 1968.
- [129] R. A. Quintanilla, O. H. Porras, J. Castro und L. F. Barros. “Cytosolic [Ca(2+)] modulates basal GLUT1 activity and plays a permissive role in its activation by metabolic stress and insulin in rat epithelial cells”. *Cell Calcium*, Bd. 28(2), S. 97–105, 2000.
- [130] R. Rannacher. “Adaptive Galerkin finite element methods for partial differential equations”. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, Bd. 128, S. 169–178, 2001.
- [131] R. Rannacher. *Numerik 2: Numerik partieller Differentialgleichungen*. Vorlesungsskript, Universität Heidelberg, 2004.
- [132] C. Reble. *Experimental and theoretical investigations of dissipative structures in living human immune cells*. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, 2007.
- [133] R. Rengan und G. M. Omann. “Regulation of oscillations in filamentous actin content in polymorphonuclear leukocytes stimulated with leukotriene B₄ and platelet-activating factor”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Bd. 262, S. 479–486, 1999.
- [134] D. Roos und A. J. M. Balm. “The oxidative metabolism of monocytes”. In “The reticuloendothelial system: a comprehensive treatise”, S. 189–229. Plenum Press, New York, New York, USA, A. J. Sbarra, R. R. Strauss (Ed.), 1980.

- [135] A. J. Rosenspire, A. L. Kindzelskii und H. R. Petty. “Interferon- γ and sinusoidal electric fields signal by modulating NAD(P)H oscillations in polarized neutrophils”. *Biophysical Journal*, Bd. 79, S. 3001–3008, 2000.
- [136] C. Rossman und H. G. Roos. *Numerik partieller Differentialgleichungen*. Teubner-Verlag, Stuttgart, 1994.
- [137] H. H. Rotermund, S. Jakubith, A. von Oertzen und G. Ertl. “Solitons in a surface reaction”. *Physical Review Letters*, Bd. 66(23), S. 3083–3086, 1991.
- [138] J. S. Rotnes und J. A. Rottingen. “Quantitative analysis of cytosolic free calcium oscillations in neutrophils by mathematical modelling”. *Cell Calcium*, Bd. 15, S. 467–482, 1994.
- [139] F. Sagues und I. R. Epstein. “Nonlinear chemical dynamics”. *Dalton Transactions*, Bd. 7, S. 1201–1217, 2003.
- [140] F. Sanchez-Madrid und M. A. del Pozo. “Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions”. *EMBO Journal*, Bd. 18, S. 501–511, 1999.
- [141] A. J. Sbarra und M. L. Karnovsky. “The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear neutrophils”. *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 234, S. 1355–1362, 1959.
- [142] E. Schroedinger. *What is life ?* Cambridge University Press, Cambridge, 1944.
- [143] D. P. Schuster, S. L. Brody, Z. Zhou, M. Bernstein, R. Arch, D. Link und M. Mueckler. “Regulation of lipopolysaccharide-induced increases in neutrophil glucose uptake”. *American Journal of Physiology. Lung cellular and molecular Physiology*, Bd. 292, S. L845–L851, 2007.
- [144] F. Schuster und F. E. Lund. “Structure and enzymology of ADP-ribosyl cyclases: conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites”. *Current Molecular Medicine*, Bd. 4, S. 249–261, 2004.
- [145] A. W. Segal und K. P. Shatwell. “The NADPH oxidase of phagocytic leukocytes”. In “Phagocytes: Biology, Physiology, Pathology and Pharmacotherapeutics”, S. 215–222. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, R. Paoletti, A. Notario, G. Ricevuti (Ed.), 1998.

- [146] H. Sevcikova, M. Marek und S. C. Müller. “The reversal and splitting of waves in an excitable medium caused by an electric field”. *Science*, Bd. 257, S. 951–954, 1992.
- [147] O. S. Shaik, S. Sager, O. Slaby und D. Lebiedz. “Phase tracking and restoration of circadian rhythms by model-based optimal control”. *IET Systems Biology*, Bd. 2(1), S. 16–23, 2008.
- [148] M. P. Sheetz, D. Felsenfeld, C. G. Galbraith und D. Choquetz. “Cell migration as a five-step cycle”. *Biochemical Society Symposium*, Bd. 65, S. 233–243, 1999.
- [149] J. Siehr. *Targeting specific properties of reaction diffusion waves by numerical optimization of external forcing parameters*. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, 2007.
- [150] J. Siehr, M. Mommer, O. Slaby und D. Lebiedz. “Targeting characteristic wave properties in reaction diffusion systems by optimization of external forcing”. *Physical Review E*, Bd. 76, S. 056 211 (1–7), 2007.
- [151] O. Slaby. *Einsatz numerischer Verfahren zur Modellierung, Simulation and optimalen Steuerung metabolischer Oszillationen und Wellen in Zellen des Immunsystems*. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, 2006.
- [152] O. Slaby und D. Lebiedz. “NAD(P)H waves and calcium oscillations in neutrophils? A modeling study of feasibility. (submitted)”.
- [153] O. Slaby, S. Sager, O. S. Shaik, U. Kummer und D. Lebiedz. “Optimal control of self-organized dynamics in cellular signal transduction”. *Mathematical and Computer Modelling of Dynamical Systems*, Bd. 13(5), S. 487–502, 2007.
- [154] J. A. Smith. “Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword”. *Journal of Leukocyte Biology*, Bd. 56, S. 672–686, 1994.
- [155] J. Smoller. *Shock waves and reaction-diffusion equations*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 1983.
- [156] J. Sneyd und J. Sherratt. “On the propagation of calcium waves in an inhomogeneous medium”. *SIAM Journal of Applied Mathematics*, Bd. 57(1), S. 73–94, 1997.
- [157] J. Stoer und R. Bulirsch. *Numerische Mathematik 2*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2000.

- [158] W. R. Strauss. *Partial differential equations: An introduction*. John Wiley, 1992.
- [159] S. H. Strogatz. *Nonlinear dynamics and chaos*. Perseus Publishing Cambridge, 1994.
- [160] L. Stryer. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2003.
- [161] A. S. Tan, N. Ahmed und M. V. Berridge. “Acute regulation of glucose transport after activation of human peripheral blood neutrophils by phorbol myristate acetate, fMLP, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”. *Blood*, Bd. 91(2), S. 649–655, 1998.
- [162] A. P. Thomas, G. S. J. Bird, G. Hajnoczky, L. D. Robb-Gaspers und J. W. Putney(Jr.). “Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling”. *FASEB Journal*, Bd. 10(13), S. 1505–1517, 1996.
- [163] A. M. Turing. “The chemical basis of morphogenesis”. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, Bd. 237, S. 37–72, 1952.
- [164] J. J. Tyson und J. P. Keener. “Singular perturbation theory of traveling waves in excitable media (A Review)”. *Physica D*, Bd. 32, S. 327–361, 1988.
- [165] E. Vinuela, M. L. Salas und A. Sols. “End-product inhibition of yeast phosphofructokinase by ATP”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Bd. 12, S. 140–145, 1963.
- [166] VisuSimple. An interactive visualization program for 2D- and 3D-data, <http://dunne.uni-hd.de/VisuSimple/>.
- [167] D. Voet, J. G. Voet und C. W. Pratt. *Lehrbuch der Biochemie*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2002.
- [168] W. Walter. *Gewöhnliche Differentialgleichungen*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2000.
- [169] S. J. Weiss. “Tissue destruction by neutrophils”. *The New England Journal of Medicine*, Bd. 320, S. 365–376, 1989.
- [170] P. O. Westermark und A. Lansner. “A Model of phosphofructokinase and glycolytic oscillations in the pancreatic β -cells”. *Biophysical Journal*, Bd. 85, S. 126–139, 2003.

- [171] O. B. Widlund. “A note on unconditionally stable linear multistep methods”. *BIT*, Bd. 3, S. 65–70, 1967.
- [172] N. Wiener und A. Rosenblueth. “The mathematical formulation of the problem of conduction of impulses in a network of connected excitable elements, specifically in the cardiac muscle”. *Archivos del Instituto de Cardiologia de Mexico, Mexico*, Bd. 16, S. 205–265, 1946.
- [173] S. Wiggins. *Introduction to applied nonlinear dynamical systems and chaos*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 1996.
- [174] P. C. Wilkinson. *Chemotaxis and inflammation*. Churchill Livingstone Inc, New York, zweite Ausg., 1982.
- [175] A. Winfree. *The geometry of biological time*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 2001.
- [176] M. P. Wymann, P. Kernen, T. Bengtsson, T. Undersson, M. Baggiolini und D. A. Deranleau. “Corresponding oscillations in neutrophil shape and filamentous actin content”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Bd. 265(2), S. 619–622, 1990.
- [177] M. P. Wymann, P. Kernen, D. A. Deranleau und M. Baggiolini. “Respiratory burst oscillations in human neutrophils and their correlation with fluctuations in apperent cell shape”. *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 264(27), S. 15 829–15 834, 1989.
- [178] G. W. D. Young und J. Keizer. “A single-pool inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in Ca^{2+} concentration”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 89, S. 9895–9899, 1992.
- [179] A. M. Zhabotinsky. “Periodical oxidation of malonic acid in solution (a study of the Belousov reaction kinetics)”. *Biofizika*, Bd. 9, S. 306–311, 1964.
- [180] S. H. Zigmond. “Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors”. *Journal of Cell Biology*, Bd. 75, S. 606–616, 1977.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Einsatz von Methoden des Wissenschaftlichen Rechnens zur Untersuchung dissipativer Strukturen in Immunzellen“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Freiburg, den 22.07.2008

Oliver Slaby