

Eberhard Karls Universität Tübingen
Fakultät für Informations- und Kognitionswissenschaften
Wilhelm-Schickard-Institut
Arbeitsbereich: Rechnerarchitektur

Seminar
Inferenz regulatorischer und metabolischer Netze
in der Systembiologie

**Thema: Modeling networks with differential
equations**

Manuela Müller

*Zusammenfassung: Das Thema umfasst die Möglichkeit der Simulation von Stoffwechselfvorgängen durch Differentialgleichungen. Dafür wird einleitend die graphische Darstellung von biologischen Metabolismen durch sogenannte Prozessdiagramme vorgestellt, als mögliche Grundlage für Simulationen mit dem Computer. Mathematische Grundlagen sollen das Verständnis für solche Modelle fördern und bilden somit die Basis weiterer Anwendungen. Anhand zwei bereits durchgeführter Simulationen wird die Vorgehensweise solcher Verfahren vorgestellt. Die Komplexität des Problems zeigen die Ergebnisse in beiden Beispielen. Im ersten Versuch wird die Glykolyse und der Pentose-Phosphat-Weg beim *E. coli* simuliert, der zweite simuliert die osmotische Regulation bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.*

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	3
2	Prozessdiagramme zur graphischen Darstellung von biologischen Stoffwechselfvorgängen	3
2.1	Reduktion TypI	4
2.2	Reduktion TypII	4
3	Kinetische Modellierung	5
3.1	Michaelis-Menten-Kinetik	8
3.2	Gewöhnliche Differentialgleichungen	10
4	Simulation: Glykolyse und Pentose-Phosphat-Weg in <i>E. coli</i>	11
4.1	Modell des Stoffwechsels	11
4.2	Durchführung der Simulation	13
4.3	Ergebnisse und Diskussion	15
5	Simulation: Osmoseregulation in Hefe	16
5.1	Modell der Osmoseregulation	16
5.2	Durchführung der Simulation	19
5.3	Ergebnisse und Diskussion	19
6	Zusammenfassung	21

1 Einführung

Die Möglichkeit, biologische Prozesse zu visualisieren und zu simulieren, tritt durch die heutige Technik und die damit verbundenen Rechenleistungen immer mehr in den Vordergrund. Zwangsläufig müssen einheitliche Methoden erschaffen werden, Metabolismen vollständig zu beschreiben und deren Genauigkeit für eine Simulation zu garantieren. Dies gestattet nicht nur die spezifische Darstellung einer Reaktion für den Anwender, sondern auch die präzise Berechnung des Computers für einen Stoffwechsel und deren jeweilige Auswirkungen. Damit sollen in Zukunft Simulationen stattfinden, die aufwändige und kostspielige Versuchsreihen ersetzen können. Dafür müssen jedoch sowohl einzelne Reaktionsschritte als auch die jeweiligen Zusammenhänge im Ganzen studiert werden, um diese präzise durch einen Computer ersetzen zu können.

2 Prozessdiagramme zur graphischen Darstellung von biologischen Stoffwechselfvorgängen

Prozessdiagramme stellen eine Variante dar, biologische Stoffwechselfvorgänge am Computer mit der gewünschten Feinheit darzustellen. Durch eine unterschiedliche Einstellungsauswahl lassen sich Metabolismen in verschiedenener Genauigkeit beschreiben. Grundsätzlich wird so ein Prozessdiagramm durch Knoten und Kanten repräsentiert. Zustandsknoten (engl. *state node*, Abb. 1), repräsentieren den Zustand der biologischen Einheit und werden durch verschiedene geometrische Formen dargestellt. So wird unterscheiden zwischen einfachen oder unbekanntem Molekülen, Proteinen, Rezeptoren, Ionenkanälen, und den genetischen Einheiten: Gene, RNA und Phenotypen. Diese spielen eine wesentliche Rolle in Stoffwechselabläufen und können sowohl aktiv sein, im Falle von Proteinen, als auch geöffnet oder geschlossen, im Falle von Ionenkanälen. Übergangsknoten (engl. *transition node*, Abb. 1) repräsentieren den Zustandswechsel einer Reaktion. Der Knoten befindet sich dabei in der Mitte einer Kante, die in ST-Kanten und TS-Kanten unterteilt werden. Der Knoten stellt somit den Zeitpunkt des Zustandswechsels einer Reaktion dar. Die ST-Kanten bilden dabei die erste Hälfte der Reaktion, während die TS-Kanten den Übergang zum resultierenden Zustandsknoten, durch einen Pfeil, darstellen. Nur im Falle einer Translokation eines Moleküls ist die Pfeilspitze nicht ausgefüllt. Handelt es sich um einen Reaktionsschritt, bei dem die Reihenfolge der Reaktion eine Rolle spielt, wird dies durch eine TS-Kante mit AND veranschaulicht. Wenn die Reaktionsreihenfolge jedoch nicht wesentlich für das Ergebnis ist, kann dies durch ein OR definiert werden. Mit dieser Methode der Darstellungsweise lässt sich nun ein Stoffwechselkreislauf sehr detailliert beschreiben. Jedoch ist es in diversen Stoffwechselschritten nicht immer notwendig, diesen so präzise einzusehen. Dafür gibt es nun Möglichkeiten, die Darstellung zu vereinfachen, um den Überblick zu bewahren.

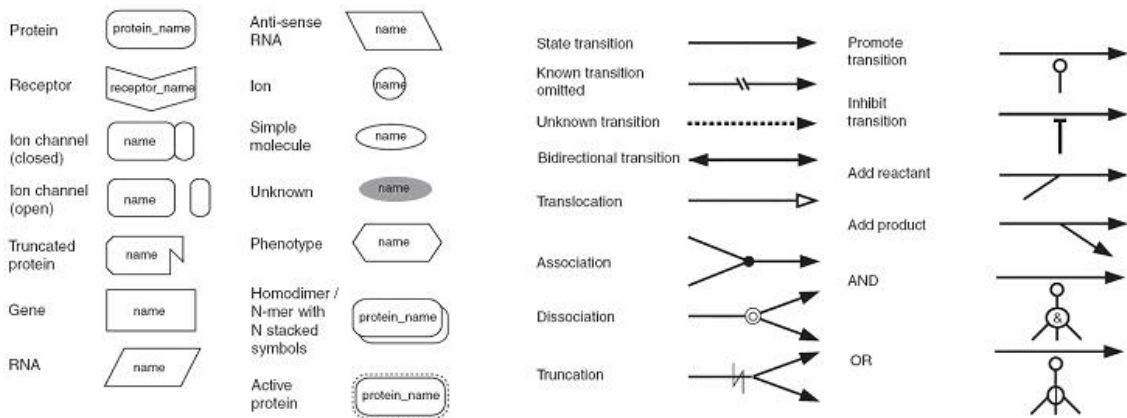


Abbildung 1: Zustandsknoten (SN) sind in der linken Hälfte abgebildet, Übergangsknoten (TN), mit den ST- und TS-Kanten in der rechten [Kitano]

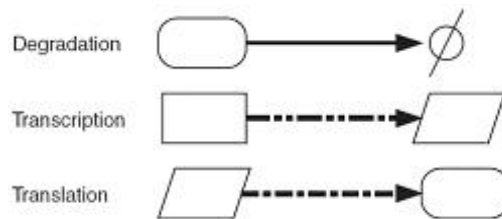


Abbildung 2: Die dargestellte TypI-Reduktion ermöglicht das Weglassen von momentan irrelevanten Reaktionsschritten [Kitano]

2.1 Reduktion TypI

Die TypI-Reduktion ermöglicht das Verkürzen von momentan unwesentlichen Zwischenprodukten durch die gestrichelte Darstellung der Übergangsknoten. Damit wird beispielsweise die Transkription kompakt als der Übergang vom Gen zur resultierenden RNA visualisiert, ohne deren Übergangskomponenten. Die darauf folgende Translation bildet nun einfach der Übergangsknoten von RNA zum folgenden Protein (Abb. 2).

2.2 Reduktion TypII

Die TypII-Reduktion (Abb. 3) dient der reinen Vereinfachung von Reaktionsschritten in der Darstellung und ermöglicht somit dem Anwender komplexe Reaktionen auf einem Blick zu erfassen. Die Reduktion bezieht sich bei diesem Typ auf die molekularen Wechselwirkungen von Proteinen, die auf zwei unterschiedliche Arten und Weisen stattfinden kann. Das erste Verfahren beschreibt Wechselwirkungen wie die Aktivierung, die Hem-

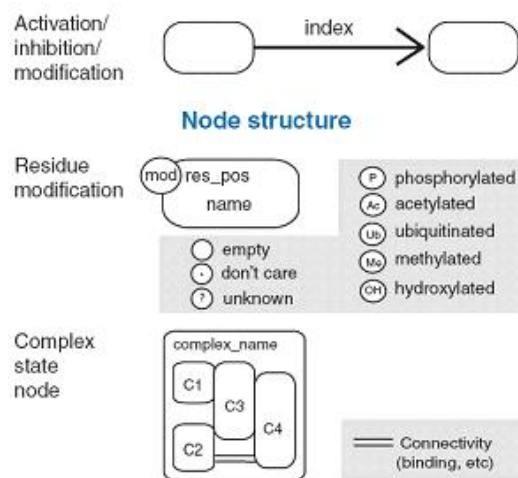


Abbildung 3: Die TypII-Reduktion splitet sich in folgende Darstellungsweisen. Die Notation mit einem Index ganz oben dargestellt, der Index selbst ist in Abbildung (4) beschrieben. In der Mitte ist die mögliche Darstellung eines Proteins mit Resten erläutert. Ganz unten im Bild folgt die Notation bei komplexen Systemen [Kitano].

mung oder einen Zustandswechsel anhand eines Indizes entlang der Kante. Dieser kann durch eine kontextfreie Grammatik erzeugt werden, was die Konstruktion von Parsersoftware sehr vereinfacht (siehe Abb. 4). Handelt es sich um eine Aktivierung ‚+‘ oder eine Hemmung ‚-‘, steht zu Beginn des Indexes, nach dem ‚<=‘ wird die molekulare Wechselwirkung spezifiziert. Dabei wird sowohl deren Bedingungen, z. B. bei ‚&‘, eine Veränderung eines anderen Restes, als auch die eigentliche Modifikation des Restes genau beschrieben. In der zweiten Möglichkeit der Visualisierung wird die Struktur der Knoten vereinfacht, indem die Reste eines Proteins durch Kreise am Rand des abgerundeten Rechtecks gekennzeichnet sind. Handelt es sich um ein komplexes Protein mit mehreren Untereinheiten, können diese durch weitere abgerundete Rechtecke innerhalb des Rechtecks, welches das Enzym repräsentiert, dargestellt werden [Kitano].

3 Kinetische Modellierung

Einem Stoffwechselvorgang liegen mehrere Einzelreaktionen zugrunde. Diese lassen sich in verschiedene kinetische Reaktionstypen einteilen. Wird ein mathematisches Modell eines biologischen Systems aufgestellt, benötigt dies sowohl die Kenntnis mehrerer Komponenten eines solchen Systems (z. B. Gene, Enzyme, Regulatoren, Metabolite, etc.) als auch ihre Wechselbeziehungen. Bei den Interaktionen spielen die Stöchiometrie der Reaktionspartner, also die Stoffe, die quantitativ umgesetzt werden, als auch die Informationen über die Substrate die selbst nicht verbraucht werden, eine Rolle. Zudem muss die Kinetik

EffectDescription = Result ImmediateEffect Condition SimpleSentence	
Result	= TRANSITION ('+' '-' empty) '<=' empty
ImmediateEffect	= TERM_IE
Condition	= empty (' TERM_COND ')
SimpleSentence	= ('+' '-' TRANSITION '?')
TERM_IE	= RESIDUE_IE TERM_IE OP TERM_IE
TERM_COND	= RESIDUE_COND TERM_COND OP TERM_COND
RESIDUE_IE	= ('+' '-') MODIFICATION ('@' TYPE [0-9]+ SUBUNIT empty)
RESIDUE_COND	= ('-' empty) MODIFICATION '@' TYPE [0-9]+
OP	= ('&' ' ')
MODIFICATION	= (P Me Ac Ub Hy) (P M A U H)
TYPE	= (Tyr Ser Thr) (Y S T)
SUBUNIT	= empty '/' SUBUNIT_NAME
TRANSITION	= [a-zA-Z]+[0-9]*
SUBUNIT_NAME	= [a-zA-Z0-9]+

Abbildung 4: Der Index wird durch diese kontextfreie Grammatik beschrieben [Kitano].

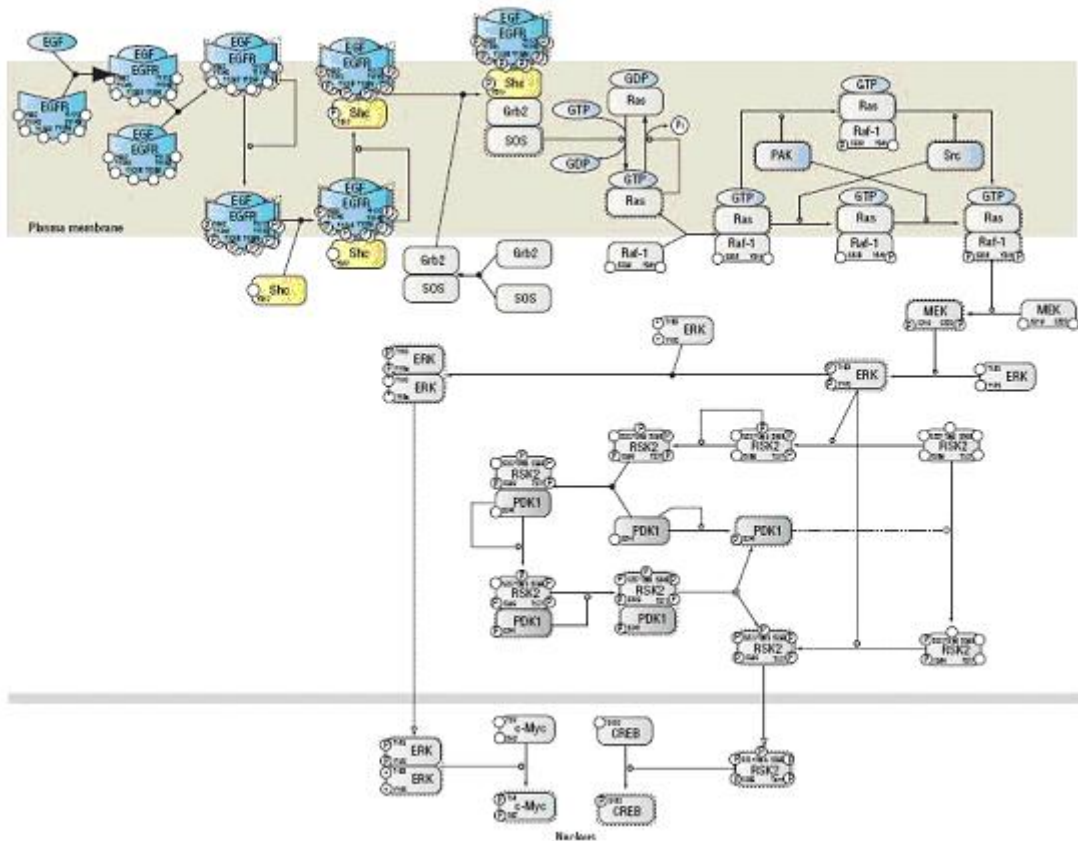


Abbildung 5: Dieser Graph beschreibt den gleichen Signalweg wie in Abbildung 6. Die Reaktionen werden durch Restmodifikation des jeweiligen Proteins beschrieben, da die zugrundeliegenden Eigenschaften der einzelnen Komponenten bekannt sind wird auf die genauere Beschreibung des Übergangsknoten verzichtet. [Kitano].

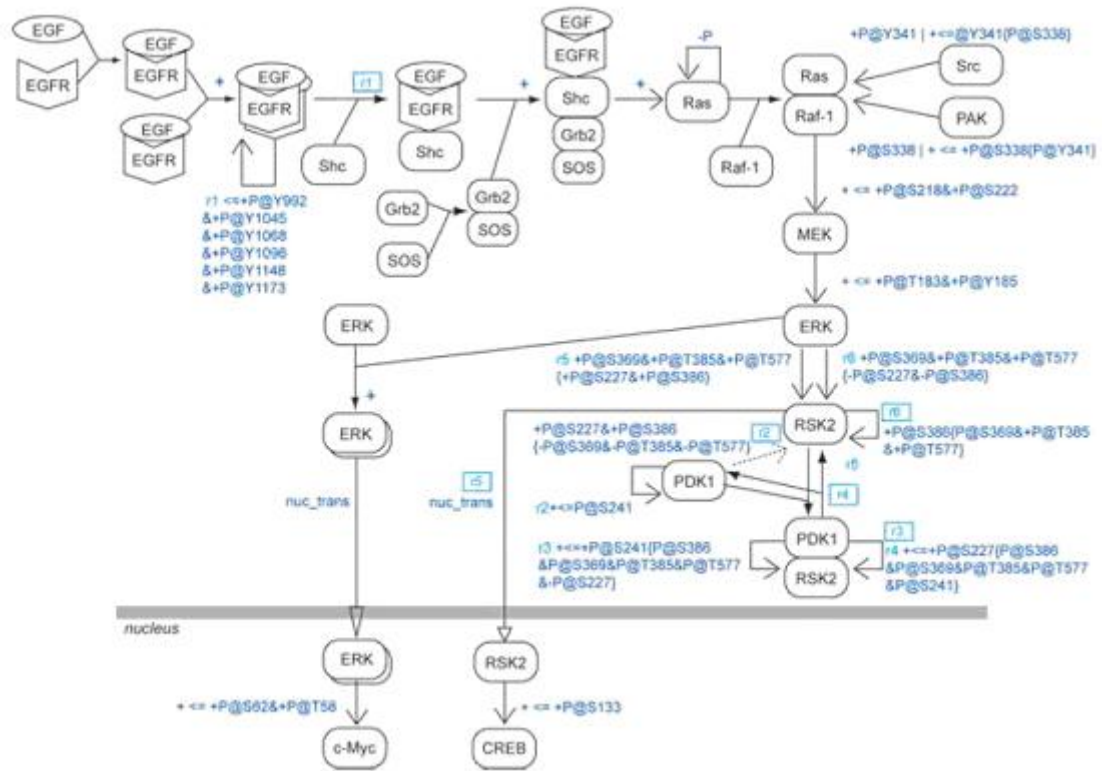


Abbildung 6: Dieser Graph beschreibt eine andere Visualisierung des Signalwegs als in Abbildung 5. Hier erfolgt die Beschreibung der Reaktionen anhand der Indize; eine Aktivierung kann somit auch allein durch ein ‚+‘ beschrieben werden [Kitano].

der jeweiligen Reaktion bekannt sein, um Aussagen über deren Geschwindigkeitsgesetz zu treffen. Dieses lässt sich mit dem Massenwirkungsgesetz beschreiben, welches besagt, dass die Reaktionsrate proportional zu der Wahrscheinlichkeit der Kollision der jeweiligen Reaktanden ist [GuldbergWaage79]. Dafür gilt folgende Gleichung

$$\begin{aligned} v_j(C(t)) &= k_{+j} \prod_{i=1}^r C_i(t)^{n_{ij}^-} - k_{-j} \prod_{i=1}^r C_i(t)^{n_{ij}^+} \\ &= v_+ - v_- \end{aligned} \quad (1)$$

Hierbei ist v_+ und v_- jeweils die Reaktionsrate der Hin- und Rückreaktion, k_+ und k_- die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten und C_i die Konzentration von Substrat und Produkt. n_{ij}^+ und n_{ij}^- entspricht dem jeweiligen stöchiometrischen Koeffizienten.

3.1 Michaelis-Menten-Kinetik

Die Michaelis-Menten-Kinetik [Voet] ist eine der Standardkinetiken, die sich vom Massenwirkungsgesetz ableiten lässt. Hierbei handelt sich um eine Reaktion, bei der sich das Enzym und das Substrat zu einem Enzym-Substrat-Komplex bindet, das wiederum in das Produkt und das Enzym zerfällt, wie in Gleichung (2) beschrieben. Das E steht im Falle eines Enzyms mit mehreren Untereinheiten für das aktive Zentrum.



Diese Reaktion lässt sich nun in Elementarreaktionen zerlegen. Die Geschwindigkeiten dieser Einzelreaktionen werden durch Differentialgleichungen beschrieben.

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][S] + (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] \quad (4)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (5)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (6)$$

Findet nun solch eine Reaktion statt, ist das Enzym nach wenigen Millisekunden fast vollständig im Enzym-Substrat-Komplex gebunden. Dieser Komplex wird im folgenden Verlauf permanent gebildet und zerfällt ebenso permanent in $[E] + [S]$ und $[E] + [P]$. $[ES]$

befindet sich somit, laut einer erstmals erstellten Theorie von G. E. Briggs und James B. S. Haldane, im Fließgleichgewicht (engl. *steady state*) und es kann folgende Annäherung angenommen werden.

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (7)$$

In der Praxis lässt sich nun nicht genau unterscheiden, ob sich das Enzym momentan im freien $[E]$ oder im gebundenen Zustand $[ES]$ befindet. Daher wird von der messbaren Größe der totalen Enzymkonzentration ausgegangen.

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad (8)$$

Durch Kombination der Geschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes (Gl. 5) unter der Annahme des Fließgleichgewichts (Gl. 7) mit der Erhaltungsbedingung (Gl. 8) gilt folgende Gleichung:

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_M + [S]} \quad (9)$$

K_M steht hier für die Michaelis-Menten-Konstante, sie entspricht der „Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Hälfte ihres Maximalwerts liegt“ [Voet]. Sie wird folgenderweise definiert:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (10)$$

Der Verlauf solch einer Reaktion besteht also aus einer Anfangsgeschwindigkeit, wenn mehr als 10% des Substrats zum Produkt umgewandelt wurde (Gl. 11), und einer folgenden Maximalgeschwindigkeit (Gl. 12). Die Maximalgeschwindigkeit dieser Reaktion wird erreicht, wenn alle Enzyme in freier Form vorliegen und die Enzymkonzentration größer oder gleich der Substratkonzentration ist.

$$v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{t=0} = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_T[S]}{K_M + [S]} \quad (11)$$

$$v_{max} = k_2[E]_T \quad (12)$$

Werden nun diese beiden Gleichungen (11) und (12) kombiniert, resultiert die bekannte Michaelis-Menten-Genetik (Gl. 13), die allein von der Substratkonzentration abhängig ist und somit ideal für die praktische Anwendung.

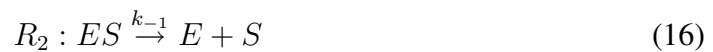
$$v_0 = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (13)$$

3.2 Gewöhnliche Differentialgleichungen

Um nun ein kinetisches Modell zu erstellen, werden gewöhnliche Differentialgleichungen aufgestellt. Diese beschreiben die Änderung der Konzentration einer Komponente des biologischen Systems in Abhängigkeit von der Zeit t . Sie folgt aus den jeweiligen Zu- und Abflussraten.

$$\frac{d[S_i]}{dt} = \sum_{j=1}^r n_{ij} v_j \quad (14)$$

Dabei ist S_i die Konzentration der i ten Komponente, v_j stellt die Reaktionsgeschwindigkeit der j ten Reaktion dar und n_{ij} ist der stöchiometrische Koeffizient der j ten Reaktion. Gleichung (14) lässt sich auch in Form einer stöchiometrischen Matrix mit einem Geschwindigkeitsvektor berechnen. Um diese am Beispiel der Michaelis-Menten-Kinetik aufzustellen, sind folgende Reaktionskanäle R_μ relevant:



Dabei bilden die Einzelreaktionen die Spalten und die beteiligten Stoffe die Zeilen. Die Matrix ergibt sich aus den jeweiligen stöchiometrischen Koeffizienten. Positive oder negative Werte resultieren somit aus dem Zerfall oder der Bildung eines beteiligten Stoffes. Eine 0 steht für das nicht vorhandensein im jeweiligen Reaktionsschritt. Somit resultiert für das obige Beispiel folgende stöchiometrische Matrix N .

$$N = \begin{pmatrix} -1 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & 0 \\ 1 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (18)$$

mit dem Geschwindigkeitsvektor $\vec{v}(S(t))$

$$\vec{v}(S(t)) = \begin{pmatrix} k_1[E][S] \\ k_{-1}[ES] \\ k_2[ES] \end{pmatrix} \quad (19)$$

4 Simulation: Glykolyse und Pentose-Phosphat-Weg in *E. coli*

Die Gruppe Chassagnole *et al.* [Chassagnole] simulierten 2001 erstmals den zentralen Kohlenstoff-Stoffwechsel (Abb. 7) in *E. coli*. Anhand bereits existierender Forschungsunterlagen im Bereich *E. coli* wurden die Bedingungen einer *in vivo* Versuchsreihe erstellt. Darin bekam die *E. coli*-Kultur einen Glukoseschock durch die Zugabe von Glukose. Die Ergebnisse dienten als Basis für die dazu durchgeführte Simulation.

4.1 Modell des Stoffwechsels

Für die Modellierung der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Weges wurden gewöhnliche Differentialgleichungen als Bilanzgleichungen verwendet.

$$\frac{dC_i}{dt} = \sum_j v_{ij} r_j - \mu C_i \quad (20)$$

Diese Bilanzgleichung entspricht der Gleichung (14), C_i ist die Konzentration des jeweiligen Metaboliten i , v_{ij} bildet den stöchiometrischen Koeffizienten für den Metaboliten in Reaktion j , die Reaktionsrate ist mit r_j beschrieben. Was hier zusätzlich noch berücksichtigt wurde, ist der Abgang an die Biomasseproduktion in diesem Stoffwechsel, dabei ist μ die spezielle Wachstumsrate mit der jeweiligen Stoffkonzentration C_i . Für die Berechnung der extrazellulären Glukosekonzentration wurde folgende Gleichung angenommen:

$$\frac{dC_{\text{glc}}^{\text{extrazellular}}}{dt} = D(C_{\text{glc}}^{\text{feed}} - C_{\text{glc}}^{\text{extrazellular}}) + f_{\text{pulse}} - \frac{C_x r_{\text{PTS}}}{\rho_x} \quad (21)$$

Hierbei ist $C_{\text{glc}}^{\text{feed}}$ die Glukosekonzentration in der Nahrung der *E. coli*, $C_{\text{glc}}^{\text{extrazellular}}$ entspricht der extrazellulären Glukosekonzentration. Das Maß für die plötzliche Veränderung der Glukosekonzentration bei der Zugabe von Glukose beschreibt der Term f_{pulse} . C_x ist die Biomassekonzentration und ρ_x das spezifische Biomassegewicht. Das Phosphotransferasesystem (PTS) ist maßgeblich an der Glukoseeinschleusung in die Zelle beteiligt, dessen Rate r_{PTS} muss somit berücksichtigt werden, bei der Berechnung der extrazellulären Glukosekonzentration. Für die Reaktionsraten der beteiligten Enzyme wurden hier Gleichungen aus vorhergehenden Papers herangezogen, somit gilt unter Annahme des Fließgleichgewichts folgende Reaktionsrate:

$$\tilde{r}_i = r_i^{\text{max}} f_i(\tilde{C}_i, \tilde{P}_i) \quad (22)$$

Mit \tilde{P}_i als Parametervektor und \tilde{C}_i als Konzentrationsvektor im Fließgleichgewicht. Aus dieser Gleichung ergibt sich nun eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit mit intrazellulärem Fluß \tilde{r}_i

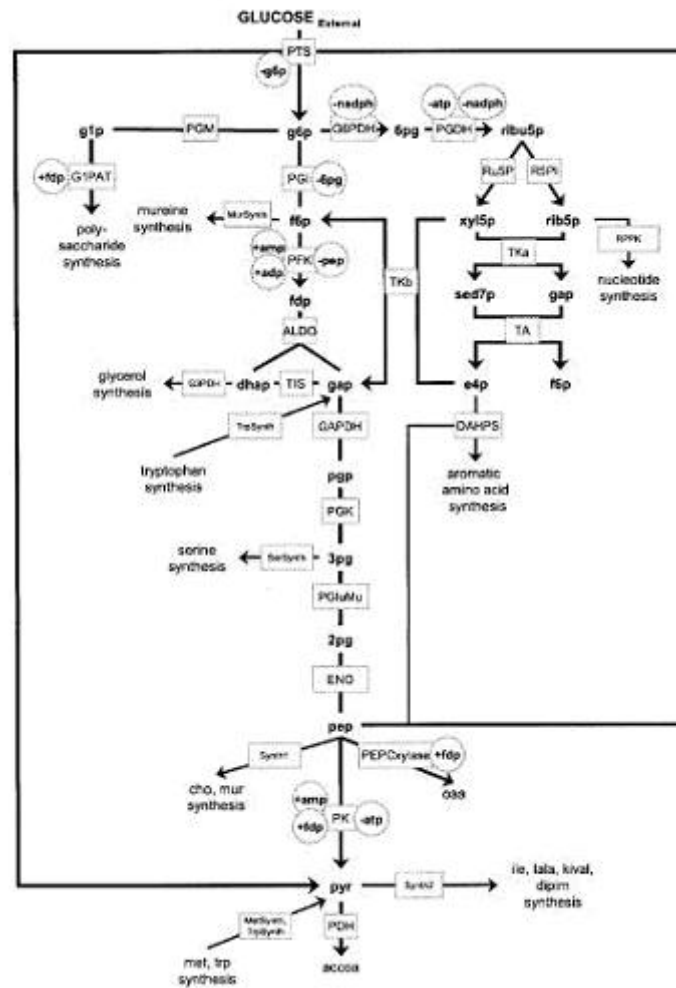


Abbildung 7: Ablauf der Glykolyse sowie des Pentose-Phosphat-Weges in *E. coli* [Chassagnole].

$$r_i^{max} = \frac{\tilde{r}_i}{f_i(\tilde{C}_i, \tilde{P}_i)} \quad (23)$$

Bei der Durchführung der Versuchsreihen und der zugehörigen Simulation ist die Annahme des Fließgleichgewichts erforderlich. Dafür ist bei der Berechnung der maximalen Reaktionsrate eine Annäherung für eine Gleichgewichtskonstante nötig. Diese berechnet sich aus intrazellulären Messungen der Konzentration und den Abschätzungen im Fließgleichgewicht.

$$K_j = \delta_j K_{eq,j} = \delta_j \prod_i \tilde{C}_i^{v_{i,j}} \quad (24)$$

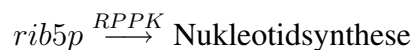
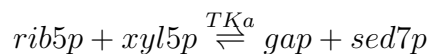
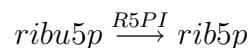
mit

$$0 \leq \delta_j \leq 1 \quad (25)$$

K_j ist somit die angenäherte Gleichgewichtskonstante einer Reaktion j , mit $K_{eq,j}$ als Gleichgewichtskonstante, bzw. \tilde{C}_i als Konzentration im Fließgleichgewicht und $v_{i,j}$ als stöchiometrischer Koeffizient von Komponente i in Reaktion j .

4.2 Durchführung der Simulation

Für die Simulation eines Metabolismus können die Konzentrationen der einzelnen Metabolite durch gewöhnliche Differentialgleichungen, wie in Gleichung (20), berechnet werden. Die Reaktionsraten ergeben sich aus den kinetischen Typen der jeweiligen Reaktionspartner, im Fall des Massenwirkungsgesetzes (Gl. 1) und der Michealis-Menten-Kinetik (Gl. 13). Im Pentose-Phosphat-Weg kann die Simulation am Beispiel der Ribose-5-Phosphat (rib5p) wie folgt aussehen:



Damit liegen, laut Literatur, folgende Reaktionskinetiken vor:

Im Fall von Ribose-Phosphat-Isomerase (R5PI) handelt es sich um das reversible Massenwirkungsgesetz, damit gilt Gleichung (1) unter Berücksichtigung des Fließgleichgewichts $K_{R5PI,eq}$ (Gl. 24) für die Rückreaktion.

Enzymatische Reaktion	Kinetischer Typ
RPPK	Michealis-Menten
R5PI,TKa	reversible Massenkinetik

Tabelle 1: Die Tabelle listet die bei Ribose-5-Phosphat beteiligten Enzyme mit ihrem kinetischen Typ auf.

$$\begin{aligned}
 r_{R5PI} &= r^{max} C_{ribu5p} - \frac{r^{max}}{K_{R5PI,eq}} C_{rib5p} \\
 &= r^{max} \left(C_{ribu5p} - \frac{C_{rib5p}}{K_{R5PI,eq}} \right)
 \end{aligned} \tag{26}$$

Gleiches gilt für die Reaktionsrate der Transketolase a (TKa) im nächsten Reaktionsschritt:

$$\begin{aligned}
 r_{TKa} &= r^{max} C_{rib5p} C_{xyl5p} - \frac{r^{max}}{K_{TKa,eq}} C_{gap} C_{sed7p} \\
 &= r^{max} \left(C_{rib5p} C_{xyl5p} - \frac{C_{gap} C_{sed7p}}{K_{TKa,eq}} \right)
 \end{aligned} \tag{27}$$

Im letzten noch ausstehenden Reaktionsschritt unterliegt die Ribose-Phosphat-Pyrophosphokinase (RPPK) der Michaelis-Menten-Kinetik. Damit lassen sich die Werte zur Berechnung der Reaktionsrate direkt in (13) einsetzen.

$$r_{RPPK} = \frac{r_{RPPK}^{max} C_{rib5p}}{K_M(RPPK, rib5p) + C_{rib5p}} \tag{28}$$

Die Konzentration von Ribose-5-Phosphat (rib5p) lässt sich zuletzt durch die Aufstellung der gewöhnlichen Differentialgleichung (20) unter Berücksichtigung der Hin- und Rückreaktion wie folgt aufstellen:

$$\frac{dC_{rib5p}}{dt} = r_{R5PI} - r_{TKa} - r_{RPPK} - \mu C_{rib5p} \tag{29}$$

Werden diese Berechnungen nun analog für alle bestehenden Reaktionen des Stoffwechsels durchgeführt, lassen sich damit die Glykolyse und der Pentose-Phosphat-Weg sowohl modellieren als auch simulieren. Die unbekannt Parameter werden dabei optimiert.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung (8) werden einige Ergebnisse dieser Studie präsentiert. Zum Zeitpunkt t_0 wurde der Glukoseschock durch die Glukoseinjektion verabreicht, die Konzentrationen einiger Metabolite wurden in ihrem zeitlichen Verlauf dargestellt. Die experimentell ermittelten Werte stellen die Punkte dar, während die äquivalente Simulation durch eine Kurve repräsentiert ist, beides zeigt keine vollständige Übereinstimmung. Die extralzelluläre Glukosekonzentration ($\text{glucose}_{\text{ext}}$) zeigt zu Beginn der Glukoseinjektion kongruentes Verhalten in der Konzentration und auch deren Abfall scheint bis zu 20 Sekunden gleich zu sein, jedoch lässt sich danach keine Aussage mehr machen, da die experimentellen Werte nicht dargestellt wurden. Bei Glukose-6-Phosphat (g6p) scheint die Simulation mit dem Experiment weitgehend übereinzustimmen. Die Konzentrationen des folgenden Fruktose-6-Phosphat (f6p) zeigt jedoch experimentell nur in den ersten 10 Sekunden gleiches Verhalten, danach schwanken die Werte sowohl über als auch unter der Simulation. Bei Fruktose-1,6-Phosphat (fdp) lassen sich experimentelle Ergebnisse wieder nur bis zu einer Laufzeit von 20 Sekunden vorfinden, die bis auf eine anfängliche Unstimmigkeit den gleichen Konzentrationsanstieg zeigen. Bei der Konzentration von Phosphoenol-Pyruvat (pep) unterliegt der simulierte Verlauf größeren Schwankungen, als es das Experiment vorweist, es gibt jedoch zeitweise Übereinstimmungen. Bei Glycerinaldehyd-3-Phosphat (gap) gibt es wieder nur in den ersten 20 Sekunden experimentelle Daten, diese sind im Gegensatz zur Simulation nach einem minimalen Anstieg konstant. Beim Übergang in die Polysaccharidsynthese mit Glukose-1-Phosphat (glp), existieren nur vier experimentell ermittelte Werte, wieder in den besagten 20 Sekunden. Diese zeigen in drei von vier Fällen eine Übereinstimmung, jedoch steigt die Konzentration in der Simulation im Vergleich zum Experiment kaum an. Pyruvat (pyruvate) bildet das Schlusslicht der Glykolyse und zeigt nur im Anstieg der Konzentration einen gleichen Verlauf, danach stimmen Experiment und Simulation nicht mehr überein. Das letzte Ergebnis liefert 6-Phosphoglucomat (6pg) mit dem Übergang in den Pentose-Phosphat-Weg. Die Ergebnisse des Experiments zeigen jeweils kleine Konzentrationsabweichungen zur Simulation, jedoch mit gleicher Tendenz.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen wohl darauf schließen, dass die Simulation dieses komplexen Metabolismus noch recht unvollständig ist. Die einfache Anwendung der Enzymkinetik in Form von Formeln und Berechnungen reicht somit nicht aus. Es fehlen noch weitere biologische Kenntnisse über die Wechselwirkungen der beteiligten Metabolite mit anderen Stoffen, um über einen größeren Zeitraum zuverlässige Modelle zu erstellen.

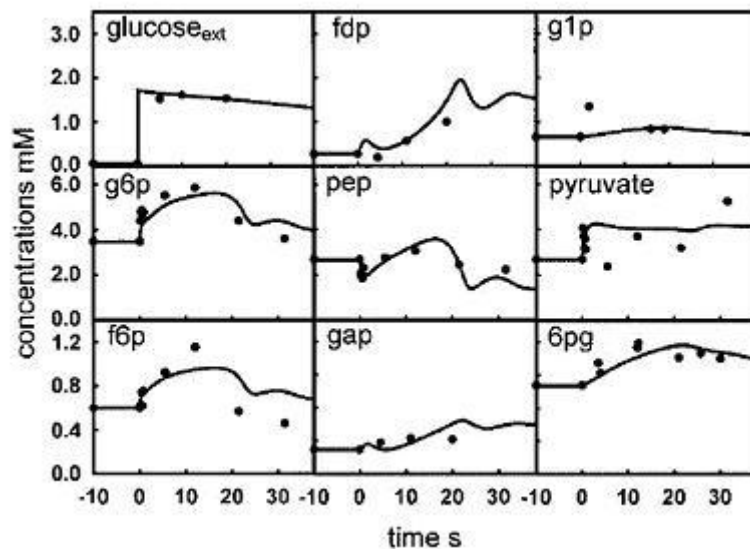


Abbildung 8: Die Ergebnisse aus der Simulation von Glykolyse und Pentose-Phosphat-Weg als Linie dargestellt, die experimentellen Proben als Punkte [Chassagnole].

5 Simulation: Osmoseregulation in Hefe

Eine ähnliche Simulation wurde 2005 von der Gruppe Klipp und Bodil *et al* durchgeführt. Sie simulierten den osmotischen Schock in Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Um deren Genauigkeit zu testen, dienten wiederum zugehörige Versuchsreihen. Experimentell bekamen die Hefezellen dafür einen osmotischen Schock durch eine 0,5 M NaCl-Injektion.

5.1 Modell der Osmoseregulation

Um die Osmoseregulation möglichst genau zu simulieren, wurde hier im Gegensatz zu der vorherigen Simulation, der Metabolismus in Module eingeteilt (siehe Abb. 9). Dadurch entstehen fünf Module, die den Stoffwechsel beschreiben:

1. das Phosphorelay-Modul
2. das MAP-Kinase-Kaskade-Modul
3. das Genexpressions-Modul
4. das Metabolismus-Modul
5. das Modul für die biophysikalischen Veränderungen

Wird ein osmotischer Schock ausgelöst, dient TCS als Indikator für den Verlust des Innendrucks durch den plötzlichen Austritt von Wasser. Das hat den Anstieg der Ssk1-Konzentration im Phosphorelay-Modul zur Folge. Daraus resultiert in der MAP-Kinase-

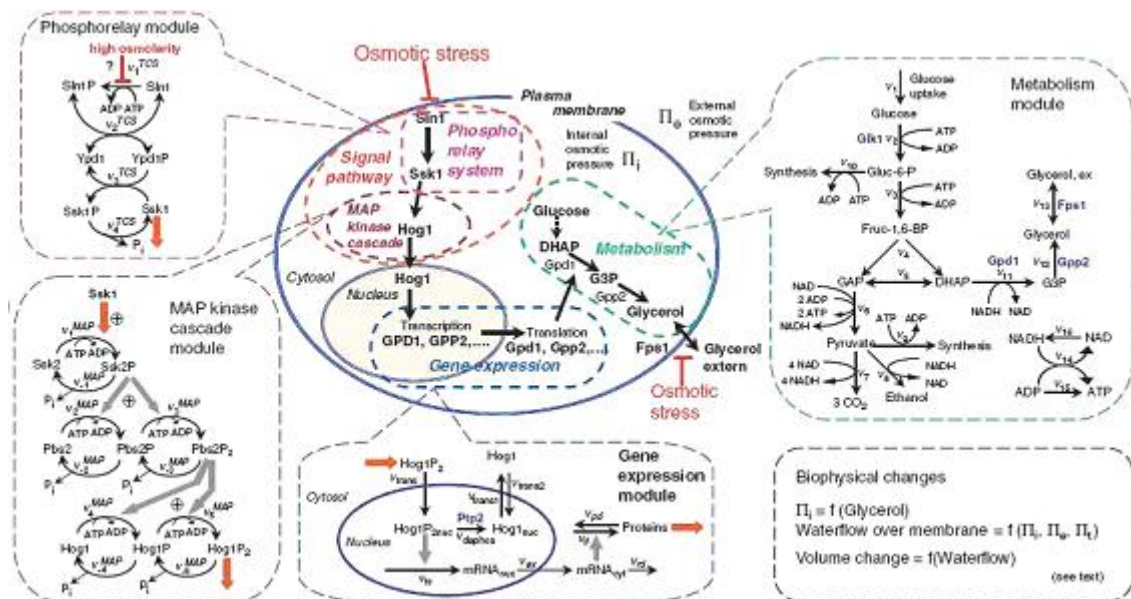


Abbildung 9: Einteilung der Osmoseregulation in Module [Klipp]

Kaskade eine erhöhte $Hog1P^2$ -Konzentration. Diese bewirkt im nächsten Modul der Genexpression die Transkription und Translation der Proteine Gpd1, Gpd2 etc. die für die Glycerolsynthese verantwortlich sind. Im Metabolismus-Modul sorgen diese Proteine nun für eine verstärkte Glycerolsynthese. Durch das Schließen des Glycerolkansals Fsp1, ebenfalls ein Sensor für den Abfall des Innendrucks, steigt die Glycerolkonzentration. Dieser Anstieg stellt nun den osmotischen Druck wieder her, damit das Wasser zurück in die Zelle fließen kann. Ist der Innendruck und das Volumen wieder hergestellt, kommt die Glycerolsynthese zum Erliegen, der Kanal öffnet sich und die Glycerolkonzentration sinkt. Folglich sind der Innendruck und die Volumenänderung wichtige Signale für die Steuerung der Osmoseregulation. Diese biophysikalischen Veränderungen werden nun in einem zusätzlichen Modul für die Simulation beschrieben.

Modell des Metabolismus

Für das Modell dieses Metabolismus werden wie schon zuvor gewöhnliche Differentialgleichungen laut (30) verwendet. Somit werden alle Reaktionen, die innerhalb der vier Module der Osmoseregulation stattfinden, mit insgesamt 32 solch gewöhnlichen Differentialgleichungen dargestellt. Diese werden anhand der in diesem Metabolismus auftretenden Enzymkinetiken hergeleitet, wobei es sich hier allein um lineare, bilineare und der Michaelis-Menten-Kinetik handelt.

$$\frac{dC_i}{dt} = \sum_{j=1}^r n_{ij} v_j \quad (30)$$

Folglich finden r Reaktionen statt mit m Reaktionspartnern, die jeweils in der Konzentration C_i auftreten, bei einer Reaktionsrate von v_j . Der stöchiometrische Koeffizient wird mit n_{ij} beschrieben.

Modul der biophysikalischen Veränderungen

Als fünftes Modul werden in dieser Simulation die zur Kontrolle wichtigen biophysikalischen Faktoren berücksichtigt. Sie steuern, wie oben bereits beschrieben, den Reaktionsverlauf der Zelle auf den osmotischen Schock. Mathematisch beschrieben ändert sich dabei das Volumen V beim plötzlichen Eintritt eines osmotischen Schocks, berechnet durch V_{os} . Des Weiteren muss der externe und interne osmotische Druck Π_e und Π_i definiert sein, wieder mit deren Änderung, durch die Anpassung des Innendrucks Π_t der Zelle. Diese Anpassung resultiert aus dem Wasserfluss durch die Membran.

Der interne osmotische Druck und dessen Volumenänderung wird durch das Gesetz zur Osmose, der Boyle-Van't-Hoff-Relation beschrieben.

$$\Pi_i = RT \frac{v}{V_{os}} \quad (31)$$

mit

$$V_{os} = V_{total} - V_b \quad (32)$$

und

$$V_b = b * V \quad (33)$$

Dabei beschreibt R die Gaskonstante und T die Temperatur. Es existieren dabei n osmotisch aktive Ionenkanäle pro Zelle. Die osmotische Volumenänderung V_{os} berechnet sich aus der Differenz des totalen Zellvolumens und der Konstante V_b , die das Volumen angibt, das nicht betroffen ist, durch den osmotischen Einfluss. Die Berechnung des internen osmotischen Drucks in der Simulation macht das Ganze abhängig von der Zeit.

$$\frac{d}{dt} \Pi_i(t) = \Pi_i(t) \left(\frac{\dot{n}(t)}{n(t)} - \frac{\dot{V}_{os}(t)}{V_{os}(t)} \right) \quad (34)$$

Beim Innendruck der Zelle Π_t wird zu Beginn ein Fließgleichgewicht angenommen, was bedeutet, folgende Gleichung lässt sich mit 0 initialisieren.

$$\Pi_t^0 = \Pi_i^0 - \Pi_e^0 \quad (35)$$

Für die Simulation gilt nun der zeitliche Verlauf des Innendrucks als Eingangswert für das System.

$$\Pi_t(t) = \Pi_t^0 \cdot \left(1 - \frac{V_{os}^0 - V_{os}(t)}{V_{os}^0 - V^{\Pi_t=0}} \right) \quad (36)$$

für $V_{os}(t) > V^{\Pi_t=0}$, sonst ist $\Pi_t(t) = 0$

5.2 Durchführung der Simulation

Wie bereits oben beschrieben, dienen die Module zur Einteilung des Metabolismus. Der Sensor für den osmotischen Schock wird durch den kinetischen Parameter k_1^{TCS} erzeugt. Dieser bekommt als Eingangsgröße die Veränderung des Innendrucks $\Pi_t(t)$ (36).

$$k_1^{TCS}(t) = k_1^{TCS,0} \left(\frac{\Pi_t(t)}{\Pi_t^0} \right)^{n_1} \quad (37)$$

Fällt dieser Parameter nun unter einen Schwellwert wird das Phosphorelay-Modul aktiv. Die Konzentrationen der folgenden Reaktionen sind nun abermals die gewöhnlichen Differentialgleichungen (Gl. 30) für die jeweiligen Enzymkinetiken. Nun erhält jedes folgende Modul als Eingabe die Ausgabegröße des Vorgängers. Durch die damit ansteigende Glycerolkonzentration ändern sich die biophysikalischen Faktoren und können somit neu berechnet werden (Gl. 34 und 36). Damit entsteht ein Kreislauf, der erst, wenn der Innendruck wieder 0 erreicht, zum Erliegen kommt.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

Das vorgestellte Modell der Osmoseregulation brachte folgende Ergebnisse in der Simulation, dargestellt in (Abb. 10 - a,c,e,f) und das vergleichsweise durchgeführte Experiment, zu ersehen in (Abb. 10 - b, d). Zum Zeitpunkt t_0 erfolgte der osmotische Schock durch die 0,5 M NaCl-Injektion.

Für den Kurvenverlauf in beiden Fällen, lässt sich gleiches Verhalten in Experiment und Simulation feststellen. Bei der Simulation (a) erfolgt zuerst der Anstieg der Ssk1-Konzentration, als Ausgabewert des Phosphorelay-Moduls, darauf folgt ein Anstieg der Hog1P²-Konzentration für die MAP-Kinase-Kaskade. Dieses hat wiederum einen Anstieg der mRNA-Konzentration zur Folge in der Genexpression und die anschließende Translation erhöht die Gpd1-Konzentration. Im Experiment (b) liegen keine Daten für das Verhalten von Ssk1 vor, jedoch zeigen die Kurven, dass die Spitzenkonzentrationen im zeitlichen Verlauf später erreicht werden im Falle von Hog1P² und der mRNA, während Gpd1

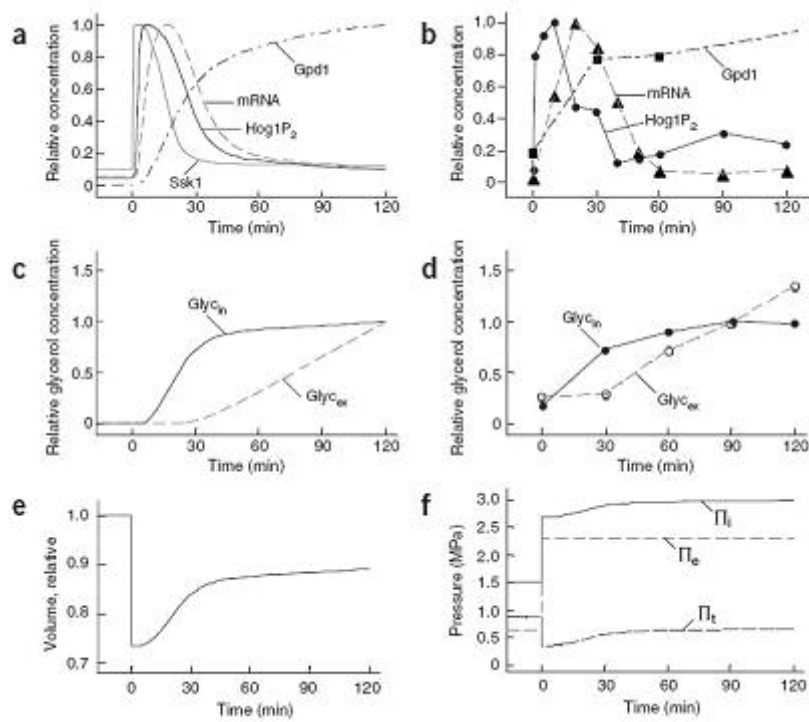


Abbildung 10: Die Ergebnisse der Simulation eines osmotischen Schocks. In (a,c,e,f) ist die Simulation präsentiert, (b) und (d) zeigen die Ergebnisse des Experiments [Klipp].

einen steileren Anstieg der Konzentration hat, als in der Simulation. Der Vergleich der Glukosekonzentration in (c) für die Simulation und in (d) beim Experiment zeigt, die extrazelluläre Glukosekonzentration im Experiment entspricht der intrazellularen. Nach 90 Minuten jedoch finden sich Unterschiede, die extrazelluläre Konzentration übersteigt die intrazelluläre im Experiment (d), während die Simulation (c) erst bei 120 Minuten eine Übereinstimmung vorweist. In (e) und (f) sind die Parameter der biophysikalischen Module im Verlauf der Simulation aufgetragen. Der osmotische Schock verursacht den plötzlichen Abfall des Volumens innerhalb der Zelle, das durch den Anstieg von Glycerol allerdings innerhalb der 120 Minuten nicht wieder zum Ursprung zurückkehrt.

Bei diesem Modell zeigen die Daten der Simulation eine hohe Zuverlässigkeit im Vergleich zum Experiment. Die Einteilung der Module, sowie die Berücksichtigung der physikalischen Einflüsse erweisen sich als relativ zuverlässiges Model für diesen Metabolismus. Damit ist eine Grundlage geschaffen für die mathematische Beschreibung der Osmoseregulation der Hefe.

6 Zusammenfassung

Die Modelle zeigen, dass es möglich ist, anhand Differentialgleichungen Stoffwechselfvorgänge zu simulieren. Das erste Model beschränkt sich dabei allein auf die Simulation an Hand solcher Gleichungen und belegt durch die Ergebnisse dass dieser Ansatz unvollständig sein muss. Dahingegen liegt der Schwerpunkt des zweiten Modells auf den Einfluss der physikalischen Größe Osmoregulation. Auch hier finden sich Ungenauigkeiten, jedoch präsentiert diese Simulation wesentlich höhere Übereinstimmungen in ihren Resultaten. Die zugrundeliegenden Metabolismen sind aus biologischer Sicht offensichtlich verschieden im jeweiligen Einfluss der physikalischen Faktoren, jedoch lässt sich dieser nicht grundlegend abstreiten. Um ein System mathematisch zu beschreiben, müssen alle Faktoren berücksichtigt werden, denn kleine Abweichungen können sich schnell akkumulieren und zeigen daher auf längere Zeit starke Abweichungen. Die vorgestellten Modelle zeigen beide, dass es Faktoren und Wechselwirkungen geben muss, die noch nicht berücksichtigt wurden und bieten somit eher eine Grundlage, und sollen Anreiz geben, für spezifiziertere Simulationen in den jeweiligen Stoffwechselfvorgängen. Im Hinblick auf die Möglichkeit der Visualisierung von biologischen Metabolismen durch Prozessdiagramme wäre es wünschenswert, korrekte Modelle zu erschaffen, um nicht nur eine einheitliche Darstellungsweise zu erhalten, auch die Simulation könnte anhand des erstellten Graphen möglich sein.

Literatur

[GuldbergWaage79] **Über die chemische Affinität:** Guldberg, C, & Waage, P. (1879)

[Kitano] **Using process diagrams for the graphical representation of biological networks:** Hiroaki Kitano, Akira Funahashi, Yukiko Matsuoka & Kanae Oda. (2005)

[Chassagnole] **Dynamic Modeling of the Central Carbon Metabolism of *Escherichia coli*:** Christoph Chassagnole, Naruemol Noisommit-Rizzi, Joachim W. Schmid, Klaus Mauch, Matthias Reuss. (2002)

[Klipp] **Integrative model of the response of yeast to osmotic shock:** Edda Klipp, Boddil Nordlander, Roland Krüger, Peter Gennemark & Stefan Hohmann. (2005)

[Voet] **Biochemie:** D. Voet, J.G. Voet. VCH-Verlag, Weinheim. Seite 329ff. (1992)