

**Die bakterielle Signalverarbeitung  
am Beispiel des Sucrose  
Phosphotransferasesystems in *Escherichia  
coli* - Modellierung und experimentelle  
Überprüfung**

Von der Fakultät Maschinenbau der Universität Stuttgart zur  
Erlangung der Würde eines Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)  
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

**Thomas Sauter**

aus Babenhausen/Schwaben

Hauptberichter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. E. D. Gilles  
Mitberichter: Prof. Dr. J. W. Lengeler

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Dezember 2003

Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik der  
Universität Stuttgart

2004



# Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik der Universität Stuttgart sowie am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme in Magdeburg.

Dem Leiter beider Institutionen, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. E.D. Gilles danke ich für die Betreuung und Förderung der Arbeit. Herrn Prof. Dr. J.W. Lengeler danke ich ebenfalls für die Förderung der Arbeit und die Übernahme des Mitberichts. Für die zahlreichen wertvollen Diskussionen und Anregungen danke ich besonders Dr. K. Jahreis, Dr. A. Kremling, Dr. K. Bettenbrock, Dr. E. Bullinger und Dr. J. Wang. Mein Dank ergeht auch an alle anderen Kollegen für die stete Diskussionsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima. Für die Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten danke ich herzlich M. Fleischer, S. Rehner, A. Focke, B. Laube und H. Tietgens.

Stuttgart, im Mai 2003

Thomas Sauter



**“Das Leben ist ein wirbelnder Strom, bald lebhaft und bald träge, vielfältig oder einheitlich, dessen Richtung konstant bleibt, der Partikel von immer den gleichen Stoffen mit sich fortreisst, ununterbrochen einzelne von ihnen aufnimmt und andere entlässt - aber so, dass die Form des lebenden Körpers das Wesentlichste bleibt, nicht seine Materie.”**

Georges Cuvier (französischer Biologe, 1817)



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung</b>	<b>27</b>
1.1	Übersicht . . . . .	27
1.2	Bakterielle Signalverarbeitung . . . . .	30
1.3	Phosphotransferasesysteme (PTSs) in <i>Escherichia coli</i> . . . . .	33
1.3.1	Biologische Grundlagen . . . . .	33
1.3.2	Stand des Wissens zur Modellbildung . . . . .	40
1.4	Signalverarbeitung über die Phosphotransferasesysteme . . . . .	43
1.4.1	Katabolitenrepression und Induktorausschluss . . . . .	43
1.4.2	PTS-vermittelte Kohlenhydrat-Chemotaxis . . . . .	44
1.5	Aufgabenstellung . . . . .	47
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>49</b>
2.1	Experimente und Prozessführung . . . . .	49
2.1.1	Medien . . . . .	49
2.1.1.1	Medienoptimierung . . . . .	51
2.1.2	Verwendete Apparate und Anlagen . . . . .	52
2.1.3	Durchgeführte Experimente im Fermenter . . . . .	53

2.1.4	Bestimmung intrazellulärer Stoffe . . . . .	55
2.1.4.1	Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvat (Prv) . . . . .	55
2.1.4.2	Glucose 6-phosphat (Glc6P), Fructose 6-phosphat (Fru6P) und Fructose (Fru) . . . . .	55
2.1.4.3	Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) . . . . .	56
2.1.4.4	Phosphorylierungsgrad des EIIA <sup>Crr</sup> . . . . .	56
2.1.4.5	Makromolekülzusammensetzung . . . . .	56
2.1.5	Bestimmung extrazellulärer Stoffe . . . . .	56
<b>3</b>	<b>Modellierung, Simulation und Identifikation</b>	<b>58</b>
3.1	Modellierungssystematik . . . . .	58
3.2	Sucrose PTS . . . . .	63
3.2.1	Untersuchung des dynamischen Verhaltens . . . . .	66
3.2.2	EI-Monomer-Dimer-Zyklus: Simulationsstudien zu verschiedenen Modellvorstellungen . . . . .	68
3.2.3	Stationäre Kennlinien . . . . .	70
3.3	Glykolyse . . . . .	72
3.3.1	Metabolische Flussanalyse . . . . .	72
3.3.2	Dynamisches Modell . . . . .	75
3.4	Modellierungswerkzeug, Sensitivitätsanalyse und Parameteridentifikation . . . . .	76
3.5	Abgrenzung biologischer Funktionseinheiten mit mathematischen Methoden . . . . .	79

<b>4</b>	<b>Experimentelle und Simulations-Ergebnisse</b>	<b>84</b>
4.1	Sauerstoffregelung . . . . .	84
4.2	Methodenentwicklung: Analytik intra- und extrazellulärer Metabolite . . . . .	87
4.2.1	Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen . . . . .	87
4.2.1.1	Studie zur Enzymaktivität bei Temperaturen bis $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . . . . .	88
4.2.1.2	Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvat (Prv) . . . . .	90
4.2.1.3	Glucose 6-Phosphat (Glc6P), Fructose 6-Phosphat (Fru6P) und Fructose (Fru) . . . . .	95
4.2.1.4	Zusammenfassung der Methodenentwicklung für die Glykolyse-Metabolite . . . . .	96
4.2.1.5	Zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) . . . . .	98
4.3	Stationäre kontinuierliche Kultur . . . . .	100
4.4	Pulsexperiment . . . . .	102
4.5	Sprungexperimente . . . . .	105
4.6	Fütterungsstop-Experimente . . . . .	107
4.7	Sauerstofflimitierung . . . . .	109
4.8	Kennlinien-Validierung . . . . .	110
4.9	Weiterführende Simulationsstudien . . . . .	112
4.9.1	Variation der Proteinkonzentrationen . . . . .	113
4.9.2	PTS-vermittelte Chemotaxis . . . . .	115
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>119</b>
5.1	Systembiologie (Systems Biology) . . . . .	121
<b>A</b>	<b>Glykolyse- und cAMP-Modell</b>	<b>124</b>
<b>B</b>	<b>Übersichtsschaubilder: Methoden zur Metabolit-Analytik</b>	<b>128</b>

# Abkürzungsverzeichnis

## 1. Formelzeichen

Formelzeichen	Bezeichnung	Einheit
$r$	Reaktionsrate	$[\mu\text{mol/gTS h}]$
$r_{max}$	Maximale Reaktionsrate	$[\mu\text{mol/gTS h}]$
$k$	Geschwindigkeitskonstante	$[\text{gTS}/\mu\text{mol h}], [1/\text{h}]$
$K$	Gleichgewichtskonstante	$[-]$
$Y_{O_2}$	Sauerstoff-Volumenfraktion	$[-]$
$Y_{CO_2}$	Kohlendioxid-Volumenfraktion	$[-]$
$p_{O_2}$	Sauerstoffpartialdruck	$[-]$
$D$	Verdünnungsrate	$[1/\text{h}]$
$\mu$	Spezifische Wachstumsrate	$[1/\text{h}]$
$q$	Volumenstrom	$[1/\text{h}]$
$V_F$	Fermentervolumen	$[l]$
$r_{O_2}$	Stoffübergang	$[\text{mol/l h}]$
$k_l$	Stoffübergangszahl	$[\text{m/h}]$
$A$	Phasengrenzfläche	$[\text{m}^2]$
$a$	Volumenbezogene Phasengrenzfläche	$[1/\text{m}]$
$k_l a$	Volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient	$[1/\text{h}]$
$p_{sO_2}$	Messwert Sauerstoffpartialdruck	$[-]$
$I$	Integratorinhalt	$[\text{g h/l}]$
$P$	Reglerverstärkung	$[-]$
$\tilde{c}$	Gleichgewichtskonzentration Phasengrenzfläche	$[\text{g/l}]$
$e$	Regelabweichung	$[\text{g/l}]$
$y$	Stellgröße	$[1/\text{h}], [\text{U}/\text{min}]$
$y_{min}$	Minimalwert Stellgröße	$[1/\text{h}], [\text{U}/\text{min}]$
$y_{max}$	Maximalwert Stellgröße	$[1/\text{h}], [\text{U}/\text{min}]$
$T_i$	Nachstellzeit	$[\text{h}]$

$b$	Reglerparameter	[1/h]
$A$	Häufigkeitsfaktor	[1/h]
$E_A$	Aktivierungsenergie	[J/mol]
$R$	Allgemeine Gaskonstante	[J/mol K]
$T$	Absolute Temperatur	[K]
$\underline{c}$	Konzentrationsvektor	[ $\mu\text{mol/gTS}$ ]
$\underline{p}$	Parametervektor	

## 2. Abkürzungen

Die Bezeichnungen der Gene erfolgt im Dreibuchstabenkode nach Berlyn [11]. Ein Protein/Enzym, welches beispielsweise durch das Gen *scrY* kodiert wird, trägt dann die Bezeichnung ScrY.

Abkürzungen für Metabolite und Proteine sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Abk.	Name
PTS	Phosphotransferasesystem
PTSs	Phosphotransferasesysteme
PEP	Phosphoenolpyruvat
Prv	Pyruvat
Glc	D-Glucose
Scr	Sucrose (Saccharose)
eScr	extrazelluläre Sucrose (Saccharose)
Scr6P	Sucrose 6-phosphat
Glc6P	Glucose 6-phosphat
Fru	Fructose
Fru6P	Fructose 6-phosphat
FDP	Fructose 1,6-bis-phosphat
3PG	3-Phosphoglycerat
T3P	Triose 3-phosphat
Gly 3P	Glycerin 3-phosphat
CyaA	Adenylatcyclase
cAMP	Zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
CrpA	cAMP receptor protein
EI	Enzym I der PTSs

EIP	phosphoryliertes EI
EID	EI-Dimer
EIDP	monophosphoryliertes EI-Dimer
EIDP2	diphosphoryliertes EI-Dimer
HPr	Hitzestabiles Protein der PTSs
EII	Enzym II der PTSs
EIIA <sup>Crr</sup>	EIIA carbohydrate repression resistance
EIIBC <sup>Scr</sup> /ScrA	sucrosespezifischer PTS-Transporter
EIICB <sup>Glc</sup>	glucosespezifischer PTS-Transporter
ScrB	Sucrose-6-phosphat-invertase
ScrY	sucrosespezifisches Porin
ScrK	ATP-abhängige Fructokinase
ScrR	Sucrose-Repressor
GlpK	Glycerol-Kinase
GlpF	Glycerol MIP channel
LacY	Lactose MFS transporter
DgsA/Mlc	deoxyglucose sensitive (Transkriptionsregulator)
MCP	methyl accepting chemotaxis proteins
CheA	Chemotaxis Kinase -phosphotransferase
CheY	Chemotaxis-Regulatorprotein
CheW	Purinbindendes Chemotaxisprotein
CheZ	Chemotaxisprotein
PgiA	Phosphoglucose-isomerase
PfkA	6-Phosphofructokinase
FbaA	Fructose-bis-phosphat-aldolase
GapA	Glyceraldehyd 3-phosphat-dehydrogenase
PgmI	Phosphoglycerat-mutase
PykF	Pyruvat-kinase I
ArcA/B	respiration control proteins
Ntr	Nitrogen-Regulatorprotein

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Systembiologie (Biosystemtechnik) als interdisziplinäres Arbeitsgebiet . . . . .	28
1.2	Allgemeines Schema der zellulären Signalübertragung und Verarbeitung nach [70] . . . . .	32
1.3	Schematische Darstellung des PTS für Sucrose ('-' Bindung, '~' energiereiche Bindung). Durchgezogene Pfeile stellen biochemische und gestrichelte Pfeile regulative Wechselwirkungen ( $\oplus$ positiv, $\ominus$ negativ) dar. . . . .	35
1.4	Der sucrosespezifische Transporter EIIBC <sup>Scr</sup> formt mit der C-Domäne einen Translokationsmembran durch die Cytoplasmamembran, durch den das extrazelluläre Substrat Sucrose in die Zelle transportiert wird. . . . .	37
1.5	Schema des <i>scr</i> -Regulons. Promotoren (p), Operatoren (Ko <sub>1</sub> , Yo <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) und Terminatoren (t) sind durch schattierte Rechtecke, offene Ellipsen und kleinere offene Rechtecke dargestellt. $\oplus$ steht für positiven regulatorischen Einfluss durch cAMP.CrpA und $\ominus$ für negativen Einfluss durch den ScrR-Repressor [162]. . . . .	38
1.6	Reaktionen des Sucrose- und Glucose-PTS, sowie regulatorische Effekte (gestrichelt) über Katabolitenrepression und Induktorausschluss beim Glp- und Lac-System [161] . . . . .	39
1.7	MCP- und PTS-vermittelte Chemotaxis in <i>Escherichia coli</i> . Symbole wie in Abb. 1.3, Seite 35. . . . .	46
2.1	Anzuchtschema des Stammes <i>Escherichia coli</i> LJ210 . . . . .	50

2.2	Schematischer Aufbau der Fermenteranlage . . . . .	53
3.1	Ausschnitt aus der schematischen Darstellung des Stoffwechselnetzwerks von <i>Escherichia coli</i> zur Veranschaulichung der Komplexität biologischer Systeme . . . . .	59
3.2	Hierarchische Struktur einer bakteriellen Zelle [80]. Erläuterungen im Text. . . . .	60
3.3	Funktionelle Einheit C-Stoffwechsel in <i>E. coli</i> [80]. Erläuterungen im Text. . . . .	61
3.4	Elementare Modellbausteine: Speicherelemente ohne und mit genetischer Information, Stoffwandler, Polymerisator, Signalwandler und Proteinabbau (von links nach rechts und von oben nach unten)	62
3.5	Zeitverläufe der Konzentrationen ausgewählter PTS-Proteine bei sprunghafter Erhöhung der Sucrosekonzentration von $1\text{ mg/l}$ ( $3\text{ }\mu\text{M}$ ) auf $300\text{ mg/l}$ ( $900\text{ }\mu\text{M}$ ) zum Zeitpunkt $t = 0\text{ ms}$ . Die Konzentration des monophosphorylierten EI-Dimers EIDP wurde aus Darstellungsgründen mit dem Faktor 100 multipliziert. . . . .	67
3.6	Phosphorylierungsgrad der PTS-Proteine über dem PEP:Pyruvat-Verhältnis bei $[eSCR] = 0.003\text{ g/l} \approx 9\text{ }\mu\text{M}$ , wenn die Phosphorylierübertragung nur vom EI-Monomer zum HPr möglich ist und der Monomer-Dimer-Zyklus also bei jeder Übertragung durchlaufen werden muss. . . . .	69
3.7	Stationäre Kennlinien des PTS: Phosphorylierungsgrade der PTS-Proteine als Funktion des PEP:Pyruvat-Verhältnis bei konstanter Sucrosekonzentration $[Scr] = 0.3\text{ g/l} = 0.9\text{ mM}$ . . . . .	71
3.8	Stationäre Kennlinien für $EIIA^{Crr}$ . Phosphorylierungsgrade als Funktion des PEP:Pyruvat-Verhältnis und der Sucrosekonzentration	71
3.9	Stoffwechselwege des PTS (mit den Proteinen EIIBC, EIIA, HPr und EI) und der Glykolyse, wie sie im dynamischen Modell zu Grunde gelegt werden. Symbole wie in Abb. 1.3, Seite 35. . . . .	73
3.10	Flussverteilung für aerobes Wachstum auf Sucrose einer stationären kontinuierlichen Kultur von <i>E. coli</i> LJ210 bei einer Verdünnungsrate von $D = 0.1\text{ [h}^{-1}\text{]}$ . Symbole wie im Text erläutert. . . . .	74

3.11	Implementierung des PTS-Bausteins mittels des Modellierungswerkzeugs ProMoT. Das PTS wird hierbei zur Vereinfachung in die allgemeinen (pts_hi) und die spezifischen Proteine (glc_scr_pts) aufgeteilt. Ein- und Ausgänge für Konzentrationen sind mit "t_" gekennzeichnet. . . . .	77
3.12	ProMoT-Implementierung des Bausteins für die allgemeinen PTS-Proteine EI und HPr. Ein- und Ausgänge für Konzentrationen sind mit "t_" gekennzeichnet. Die Nummerierung der Stoffwandler ist entsprechend Gl. 3.5. . . . .	78
3.13	Normierte Trajektorien und deren Ableitungen von typischen P- und I-Variablen. Erläuterungen siehe Text. . . . .	81
3.14	Dendrogramm: Erzeugt durch Cluster-Analyse eines Modells des Transports von vier Kohlenhydraten und der Glykolyse [161]. Die horizontale Achse beschreibt den Abstand zwischen den Zuständen und Gruppen. Durch Auftrennung an der gestrichelten Linie erhält man die benannten Einheiten. . . . .	82
4.1	Regelkreis der $p_{O_2}$ -Regelung mit Führungsgröße Pso2_soll, der Regelgröße Po2 und dem Messwert Pso2. Als Stellgrößen können sowohl die Drehzahl n des Fermenterrührers, als auch der Volumenstrom Qzu der Zuluft verwendet werden. . . . .	84
4.2	Schnelle Probenahmetechnik [139]. Erläuterungen im Text. . . . .	87
4.3	Messung der Reaktionskinetik der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase bei verschiedenen Temperaturen . . . . .	89
4.4	Messung der relativen spezifischen Enzymaktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase bei verschiedenen Temperaturen . . . . .	90
4.5	Stationäre Konzentrationen der PTS-Eingangsgrößen Scr (aus Darstellungsgründen mit Faktor 100 multipliziert), PEP und Prv bei verschiedenen Verdünnungsraten in der kontinuierlichen Prozessführung. Punkte markieren Messungen und Linien Simulationsergebnisse. . . . .	101
4.6	Stationäre Konzentrationen der Ausgangsgrößen Phosphorylierungsgrad von EIIA <sup>Crr</sup> und intrazelluläres cAMP bei verschiedenen Verdünnungsraten in der kontinuierlichen Prozessführung. Punkte markieren Messungen und Linien Simulationsergebnisse. . . . .	101

4.7	Dynamische Antwort des PTS und des intrazellulären cAMP (mit Faktor 5 multipliziert) auf eine Störung des stationären Zustands einer kontinuierlichen Kultur ( $D = 0.1 h^{-1}$ ) von <i>E. coli</i> LJ210 durch Sucrose-Puls. Die extrazelluläre Sucrosekonzentration wurde dabei zum Zeitpunkt $t = 0 s$ von $1 mg/l$ auf eine Endkonzentration von $[eScr] = 300 mg/l$ erhöht. Punkte markieren Messungen und Linien Simulationsergebnisse. . . . .	103
4.8	Dynamische Antwort der Glykolyse auf eine Störung des stationären Zustands einer kontinuierlichen Kultur ( $D = 0.1 h^{-1}$ ) von <i>E. coli</i> LJ210 durch Sucrose-Puls. Die extrazelluläre Sucrosekonzentration wurde dabei zum Zeitpunkt $t = 0 s$ von $1 mg/l$ auf eine Endkonzentration von $[eScr] = 300 mg/l$ erhöht. Punkte markieren Messungen und Linien Simulationsergebnisse. . . . .	104
4.9	Sprunghafte Erhöhung der Verdünnungsrate von $D = 0.1 h^{-1}$ (Generationszeit 415 Minuten, stationäre Sucrosekonzentration $1 mg/l$ ) auf $D = 0.2 h^{-1}$ (Generationszeit 208 Minuten, stationäre Sucrosekonzentration $3 mg/l$ ) zum Zeitpunkt $t = 0 h$ . Verlauf der intrazellulären Metabolite Glc6P, Fru6P, PEP und Prv, sowie der Makromoleküle DNA und RNA und des Phosphorylierungsgrads von EIIA <sup>Crr</sup> im Zeitfenster bis 6 h. . . . .	106
4.10	Sprunghafte Erhöhung der Verdünnungsrate von $D = 0.1 h^{-1}$ (Generationszeit 415 Minuten, stationäre Sucrosekonzentration $1 mg/l$ ) auf $D = 0.2 h^{-1}$ (Generationszeit 208 Minuten, stationäre Sucrosekonzentration $3 mg/l$ ) zum Zeitpunkt $t = 0 h$ . Verlauf der intrazellulären Metabolite PEP und Prv, sowie des Phosphorylierungsgrads von EIIA <sup>Crr</sup> im Zeitfenster bis 0.5 h. . . . .	107
4.11	Fütterungsstop-Experiment. Ausgehend von der stationären Kultur bei $D = 0.1 h^{-1}$ wird bei $t = 0 h$ der Zulauf abgestellt und nach 4 Minuten ( $t = 0.067 h$ ) wieder angestellt. Dargestellt sind gemessene (Punkte) und berechnete (Linien) Verläufe der externen Sucrosekonzentration eScr, sowie des Phosphorylierungsgrads von EIIA <sup>Crr</sup> . . . . .	108
4.12	Berechnetes Kennlinienfeld (Gl. 3.5) und experimentelle Ergebnisse (Punkte) für das PTS. Dargestellt ist der Phosphorylierungsgrad von EIIA <sup>Crr</sup> in Abhängigkeit des PEP:Prv-Verhältnisses und der Sucrosekonzentration. . . . .	111

4.13	Berechnete Abhängigkeit des stationären Phosphorylierungsgrads von $EIIA^{Crr}$ von der Gesamtkonzentration des Transporters $EIIBC^{Scr}$ (in % der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration) bei konstanten Eingangsgrößen $eScr = 0.03 \text{ g/l} = 88 \mu\text{M}$ (Sättigung) und $PEP : Prv = 2$ . . . . .	114
4.14	Zeit für relative Änderung der EID-Konzentration um ein Prozent bei Sprüngen der extrazellulären Sucrosekonzentration über den (genetisch veränderten) Phosphotransferaktivitäten des HPr von EI (Konstanten $k_6, k_7, k_8$ ) und nach EII (Konstante $k_9$ ). Vergleich mit qualitativen experimentellen Beobachtungen zur Glucose-PTS-Chemotaxis [97]: + Ch. tritt auf, - Ch. selten, +/- und -/+ geringe, bzw. keine Ch., jeweils durch Erhöhung der Expression des HPr-ähnlichen Proteins verbessert . . . . .	117
5.1	Blockdiagramm des PTS-Glykolyse-Modells. Die Funktionen $G_1, G_2$ und $G_3$ beschreiben hierbei PTS, Glykolyse und Pyruvatkinase. Die Größen $z_1$ und $z_2$ stehen für die Abflüsse in den weiteren Stoffwechsel und in die Biosynthese. . . . .	120
B.1	Methode 1: Direkte Injektion der Probe in kochendes Ethanol/HEPES-Gemisch, zur Bestimmung von Gesamtkonzentrationen . . . . .	129
B.2	Methode 2: Quenching auf Trockeneis, Aufschluss mit kochendem Ethanol/HEPES-Gemisch, zur Bestimmung intra- und extrazellulärer Konzentrationen (speziell cAMP) . . . . .	130
B.3	Methode 3: Quenching in Trockeneis, Aufschluss mit TRIS/EDTA, zur Bestimmung von Gesamtkonzentrationen . . . . .	131
B.4	Methode 4: Filtrieren, Aufschluss mit Ameisensäure, zur Bestimmung intra- und extrazellulärer Konzentrationen . . . . .	132
B.5	Methode 5: Quenching im Reagenzglas in Trockeneis, Aufschluss mit Perchlorsäure, zur Bestimmung intra- und extrazellulärer Konzentrationen . . . . .	133
B.6	Methode 6: Quenching im Eisbad, Zentrifugieren, zur Bestimmung extrazellulärer Konzentrationen . . . . .	134
B.7	Methode 7: Direktes Filtrieren, Quenching mit Edelstahlkugeln, zur Bestimmung extrazellulärer Konzentrationen . . . . .	135

B.8	Methode 8: Quenching in Methanol, zum Nachweis von Metaboliten im Überstand . . . . .	136
B.9	Methode 9: Direkte Injektion in konzentrierte Perchlorsäure, zur Bestimmung von Gesamtkonzentrationen . . . . .	137
B.10	Methode 10: Quenching in Methanol, Aufschluss mit Perchlorsäure, zur Bestimmung intra- und extrazellulärer Konzentrationen . . . .	138
B.11	Methode 11: Quenching in Methanol, Aufschluss mit kochendem Ethanol/HEPES-Gemisch, zur Bestimmung intra- und extrazellulärer Konzentrationen . . . . .	139

# Tabellenverzeichnis

2.1	Zusammensetzung des Vollmediums für Stammhaltung und 1. Vorkultur. Fleischextrakt und Hefeextrakt wurden eingewogen, gelöst und bei 121°C und 1 bar Überdruck für 30 min autoklaviert. Glycerin wurde danach sterilfiltriert und zugegeben. . . . .	49
2.2	Zusammensetzung des synthetischen Nährmediums für die 2. Vorkultur. Die Mediumsbestandteile wurden eingewogen, gelöst und sterilfiltriert (0.2 µm Porengröße). . . . .	50
2.3	Zusammensetzung des Nährmediums für die absatzweise Prozessführung im Fermenter (Batch-Medium). Die Mediumsbestandteile wurden eingewogen, gelöst und sterilfiltriert (0.2 µm Porengröße). . . . .	51
2.4	Zusammensetzung des Nährmediums für die kontinuierliche Prozessführung im Chemostaten. Die Mediumsbestandteile wurden eingewogen, gelöst und sterilfiltriert (0.2 µm Porengröße). . . . .	52
3.1	Parameter des identifizierten PTS-Modells (Gl. 3.5) . . . . .	66
4.1	Verteilung verschiedener Metabolite zwischen Niederschlag und Überstand nach Quenching in gekühltem Methanol (-70°C) und Aufschluss mit Perchlorsäure (7%) . . . . .	93
4.2	Vergleich der Lebendzellzahlen von <i>Escherichia coli</i> LJ210 aus einer stationären kontinuierlichen Kultur nach verschiedenen Quenching-Methoden bei -70°C, ermittelt durch Färbung mit Acridin-Orange . . . . .	94
4.3	Methoden zur Analytik intrazellulärer Metabolite mit relevanten Fehlerquellen, wie im Text erläutert. Die Nummerierung entspricht der Reihenfolge im Anhang B. . . . .	97

4.4	Wiederfindung von Standards verschiedener Metabolite und auf stationäre Proben aufgestocktem Standard nach vierminütigem Kochen in Ethanol/HEPES (Methode 1, Abb. B.1) . . . . .	98
4.5	PEP:Prv-Verhältnis, Sucrosekonzentration und Phosphorylierungsgrad von EIIA <sup>Crr</sup> in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration während der stationären kontinuierlichen Prozessführung ( $D = 0.1 h^{-1}$ ). . . . .	110
4.6	Antwortzeiten und -höhe (bezogen auf die Gesamtkonzentration des jeweiligen Proteins) auf Sprünge in der extrazellulären Sucrosekonzentration, wie im Text erläutert. . . . .	116
A.1	Zusammenstellung der verwendeten reaktionskinetischen Ansätze für die Stoffwechselwege Sucrose 6-Phosphat-Abbau und zentraler Kohlenhydratabbau . . . . .	125
A.2	(2. Teil) . . . . .	126
A.3	Parameter des cAMP-Modells . . . . .	127

# Zusammenfassung

In der modernen biologischen Forschung ist mehr und mehr ein ganzheitliches Betrachten zellulärer Prozesse gefordert, um zu einem globalen Verständnis der betrachteten Systeme zu kommen. Dies ist Voraussetzung für eine verstärkte und effektivere Nutzung dieser Systeme in Medizin, Biotechnologie und anderen Gebieten. Die mathematische Modellierung verbunden mit einer systemtheoretischen Analyse bietet einen Ansatz mit der dem biologischen Phänotyp zugrunde liegenden Komplexität umzugehen. Neben den metabolischen Netzwerken müssen dabei vor allem auch die komplexen regulatorischen Strukturen und die Signalverarbeitung mitbetrachtet werden.

In dieser Arbeit wird die bakterielle Signalverarbeitung am Beispiel des Sucrose Phosphotransferasesystems (Sucrose PTS) im Bakterium *Escherichia coli* untersucht. Die etwa 20 verschiedenen Phosphotransferasesysteme (PTSs) der Zelle erfüllen neben dem Transport zahlreicher Kohlenhydrate auch die Funktion eines signalverarbeitenden Systems. Extra- und intrazelluläre Signale werden in der aus vier Proteinen bestehenden Kette in wichtige regulatorische Signale umgesetzt, die vor allem den Kohlenstoffmetabolismus und die Chemotaxis betreffen. Im Rahmen der Arbeit wurde ein detailliertes dynamisches mathematisches Modell des Sucrose PTS sowohl bezüglich des Transportes, als auch der Signalverarbeitung entwickelt und dieses mit zahlreichen experimentellen Untersuchungen validiert. Die Arbeit stellt damit auch eine Vorgehensweise im neuentstehenden Forschungsgebiet Systembiologie exemplarisch dar.

Die experimentellen Untersuchungen wurden im Fermenter mit dem gentechnisch veränderten sucrosepositiven W3110-Derivat *Escherichia coli* LJ210 durchgeführt. Verwendet wurde ein mittels Elementaranalyse optimiertes Medium. Es wurde eine Regelstrategie für Fermentationen mit niedriger Gelöstsauerstoffkonzentration entwickelt. Ein experimenteller Schwerpunkt der Arbeit ist die ausführliche Untersuchung der Methoden zur Bestimmung intra- und extrazellulärer Metabolite. Gerade die Messung intrazellulärer Metabolite stellt wegen der kurzen

turn-over-Zeiten von wenigen Sekunden einen kritischen Aspekt der Modellvalidierung dar. Einige Methoden mussten aufgrund nachgewiesener Enzymaktivität bei niedrigen Temperaturen um 0°C verworfen werden. Eine Probenahmetechnik auf der Basis der direkten Injektion der Fermentationsbrühe in eine kochende Ethanol-Puffer-Lösung konnte erfolgreich getestet und angewendet werden. Einige intrazelluläre Konzentrationen konnten so bestimmt werden.

Für die Modellbildung wurde ein systematischer Ansatz verwendet, der auf der Abgrenzung von biologischen funktionellen Einheiten beruht. Neben den verwendeten biologisch motivierten Kriterien wurde ein formalerer Algorithmus unter Verwendung von Clusteranalyse zur Abgrenzung dieser Einheiten mit limitierter Autonomie vorgeschlagen. Für *E. coli* konnte eine funktionelle Einheit "Kohlenstoff-Metabolismus" abgegrenzt werden, in der das PTS eine zentrale Rolle in der Signalverarbeitung innehat. Als Untereinheiten konnten das Sucrose PTS und die Glykolyse identifiziert werden.

Das Modell für das Sucrose PTS wurde mittels der detaillierten Beschreibung der Komplexbildung und des Phosphattransfers zwischen den einzelnen Proteinen der Kette formuliert. Die Parameter des Modells konnten aus der Literatur (*in vitro*), beziehungsweise beruhend auf eigenen Messungen identifiziert werden. Simulationsstudien gestützt von experimentellen Beobachtungen zeigten, dass sich das dynamische Verhalten des Phosphoryltransfers innerhalb des PTS im Bereich einer Sekunde abspielt, so dass für ganzheitlichere Betrachtungen der regulatorischen Funktion des PTS im Organismus eine Beschreibung von stationären Kennlinien ausreichend war. Die schnellen dynamischen Vorgänge konnten hier vernachlässigt werden. Für stationäre Betrachtungen wurde das Verfahren der Metabolischen Flussanalyse verwendet. Ein Kennlinienfeld gemessener Konzentrationen wurde zur Beschreibung der Abhängigkeit des Phosphorylierungsgrad des PTS-Proteins  $EIIA^{Crr}$  von den Eingangsgrößen extrazelluläre Sucrosekonzentration und intrazelluläres PEP:Pyruvat-Verhältnis genutzt.

Zur Validierung dieser Ergebnisse und zur Identifikation sensitiver Parameter wurden Experimente mit variierten Eingangsgrößen durchgeführt und das Ausgangssignal  $EIIA^{Crr}$ -Phosphorylierungsgrad bestimmt. Es wurden hierbei sowohl stationäre Bedingungen bei verschiedenen Verdünnungsraten und Gelöstsauerstoffkonzentrationen, als auch dynamische Veränderungen mittels verschiedener Anregungen über die extrazelluläre Sucrosekonzentration betrachtet. Hier wurden Puls-, Sprung- und Fütterungsstopp-Experimente durchgeführt. Die Übereinstimmung zwischen Experiment und Simulationsergebnissen erwies sich nach Parameteranpassung als gut. Gleiches gilt auch für ein erweitertes Modell, das die Glykolyse miteinschließt.

In abschließenden weiterführenden Simulationsstudien wurde das Modell verwendet, um offene biologische Fragestellungen zu bearbeiten. Neben der Veränderung der signalverarbeitenden Eigenschaften des Sucrose PTS bei Veränderung von PTS-Proteinkonzentrationen wurde die PTS-vermittelte Kohlenhydrat-Chemotaxis betrachtet. Die nichtphosphorylierte Form eines PTS-Proteins konnte hier als mögliches Verbindungsglied zur Chemotaxis-Signalkette identifiziert werden.

In einem abschließenden Ausblick werden allgemeinere aktuelle Fragen des jungen Forschungsgebietes Systembiologie kurz umrissen.

# Summary

Modern biological research and biotechnological application requires more and more a holistic view on cellular processes for a global understanding of the observed system. This enables a more efficient application of these systems in medicine, biotechnology, and other fields. Mathematical modeling combined with system theoretical analysis provides a efficient approach to deal with the underlying biological complexity. Beside complex metabolic networks complex regulatory structures and signal transduction networks have to be considered, also.

In this thesis the bacterial signal processing was investigated concerning as an example the sucrose phosphotransferase system (sucrose PTS) in the bacterium *Escherichia coli*. The about 20 different phosphotransferase systems (PTSs) of the cell fulfill besides the transport of various carbohydrates, also the function of one signal processing system. Extra- and intracellular signals are converted within the PTS protein chain to important regulatory signals affecting especially carbon metabolism and chemotaxis. A detailed dynamical model of the sucrose PTS has been developed describing transport and signal processing function. The model has been validated with numerous experiments. This approach is typical in the new evolving research field of systems biology.

The experimental investigations were performed in a CSTR using the sucrose positive derivative LJ210, based on *Escherichia coli* strain W3110. The medium components were optimized by analyzing the elementary composition of the cell. A control strategy for fermentations with low dissolved oxygen concentrations was developed. A main experimental focus of this thesis was the detailed investigation of methods for determining intra- and extracellular metabolite concentrations. Especially the measurement of intracellular metabolites was critical for the validation because of very short turn over times of some seconds. Some methods had to be rejected because enzyme activity was not stopped sufficiently at temperatures near 0°C. A sample preparation technique using a boiling ethanol buffer solution was successfully tested and applied. Some intracellular metabolite concentrations could therefore be measured.

For the modeling a systematic approach was used. Here complex metabolic networks were decomposed into smaller functional units. Beside the used biologically based criteria for the demarcation of such units, a formal algorithm based on cluster analysis was suggested. Concerning *E. coli* a functional unit “carbon metabolism” could be defined. Here the PTS played a central role in signal processing. As subunits, the sucrose PTS and the glycolysis could be identified.

The sucrose PTS model was formulated using a detailed description of complex formation and phosphate transfer between the chain proteins. Model parameters were taken from literature or were identified with own experiments. In steady state calculations metabolic flux analysis was used. Simulation studies together with experimental hints showed that the dynamic behaviour of phosphate transfer in the PTS runs within one second. Therefore for doing a more global investigation a description of steady state characteristics was sufficient for describing the signaling properties of the sucrose PTS. A characteristic field of measured variables described the degree of phosphorylation of the PTS protein EIIA<sup>Crr</sup> as a function of the input variables extracellular sucrose concentration and intracellular PEP:pyruvate ratio.

For validating these results and for the identification of some sensitive parameters experiments were performed with varied input variables. The output signal degree of phosphorylation of EIIA<sup>Crr</sup> was measured. Steady state conditions with varying dilution rate and dissolved oxygen concentration and dynamical variations applying different stimuli to the culture were considered. Furthermore, puls, shift and stop feeding experiments with limiting sucrose concentrations were performed. Simulation and experimental results matched well. The same holds for the expanded sucrose PTS and glycolysis model.

In continuative simulation studies the identified model is used to address some open biological questions. The change of the signaling behaviour with changing PTS protein concentrations was investigated as well as the PTS induced carbohydrate chemotaxis. The unphosphorylated form of the EI dimer was identified as the most likely link to the chemotaxis signal chain.

In a short outlook, a few relevant and general questions concerning the evolving systems biology were summarized.



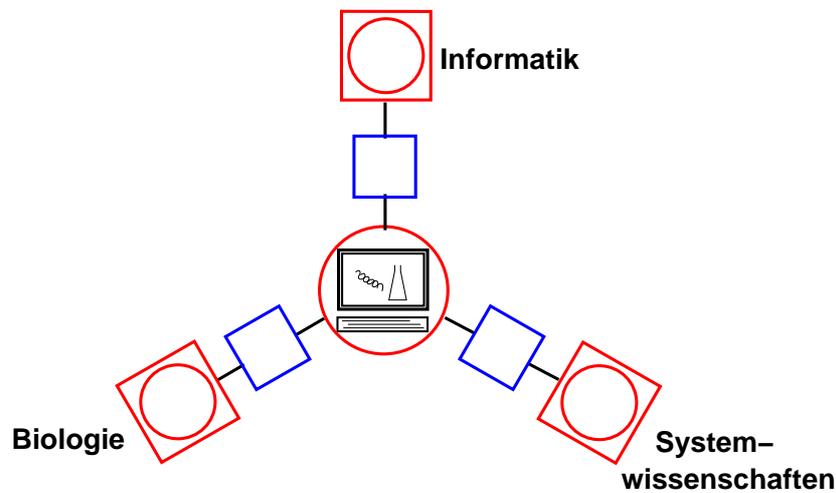
# Kapitel 1

## Einführung

### 1.1 Übersicht

Für das beginnende 21. Jahrhundert stellen die Biologie und Biotechnik zentrale Wachstumsgebiete dar. Dies trifft sowohl auf Forschung und Lehre, als auch auf die technische und wirtschaftliche Umsetzung zu. Zahlreiche neu etablierte Forschungsbereiche und Studiengänge sowie die Gründungswelle biotechnisch ausgerichteter Firmen belegen dies.

Eine zentrale Rolle spielen dabei die gentechnische Gestaltung, sowie die medizinische und technische Nutzung zellulärer Systeme. Die Umsetzung molekularbiologischer Erkenntnisse erfordert ein ganzheitliches Verständnis der Funktionsweise solcher Systeme, das aber bisher kaum vorhanden ist. Dies ist zum einen darauf zurück zu führen, dass ein Großteil der experimentellen Untersuchungen bisher qualitativer und beschreibender Natur und auf das Verständnis biologischer Details ausgerichtet ist. Quantitative Daten sind daher nur unzureichend verfügbar. Allerdings werden hier durch die fortschreitende Neuentwicklung und Verbesserung von Analysemethoden deutliche Fortschritte erzielt. Doch auch die weitgehende Gesamterfassung des Systemzustandes wird aufgrund der Komplexität der Systeme nicht automatisch zu einem ganzheitlichen Verständnis funktionaler Zusammenhänge führen. Zelluläre Systeme setzen sich aus Funktionseinheiten zusammen, die aufgrund ihrer physiologischen Funktion, ihrer genetischen Struktur oder ihrer Signalverarbeitung und Regulation gegenüber ihrer Umwelt relativ abgeschlossen sind und damit eine beschränkte Autonomie besitzen [73, 82]. Sowohl zwischen den Funktionseinheiten, als auch zwischen der Vielzahl von



**Abbildung 1.1:** Systembiologie (Biosystemtechnik) als interdisziplinäres Arbeitsgebiet

Komponenten, aus denen eine Funktionseinheit im Allgemeinen besteht, existieren durch Stoff- und Informationsflüsse vermittelte, komplexe Wechselwirkungen. Das ganzheitliche Verhalten zellulärer Systeme ist gedanklich kaum nachvollziehbar. Es besteht deshalb die Gefahr, dass experimentelle Befunde fehlinterpretiert werden und zu falschen Schlussfolgerungen führen.

Das Erreichen einer quantitativen und ganzheitlichen Verhaltensbeschreibung erfordert eine system- und signalorientierte Betrachtungsweise zellulärer Funktionseinheiten. Dazu muss die große Menge zu verarbeitender Daten so aufbereitet werden, dass sie für systemwissenschaftliche Betrachtungen zur Verfügung stehen. Die Informatik leistet hier einen wichtigen Beitrag. Es ist daher eine enge Kooperation von Biologen, Systemwissenschaftlern und Informatikern erforderlich (Abb. 1.1). Eine solche fachübergreifende Zusammenarbeit ist der Forschungsschwerpunkt Systembiologie (Biosystemtechnik) der Universität Stuttgart [<http://www.sysbio.de>], in dem die vorliegende Dissertation entstanden ist.

Die Arbeit behandelte die Signalverarbeitung von Bakterien am Beispiel des Phosphoenolpyruvat:Sucrose Phosphotransferasesystem (Sucrose PTS) in *Escherichia coli*. *E. coli* hat etwa 20 Phosphotransferasesysteme (PTSs). Diese Transportsysteme stellen zugleich ein wichtiges signalverarbeitendes System des Bakteriums dar. Sowohl die extrazelluläre Konzentration an transportiertem Kohlenhydrat, als auch der intrazelluläre Energiezustand der Zelle werden auf biologische Art verrechnet und verschiedene regulatorisch wirkende Signale erzeugt, die den Metabolismus der Zelle auf vielfältige Art beeinflussen. Ziel der Arbeit war es, ein mathematisches Modell des Sucrose PTS aufzustellen, dieses mit geeigneten Expe-

rimenten und analytischen Methoden zu bestätigen und die Nützlichkeit des Modells anhand von weiterführenden Simulationsstudien zu aktuellen Forschungsaufgaben zu zeigen. Die Arbeit hatte sowohl biologische, als auch systemtheoretische Schwerpunkte und zeigt so, dass der Brückenschlag zwischen diesen Disziplinen möglich und sogar notwendig zum vollständigen Verständnis biologischer Systeme ist. Schwerpunkte aus der biologischen Forschung waren: 1) die Methodenentwicklung zur Analytik intrazellulärer Metabolite, sowie die Erfassung von intrazellulären Antworten auf dynamische Veränderungen der Umgebungsbedingungen und 2) weiterführende Simulationsstudien zur Variation von Proteinkonzentrationen und zur Chemotaxis. Als systemwissenschaftliche Schwerpunkte der Arbeit waren zu verstehen: Die Modellbildung zum Sucrose PTS und die mathematischen Betrachtungen zur Abgrenzung biologischer Funktionseinheiten. Doch nur durch die Verbindung von quantitativer Analyse und mathematischer Modellierung und Simulation auf der Basis systemwissenschaftlicher Betrachtungen ist eine vollständige Beschreibung biologischer Systeme zu erreichen [80]. In diesem Sinne liefert diese Arbeit einen Beitrag zum ganzheitlichen Verständnis der PTSs und ihrer Funktion im Metabolismus.

### **Gliederung der Arbeit**

Im folgenden Teilkapitel werden die Grundelemente der bakteriellen Signalverarbeitung umrissen. Danach wird der Stand des Wissens zu den PTSs und zur Signaltransduktion über der PTSs dargestellt und bisherige mathematische Ansätze zur Beschreibung diskutiert. Neben Katabolitenrepression und Induktorausschluss wird auch auf PTS-vermittelte Chemotaxis eingegangen. Kap. 2 enthält eine Beschreibung des verwendeten Materials und der zur Validierung des entwickelten mathematischen Modells eingesetzten experimentellen Methoden. Spezielle Teilkapitel des Ergebnisteils sind der Optimierung des Mediums für die kontinuierliche Prozessführung und der Regelung des Gelöstsauerstoffs bei niedrigen Konzentrationen gewidmet (Kap. 4.1). Der Bestimmung der intra- und extrazellulären Metabolitkonzentrationen kommt eine zentrale Bedeutung für die Überprüfung des Modells zu. Verschiedene Methoden wurden neu entwickelt, beziehungsweise aus der Literatur übernommen und die geeignetsten Methoden ausgewählt (Kap. 4.2.1). Die Bestimmung spezifischer Aktivitäten ausgewählter Enzyme um 0°C ist dabei ein wichtiges Kriterium (Kap. 4.2.1.1).

In Kap. 3 werden die verwendete Modellierungssystematik und die erstellten mathematischen Modelle für Sucrose PTS und Glykolyse beschrieben. Zur wichtigen Frage der Abgrenzung biologischer Funktionseinheiten wird dabei, ergänzend zu den verwendeten verbalen Kriterien, ein formaler Algorithmus vorgeschlagen. Zur

schnellen Dynamik des Sucrose PTS und zum EI-Monomer-Dimer-Zyklus werden grundlegende Simulationsstudien durchgeführt, die in die Berechnung stationärer Kennlinien zur Beschreibung des Sucrose PTS münden. Die durchgeführte metabolische Flussanalyse dient dabei der Abschätzung einiger Parameter für das dynamische Modell der Glykolyse und der Abflüsse von Vorläufermolekülen in die Biosynthese. Des Weiteren werden die verwendeten Rechnerwerkzeuge zur Modellierung, Sensitivitätsanalyse und Parameteridentifikation dargestellt.

Kap. 4 enthält den Vergleich der experimentell erhaltenen Ergebnisse mit den Simulationsergebnissen. Auf der Basis des identifizierten Modells lassen sich nun Kennlinien für das PTS angeben, welche die signalverarbeitenden Eigenschaften des Sucrose PTS beschreiben. Es steht nun ein experimentell überprüftes dynamisches Modell der Glykolyse von *Escherichia coli* zur Verfügung. In weiterführenden Simulationsstudien wird das Modell verwendet, um aktuelle Forschungsfragen auf diesem Gebiet zu untersuchen. Neben der Beschreibung des Systemverhaltens bei gentechnischen Veränderungen der Gesamtkonzentrationen der PTS-Proteine, ist auch die PTS-vermittelte Chemotaxis Gegenstand von Simulationsstudien.

Nach der Diskussion und den Schlussbemerkungen zu den Untersuchungen rund um das Sucrose PTS (Kap. 5), bildet das letzte Unterkapitel einen Ausblick auf das aktuelle und neu entstehende Forschungsgebiet Systembiologie (Kap. 5.1). Neben aktuellen Arbeiten, werden auch neue Ansätze und offene Fragestellungen diskutiert, die zukünftige Forschung auf diesem Gebiet bestimmen könnten. Ein kurzer Blick wird zum Abschluss auf philosophische Aspekte geworfen, die mit der ganzheitlichen Betrachtung biologischer Systeme korrelieren, denn die Systemtheorie entwickelt sich mehr und mehr zur wissenschaftlichen Basis einer veränderten Weltanschauung [79].

## 1.2 Bakterielle Signalverarbeitung

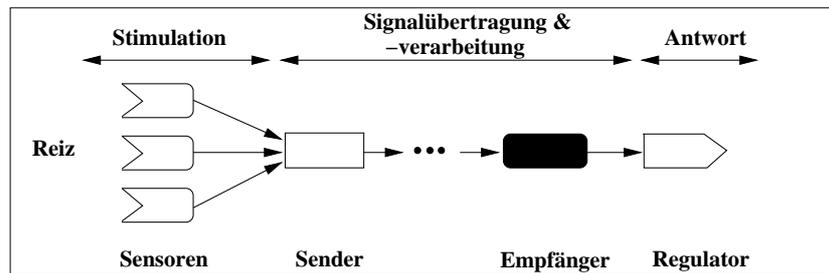
Funktion und Leistung einer jeden lebenden Zelle beruhen auf einem komplexen Netzwerk biochemischer Prozesse, in dem viele Einzelreaktionen in geordneter Weise stattfinden. Schon das "einfache" Bakterium *Escherichia coli* besitzt etwa 4800 Gene, ungefähr 2500 Proteine und Enzyme, zwischen 50 und 70 Sensoren zur Überwachung von Veränderungen der Umgebung und hunderte von metabolischen Stoffwechselwegen, in denen Substrate in Zwischenprodukte, Endprodukte und zelluläre Strukturbestandteile umgewandelt werden [87]. Man findet daher

schon in einer einfachen Zelle mehr als tausend verschiedene biochemische Reaktionen, die nebeneinander, hintereinandergeschaltet und vernetzt ablaufen und deshalb einer ständigen Kontrolle und Regulation bedürfen. Wollen wir die Leistungen einer Zelle in ihrer Gesamtheit verstehen, so müssen wir vor allem die regulatorischen Mechanismen kennen, die den geordneten Ablauf der Einzelreaktionen ermöglichen und damit einen zentralen Teil der Biochemie der Zelle ausmachen.

Ein erstes Ziel der zellulären Regulation ist es, Biosynthese, Abbau und energetische Verwertung von Metaboliten und Makromolekülen zu koordinieren und dem aktuellen Bedarf, den Umweltbedingungen und dem Entwicklungszustand der Zelle anzupassen. Die Zelle muss jedoch nicht nur die intrazellulären Reaktionen aufeinander abstimmen, sie muss auch ständig mit der Umwelt kommunizieren und muss in der Lage sein, auf geänderte Umweltbedingungen auf flexible Weise zu reagieren. Physikalische oder chemische Reize, die den Umgebungszustand oder das Nährstoffangebot signalisieren, werden von der Zelle registriert und in Änderungen intrazellulärer Reaktionen umgesetzt. Wie eine Zelle mit der Umwelt kommuniziert und nach welchem Mechanismus sie extrazelluläre Signale verarbeitet, ist daher ein weiterer Aspekt der zellulären Regulation.

In den Zielen der Regulation bestehen Unterschiede zwischen einzelligen Systemen und vielzelligen Organismen, obwohl auch Einzeller untereinander kommunizieren und koordinierte gemeinsame Handlungen ausführen. In der prokaryotischen Einzelzelle zum Beispiel werden Gene an- und abgeschaltet sowie Enzyme aktiviert oder inaktiviert, um den Stoffwechsel der Zelle dem Nahrungsangebot, den Ionenbedingungen oder der Temperatur des umgebenden Milieus anzupassen. Alle Einzelzellen stehen in unmittelbarem Kontakt mit der Umgebung, und sie reagieren unter gegebenen Bedingungen weitgehend unabhängig und in ähnlicher Weise auf Umgebungssignale. Primäres Ziel der Regulation ist es, Wachstum und Teilung der Einzelzelle zu gewährleisten. Auch einzellige Eukaryoten wie die Hefe verfolgen dieses Prinzip. Im Zellverband der Metazoen dagegen sind die meisten Zellen gegenüber der Umwelt abgeschirmt und nur wenige Zellen stehen in direktem Kontakt zum umgebenden Milieu, zur "Außenwelt". Die Kommunikation mit der Außenwelt wird von spezialisierten Zellen übernommen, während die Mehrzahl der Zellen in der weitgehend konstanten Umgebung im "Innern" des Organismus lebt und nur mittelbar auf Umgebungssignale reagiert. Die mit der Bildung vielzelliger Organismen einhergehende Spezialisierung machte es deshalb notwendig, Wege der Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen zu entwickeln [69]. Die Logik prokaryotischer und eukaryotischer Signaltransduktion ist dabei aber durchaus ähnlich [84].

Die Anpassung des Stoffwechsels von Einzellern an veränderte Umgebungsbe-



**Abbildung 1.2:** Allgemeines Schema der zellulären Signalübertragung und Verarbeitung nach [70]

dingungen kann sehr rasch erfolgen, ebenso wie die unverzügliche Adaptation an solche Veränderungen. Adaptationen sind in der Regel vorübergehend, d.h., sie halten nur “wenig länger” als die sie auslösende Umweltbedingung an. Allerdings können auch neue angepasste Strukturen und Verhaltensweisen entstehen, die den Organismus besser auf veränderte Umweltbedingungen reagieren lassen (Epigenese). Prokaryoten überwachen ihre Umgebung durch membrangebundene und intrazelluläre Sensoren und durch ihre Transportsysteme wie die PTSs. Komplexe Signaltransduktionswege und globale regulatorische Netzwerke sind mit den Sensoren verbunden und führen die globale Regulation von Stoffwechselnetzwerken, zellulären Differenzierungsprozessen und des Verhalten von Bakterienpopulationen durch [87]. Eine große Anzahl von Rückkopplungs- und Vorwärtsschleifen (feedback- und feedforward) sind hierbei beteiligt [73] und helfen beim Verständnis der Zelle als komplexes informationsverarbeitendes System [83]. Dieses System enthält verschiedene funktionelle Einheiten, die hierarchisch strukturiert sind [80] und zur systematischen Modellierung biologischer Systeme verwendet werden können [73], wie im Kap. 3.1 dargestellt. Die PTSs spielen dabei eine entscheidende Rolle in der funktionellen Einheit Kohlenstoff-Metabolismus.

In der molekularen und biochemischen Umsetzung von Signaltransduktionssystemen sind vor allem Proteine beteiligt, die den Prozess vom Empfang eines Reizes durch Rezeptormoleküle über die Signalübertragung und -verarbeitung bis zur zellulären Antwort umsetzen [72]. Die beteiligten Partner lassen sich dabei allgemein in Sensoren, Sender, Empfänger und Regulatoren einteilen (Abb. 1.2). Der Reiz wird über Rezeptoren erfasst und vom Sensor in ein Signal umgewandelt, welches von einem Sender und Empfänger an einen Regulator weitergegeben wird. Die Antwort kann zum Beispiel in der Veränderung der Expression bestimmter Gene bestehen, was zum Zu- oder Abschalten der entsprechenden Stoffwechselwege führt oder auch zur Veränderung des Bewegungsverhaltens der Zelle (Taxis). Ein einfaches System von Proteinen, das in dieser Art zusammenarbeitet,

wird als Zwei-Komponenten-System bezeichnet. Sie stellen eine wichtige Form der Signaltransduktion in Bakterien dar. Die molekulare Basis dieser Form der Signaltransduktion ist oft die zeitweilige Phosphorylierung der beteiligten Proteine. Das Gesamtverhalten gut beschriebener Zwei-Komponenten-Systeme kann bezüglich Signalamplifikation und Gedächtniseffekten mit der Funktionsweise eines neuronalen Netzes verglichen werden [49, 119]. Entscheidend für die Integration der vielen verschiedenen Signale ist der modulare und hierarchische Aufbau des gesamten Signaltransduktionssystems der Zelle (siehe Kap. 3.1) [82, 80]. Bei der Integration entstehen oft aus digitalen Ein-Aus-Signalen (zum Beispiel Protein phosphoryliert / nicht phosphoryliert) analoge Signale (zum Beispiel second messenger-Konzentrationen) [119].

Im Folgenden wurde nun auf die PTSs in *Escherichia coli* eingegangen. Die PTSs wurden im Rahmen des Forschungsschwerpunkt Biosystemtechnik der Universität Stuttgart als ein Beispielsystem ausgewählt, anhand dessen das Vorgehen bei der mathematischen und systemwissenschaftlichen Beschreibung signalverarbeitender bakterieller Systeme und des resultierenden komplexen Verhaltens erarbeitet wurde.

## **1.3 Phosphotransferasesysteme (PTSs) in *Escherichia coli***

### **1.3.1 Biologische Grundlagen**

*Escherichia coli* ist ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes, nicht sporenbildendes Bakterium. Es besitzt normalerweise vier bis acht Flagellen je Zelle, ist beweglich und stäbchenförmig. Es gehört zu den Enterobacteriaceae und schließt eine große Anzahl unterschiedlicher Stämme ein. Viele dieser Stämme sind gewöhnliche, harmlose Bewohner des Säugetierdarms und wurden deshalb in die Sicherheitsstufe 1 eingestuft, z.B. der hier verwendete Stamm *E. coli* K-12 und sein Derivat LJ210. Andere dagegen verursachen Infektionen des Verdauungs- und Urogenitalbereichs bei Mensch und Tier. Auch Infektionen des Blutes und des Zentralen Nervensystems sind bekannt. Einige Stämme von *E. coli* sind daher in Sicherheitsstufe 2 (geringes Risiko für Mensch und Umwelt) eingestuft [2]. Struktur, biochemische Funktion und Genetik dieses Organismus sind gut studiert und machen ihn zum meist bearbeiteten aller zellulären Organismen. *E. coli* wird von vielen Gruppen erforscht und hatte bzw. hat eine zentrale Rolle in der Entwicklung der molekularen Biologie inne [140].

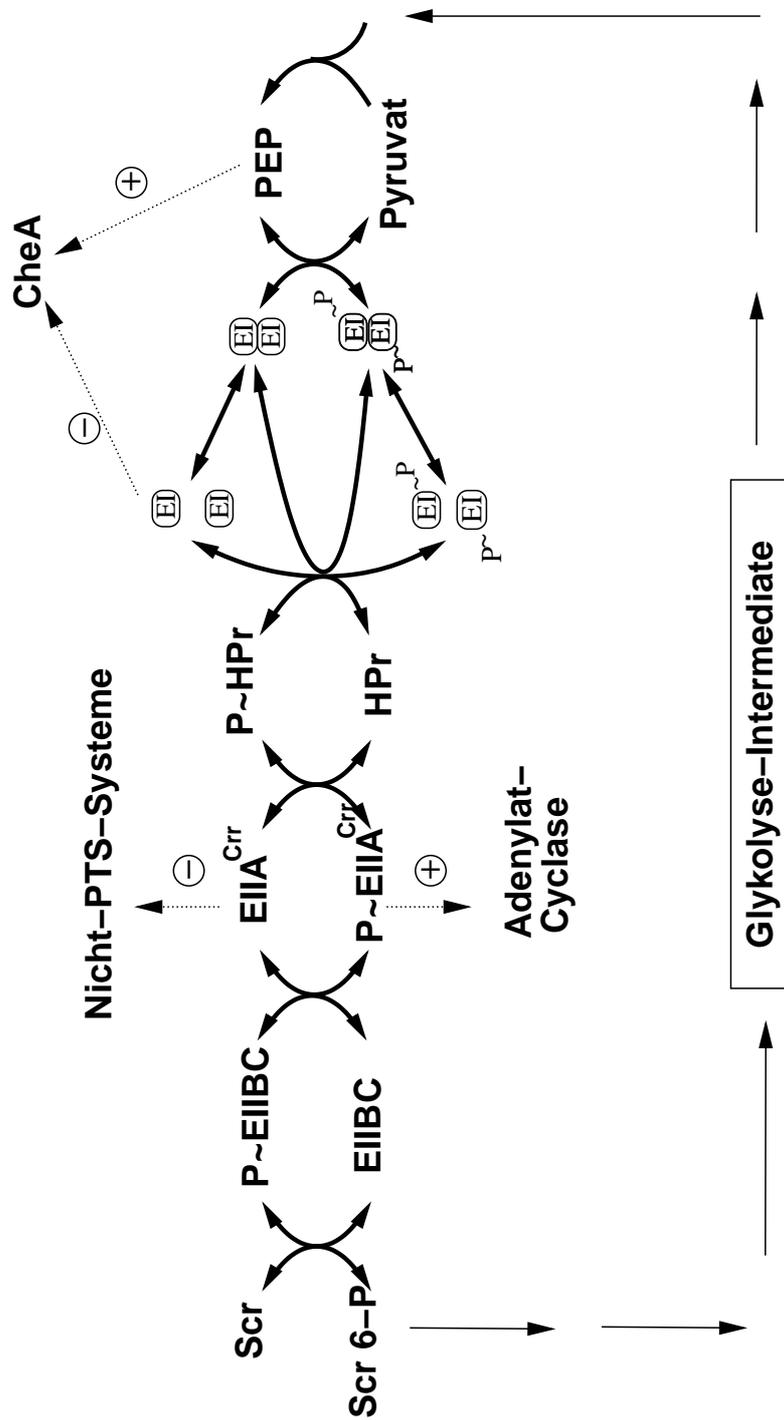
*Escherichia coli* kann, so wie Bakterien allgemein, eine große Anzahl von Substraten verwerten und deren Transport über die cytoplasmatische Membran wird katalysiert durch eine Vielzahl von spezifischen Transportsystemen [68]. Wie die meisten Bakterien kann sich *E. coli* an seine sich stets ändernde Umwelt anpassen, um mit anderen Organismen um die limitierten Nährstoffe konkurrieren zu können. Um die Umgebung zu überwachen und zwischen verschiedenen Substraten zu wählen, benützt die Zelle diverse Sensoren. Das in dieser Arbeit beschriebene PTS ist sowohl Transport-, als auch Sensor-System [86, 122].

Die katalysierte Gesamt-Reaktion eines PTS lautet:



Die PTSs transportieren Kohlenhydrate in die Zelle. Das Kohlenhydratmolekül wird dabei während der Aufnahme phosphoryliert. Die übertragene Phosphorylgruppe stammt vom Phosphoenolpyruvat (PEP). Transportprozesse in Verbindung mit chemischer Modifikation des Substratmoleküls werden im Allgemeinen als Gruppentranslokation bezeichnet und stellen einen Sonderfall der ABC-Transporter dar. Diese stellen eine der größten Transporterfamilien dar. ABC bedeutet ATP-Binding-Cassette. Diese Transporter benötigen ATP um einen Stofftransport zu gewährleisten. Die PEP-abhängige PTSs transportieren eine weite Palette von Substraten. Dazu gehören viele Mono- und Disaccharide, wie Glucose, Fructose, Mannose, Sucrose, Maltose, und Trehalose, aber auch andere Substrate, wie Glucosamin, Mannitol und Glucitol. Eine vollständige Aufstellung ist in [112, 122] enthalten.

Die Phosphorylgruppe wird über eine Kaskade cytoplasmatischer und membranständiger Proteine weitergereicht und schließlich auf das transportierte Substratmolekül übertragen. Für das in dieser Arbeit genauer untersuchte Sucrose PTS sind die molekularen Komponenten und ihr Ineinandergreifen in Abb. 1.3 dargestellt. Die PEP-abhängige Protein-Kinase Enzym I (EI) und das Histidin-Protein (HPr) sind lösliche cytoplasmatische Proteine, die an der Phosphorylierung aller Kohlenhydrate mitwirken und daher als allgemeine PTS-Proteine bezeichnet werden. Die Enzyme II (EII) dagegen sind kohlenhydratspezifisch und können aus einem einzelnen membranengebundenen Protein mit drei Domänen bestehen, oder, so wie für Sucrose, aus zwei Proteinen, von denen zumindest eines membranständig ist. Für Sucrose ist es das Protein EIIBC<sup>Scr</sup> [122]. Im Allgemeinen enthält das EII drei (IIA, IIB, IIC) und manchmal vier (IID) funktionelle Domänen, die entweder frei oder fusioniert vorliegen können und auch in verschiedener Reihenfolge wie z.B. bei den glucose- und sucrosespezifischen Transportern EIICB<sup>Glc</sup>,



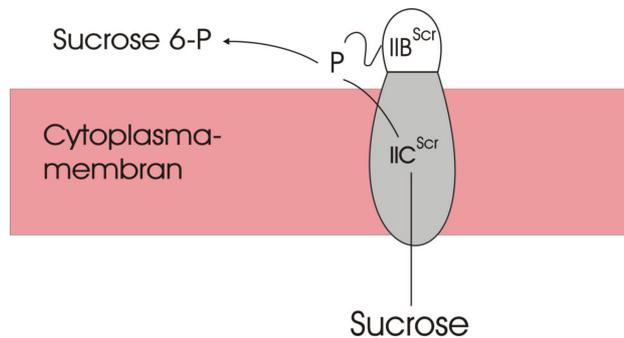
**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung des PTS für Sucrose ('-' Bindung, '~' energiereiche Bindung). Durchgezogene Pfeile stellen biochemische und gestrichelte Pfeile regulative Wechselwirkungen (⊕positiv, ⊖ negativ) dar.

bzw. EIIBC<sup>Scr</sup>. Die hydrophile EIIA-Domäne kann durch P-HPr phosphoryliert werden und überträgt die Phosphorylgruppe auf die ebenfalls hydrophile EIIB-Domäne. Die EIIC-Domäne enthält sechs bis acht potentielle Transmembrandomänen, die zur Bildung des Transmembrankanals benötigt werden. Seit der Entdeckung des PTS vor etwa 40 Jahren [77] wurden mehr als 40 Proteine dem PTS direkt zugeordnet, sowie eine rasch ansteigende Zahl an Nicht-PTS-Proteinen, die mit dem PTS in Wechselwirkung stehen [86, 137].

EI (Gen *ptsI*) besitzt ein Molekulargewicht von 63.4 kD und kann sowohl als Monomer, als auch als Dimer vorliegen. Die Übertragung der Phosphorylgruppe vom PEP ist nur auf das EI-Dimer möglich [56, 89, 108, 166]. Für die Übertragung der Phosphorylgruppe zum HPr ist die Situation unklar, sowohl das EI-Monomer, als auch das Dimer kommen in Frage (siehe auch Abb. 1.3) [20]. Ein Hinweis zur Klärung dieser Frage kann mit Hilfe von Simulationsstudien gewonnen werden (siehe Kap. 3.2.2, Seite 68). Im Dimer wird pro monomerer Untereinheit eine Phosphorylgruppe gebunden [166, 163]. Es wurden auch kovalent-verbundene EI-Dimere und Trimere nachgewiesen [46]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass EI auch durch eine Acetatkinase und entweder ATP oder GTP phosphoryliert werden kann, wobei die Phosphorylgruppe in diesem Fall vom Nukleotid zu einer Acylgruppe in der Acetatkinase und dann reversibel zum EI transferiert wird [20]. Es ist unklar, ob dies auch in einem physiologisch relevanten Bereich eine Rolle spielt. Des Weiteren wurde eine ATP-abhängige Kinase EI-K beschrieben, die EI ebenfalls phosphorylieren kann und die durch NADH und NADPH gehemmt wird [23, 24]. Die hier gewonnenen Ergebnisse sind aber noch zu unklar, so dass beide Enzyme in dieser Arbeit nicht mit in Betracht gezogen wurden. Gleiches gilt für die Kopplung der PTS-Aktivität an das Redox-Potential der Zelle [129] und die beschriebenen Effekte des Phosphat-Pools und der Expression der Polyphosphat-Kinase auf die Glucoseaufnahme [90].

HPr (Gen *ptsH*) ist ein kleines, monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 9,1 kD. Es wird durch EI~P an der N-1-Position eines Histidins phosphoryliert. Eine HPr-ähnliche Domäne wurde im fructosespezifischen Phosphotransfer-Protein FPr von *E. coli* gefunden. FPr kann HPr in Mutanten ersetzen, in denen HPr fehlt [122]. Weitere genetisch veränderte HPr-ähnliche Proteine wurden zur Aufklärung des Mechanismus der PTS-vermittelten Chemotaxis eingesetzt [97] (siehe dazu Kap. 1.4.2 und Kap. 4.9.2).

EIIA<sup>Crr</sup> (Gen *crr*) ermöglicht den Transport von Glucose in *E. coli*. Crr steht für carbohydrate repression resistance und deutet damit bereits auf die wichtige zusätzliche regulatorische Funktion dieses Proteins hin (siehe dazu Kap. 1.4.1). Das Protein ist 18.2 kD groß, ist hitzestabil und besitzt eine starke Tendenz Oligomere zu formen. Es wird ebenfalls für die Aufnahme und Phosphorylierung an-



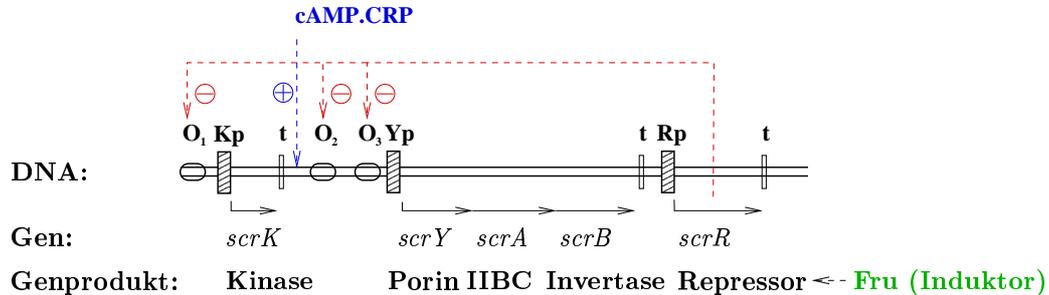
**Abbildung 1.4:** Der sucrosespezifische Transporter EIIBC<sup>Scr</sup> formt mit der C-Domäne einen Translokationsmembran durch die Cytoplasmamembran, durch den das extrazelluläre Substrat Sucrose in die Zelle transportiert wird.

derer PTS-Kohlenhydrate benötigt, wie z.B. Sucrose. Das ist in Zellen möglich, die das natürlich vorkommende, EIIBC<sup>Scr</sup>-kodierende Plasmid (pUR400, [143]) besitzen. Sucrose stellt kein natürliches Substrat für *E. coli* K-12 dar, für andere *E. coli*-Stämme jedoch schon. Das verwendete Plasmid stammt aus *Salmonella typhimurium*. Auch die Aufnahme von Trehalose über EII<sup>Tre</sup>, sowie Glucose über das kryptische Maltose-System MalX sind abhängig von EIIA<sup>Crr</sup> [122]. Das EIIBC<sup>Scr</sup>-kodierende Plasmid wurde zur Konstruktion des in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* K-12-Derivats LJ210 verwendet. Insgesamt sind bisher etwa 20 kohlenhydratspezifische EIIs für *E. coli* beschrieben [122].

EIIBC<sup>Scr</sup> (Gen *scrA*) ist sucrosespezifisch. Eine Domäne des Proteins formt einen Translokationskanal durch die Cytoplasmamembran, durch den das Substrat Sucrose in das Cytoplasma der Zelle transportiert wird (Abb. 1.4). Das aktive Enzym liegt, so wie alle EII, als Dimer vor [143]. Das Glucose-spezifische Gegenstück EIICB<sup>Glc</sup> (Gen *ptsG*), formt ebenfalls mit einer Domäne einen Kanal durch die Cytoplasmamembran [122].

Das Sucrose-spezifische EIIBC<sup>Scr</sup> (ScrA) ist mit dem Porin ScrY und der Invertase ScrB im *scrYAB*-Operon kodiert (Abb. 1.5) und zusammen mit dem *scrK*-Operon (Kinase ScrK) durch den Repressor ScrR negativ reguliert [60, 142]. Die beiden Operons, die durch das gemeinsame Regulatorprotein ScrR reguliert werden, bilden das *scr*-Regulon. Der entsprechende molekulare Induktor ist intrazelluläre Fructose. Das *scrYAB*-Operon ist Mitglied des *crpA*-Modulon. Im Gegensatz zum *scrK*-Gen, ist die Expression des *scrYAB*-Operons zusätzlich noch vom übergeordneten, globalen Regulator cAMP.CrpA abhängig [60, 161]. Dies muss bei der Modellierung und bei der Analyse der Simulationsergebnisse mitberücksichtigt werden.

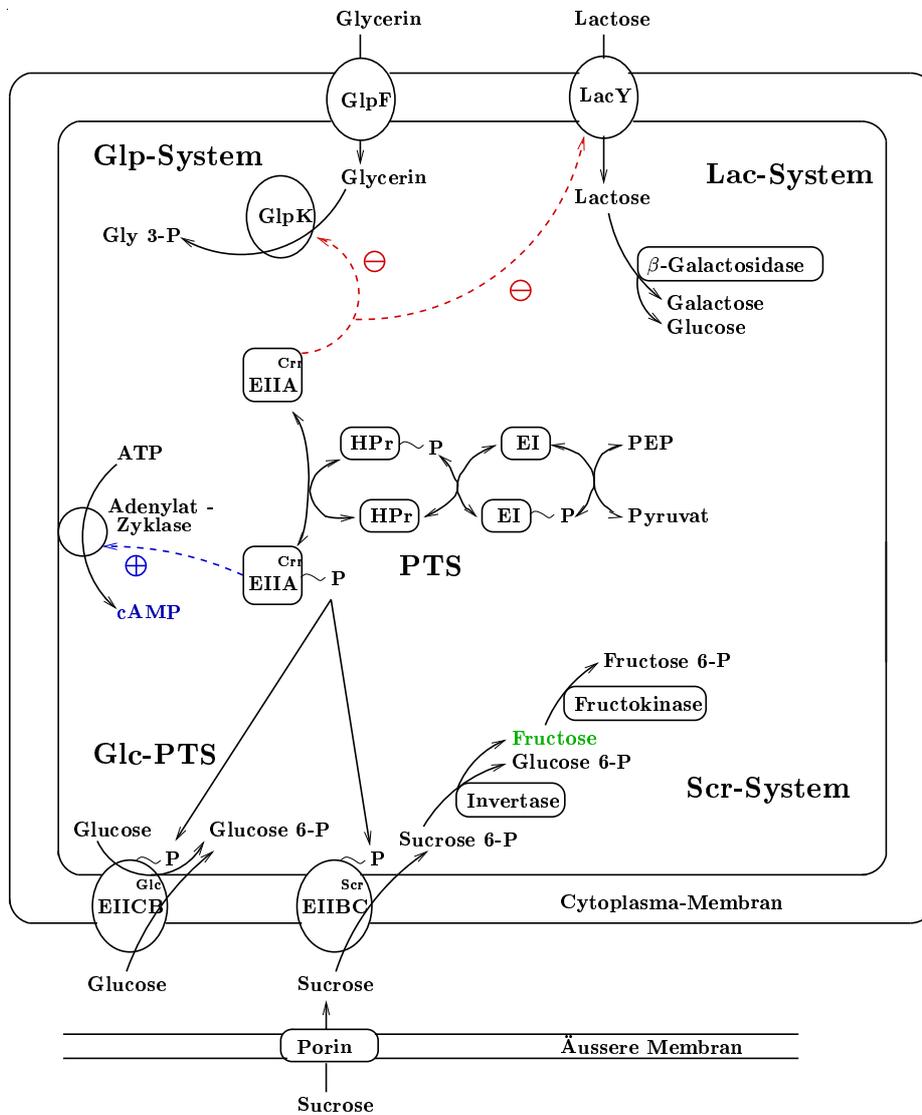
## scr-Regulon



**Abbildung 1.5:** Schema des *scr*-Regulons. Promotoren (p), Operatoren ( $KO_1$ ,  $YO_2O_3$ ) und Terminatoren (t) sind durch schattierte Rechtecke, offene Ellipsen und kleinere offene Rechtecke dargestellt.  $\oplus$  steht für positiven regulatorischen Einfluss durch cAMP.CrpA und  $\ominus$  für negativen Einfluss durch den ScrR-Repressor [162].

Zur Charakterisierung des Sucrose PTS wurde das *Escherichia coli* K-12 / W3110-Derivat LJ210 (LJ110 [172] *scrK*<sup>+</sup> *scrY*<sup>+</sup> *scrA*<sup>+</sup> *scrB*<sup>+</sup> *scrR*<sup>+</sup>) verwendet [60, 142, 143]. Die *scr*-Gene wurden vom *Salmonella typhimurium*-Plasmid pUR400 über den Multicopyvektor pJOE637 in *E. coli* LJ110 gebracht. LJ210 besitzt dadurch ein PTS-abhängiges Sucrose-Transportsystem (Sucrose PTS) und Stoffwechselwege, die zusammen mit dem Glucose PTS in Abb. 1.6 gezeigt sind. Sucrose ist eine relativ billige Kohlenstoff- und Energiequelle und spielt eine wichtige Rolle in der Kultivierung von Mikroorganismen [162]. Das Scr-PTS besteht aus zwei Proteinen mit drei Untereinheiten: Dem bereits erwähnten EIIA<sup>Crr</sup>, das durch das *crr*-Gen kodiert wird und dem membran-gebundenen EIIBC<sup>Scr</sup>, das durch das *scrA*-Gen kodiert wird [142]. Durch Transport und Phosphorylierung entsteht intrazelluläres Sucrose 6-phosphat (Scr6P). Scr6P wird durch die Invertase ScrB (Gen *scrB*) hydrolysiert in Glucose 6-phosphat (Glc6P) und Fructose. Fructose wiederum wird durch die ATP-abhängige Fructokinase ScrK (Gen *scrK*) phosphoryliert zu Fructose 6-phosphat (Fru6P). Das zuckerspezifische Porin ScrY (Gen *scrY*) erleichtert die Diffusion der extrazellulären Sucrose durch die äußere Membran [162]. Intrazelluläre Fructose kann in *E. coli* auch durch das Fructose-PTS und die ATP-abhängige Mannofructokinase Mak (Gen *mak*) phosphoryliert werden [6].

Der verwendete Stamm LJ210 wurde freundlicherweise von der AG Genetik (Prof. J.W. Lengeler, Dr. K. Jahreis) der Universität Osnabrück zur Verfügung gestellt. Er trägt auf einem Einzelkopieplasmid die *scr*-Gene in einem Sucrose-negativen Stammhintergrund. Es steht damit ein klar definiertes Transportsystem (PTS) zur



**Abbildung 1.6:** Reaktionen des Sucrose- und Glucose-PTS, sowie regulatorische Effekte (gestrichelt) über Katabolitenrepression und Induktorausschluss beim Glp- und Lac-System [161]

Verfügung [172, 161]. Dies ist ein Vorteil gegenüber Untersuchungen mit dem Substrat Glucose, bei dem mehrere Transportsysteme in Betracht gezogen werden müssen [21, 33]. Verschiedene Transporter sind dabei bei verschiedenen Substratkonzentrationen aktiv [81, 25]. Durch die Charakterisierung des Scr-PTS in dieser Arbeit können vergleichende und ergänzende Studien zu den Arbeiten über das Glc-PTS durchgeführt werden. Hierbei muss die zusätzliche Abhängigkeit der Expression des *scrYAB*-Operons vom globalen Regulator cAMP.CrpA berücksichtigt werden.

Die Gene *ptsI* und *ptsH* sind zusammen mit dem Gen *crr* für EIIA<sup>Crr</sup> im *pts*-Operon (*ptsHicrr*) codiert. Im Gegensatz dazu sind die Gene für die substratspezifischen EIIs meist in spezifischen Operons oder Regulons zusammen mit den entsprechenden abbauenden Enzymen in einer Gruppe codiert. Das *pts*-Operon dagegen steht unter der Kontrolle globaler Regulationssysteme [122], wie dem Repressor DgsA (Mlc). Die Expression des Operons erhöht sich etwa dreifach während des Wachstums auf PTS-Substraten und wird durch ein Zusammenspiel eines Glucose- und eines cAMP.CrpA-vermittelten Regulationsmechanismus erreicht. Auch anaerobe Wachstumsbedingungen führen zu einer Erhöhung des Expressionsniveaus. Es sind drei Promotoren identifiziert, deren Zusammenwirken zu einer erhöhten Expression von HPr und EIIA<sup>Crr</sup> im Gegensatz zu EI (etwa 5:1) führen [122].

Das Glucose-spezifische EIICB<sup>Glc</sup> ist Produkt des *ptsG*-Gens, dessen Expression negativ durch DgsA = Mlc (für deoxyglucose sensitive und making larger colonies) und positiv durch den cAMP.CrpA-Komplex reguliert wird. DgsA ist ein wichtiger Regulator des Kohlenhydrat-Metabolismus, wenn auch die Aufklärung molekularer Zusammenhänge zum Teil noch am Anfang steht. Es ist gezeigt, dass EIICB<sup>Glc</sup> als Sensorprotein funktionieren könnte, das für die Induktion des *ptsG*-Operons verantwortlich ist [80, 120, 161]. Der Glucose-Transporter ist in zahlreichen Arbeiten sehr gut untersucht [170], vor allem bezüglich Struktur [28, 38], Membrantopologie [16], physiologischen und biochemischen Eigenschaften [15, 107, 105, 160] und der Komplexbildung mit weiteren PTS-Komponenten [32, 59].

### 1.3.2 Stand des Wissens zur Modellbildung

Wichtige Schritte zur mathematischen Beschreibung der PTSs waren die Aufklärung der kinetischen Eigenschaften der einzelnen PTS-Proteine *in vitro*. Dazu gehören vor allem die Bestimmung von geeigneten kinetischen Ansätzen. Zusätzlich wurden in einer Vielzahl von Arbeiten verschiedene Arten von experimentellen Daten gewonnen, die nun in ein komplettes mathematisches Modell einfließen

können [122, 112, 130, 85]. Dazu gehören Gleichgewichtskonstanten für Phosphotransferreaktionen,  $K_m$ -Werte einiger Enzyme für ihre Substrate und Produkte, Assoziations- und Dissoziationskonstanten für einige Enzyme und Substrate und Produkte, sowie zum Teil Geschwindigkeitskonstanten für Phosphotransferreaktionen. Eine Zusammenfassung hierzu ist in [131, 132] zu finden.

Enzym I wird durch *in vitro*-Messungen mit einem Ping Pong Bi Bi-Ansatz beschrieben. Eine Untersuchung auf eine Reihe von möglichen Effektoren konnte keinerlei Effekte nachweisen [147, 165]. In einer weiteren Arbeit wurde dieser Ansatz aufgrund anderer Messergebnisse in Frage gestellt und auch darauf hingewiesen, dass die Beziehung zwischen inaktivem Monomer und aktivem Dimer mit in die modellhafte Beschreibung miteinbezogen werden muss [108, 53]. Saier et al. [136] nahmen an, dass sich alle Reaktionen des PTS bis auf diejenigen des Enzyms II im Gleichgewicht befinden. Für Enzym I wurde deswegen ein Gleichgewichtsansatz (near equilibrium approach) verwendet [139].

Der Transporter Enzym IICB<sup>Glc</sup> kann mit einem Michaelis-Menten-Ansatz beschrieben werden (Random Bi Bi) [164]. Misset et al. [107] beschrieben sowohl Phosphorylierung, als auch die Austauschreaktion mit einem Ping Pong-Ansatz, erwähnen aber auch Arbeiten, in denen ein ordered-Mechanismus verwendet wurde. Die Reaktionsgeschwindigkeiten von Enzym IIA wurden als so hoch angenommen, dass es sich zu jedem Zeitpunkt im Gleichgewicht befindet [136].

Für das gesamte PTS wurden bereits in einigen Arbeiten kinetische Ansätze und modellhafte Beschreibungen angegeben. Liao [88] gab eine Gleichung an, die das Verhältnis von PEP zu Pyruvat miteinbezieht. Für die Herleitung wurden Gleichgewichtsannahmen für alle enzymatische Schritte getroffen, bis auf die Translokation und gleichzeitige Phosphorylierung des Substrats. Die Maximalrate des PTS wurde dann durch die Geschwindigkeitskonstanten dieser Reaktion und der Konzentration an spezifischem EII bestimmt. EII wurde hierbei durch einen sequentiellen Reaktionsmechanismus (Rapid Equilibrium Random Bi Bi) beschrieben. Für die Bildungsrate  $v$  von Glc6P ergab sich damit:

$$v = \frac{k_{EIIICB} \frac{[PEP]}{[Prv]} [Glc][EIIICB]}{\frac{K_1 K_2 K_3 K_4 K_5}{[EIIA]} + K_5 \frac{[PEP]}{[Prv]} + \frac{K_1 K_2 K_3 K_4 K_5}{K_6 [EIIA]} + \frac{[PEP]}{[Prv]} [Glc]} \quad (1.2)$$

mit den Gleichgewichtskonstanten  $K_1, K_2, K_3, K_4, K_5, K_6$  und der Geschwindigkeitskonstante  $k_{EIIICB}$  der Translokations- und Phosphorylierungsreaktion.

Saier und Chin [136] führten aus, dass aufgrund der  $\Delta G^{0'}$ -Werte in einer Gleichgewichtssituation alle Phosphoproteine des PTS im Gleichgewicht miteinander sind und nur der letzte Schritt, der durch EIICB katalysiert wird, physiologisch irreversibel ist. So ist das Phosphoryltransferpotential von EI~P beinahe genauso groß wie das von PEP [122, 31]. Ihre Betrachtungen zeigten weiterhin, dass das PTS unter physiologischen Bedingungen niemals ins thermodynamische Gleichgewicht kommen kann.

Gesamtmodelle des PTS auf der Basis kinetischer Ansätze wurden ebenfalls bereits beschrieben [139]. Kremling verwendete dabei für die Phosphorylübertragung vom PEP zum HPr einen reversiblen Ping Pong-Mechanismus, vom HPr zum  $EIIA^{Crr}$  eine reversible Reaktion zweiter Ordnung und von  $EIIA^{Crr}$  zu Glc einen irreversiblen Random Bi Bi-Mechanismus [70]. In einem etwas komplexeren Modell verwendete Wang für die Übertragungsreaktion vom PEP zum EI eine reversible Michaelis-Menten-Kinetik, vom EI zum HPr und vom HPr zum  $EIIA^{Crr}$  Ansätze auf der Basis des Massenwirkungsgesetz und vom  $EIIA^{Crr}$  zum  $EIICB^{Glc}$  und  $EIIBC^{Scr}$  reversible Michaelis-Menten-Kinetiken mit kompetitiver Inhibition [161].

Die umfassendste Untersuchung und Modellierung des PTS stammt von Rohwer et al. [131, 132]. Die Autoren entwickelten ein detailliertes kinetisches Modell unter Zerlegung aller Phosphotransferreaktionen in zwei Elementarreaktionen auf der Basis des Massenwirkungsgesetzes. Unter Verwendung zahlreicher Parameter aus *in vitro*-Messungen der Literatur konnten alle benötigten Geschwindigkeitskonstanten, sowie Protein- und Metabolitkonzentration angegeben werden. In Simulationsstudien wurde gezeigt, dass die mit *in vitro*-Messungen gewonnenen Parameter zur Beschreibung von *in vivo*-Phänomenen verwendet werden können.

Im Rahmen dieser Dissertation wird das von Rohwer et al. entwickelte Modell herangezogen, auf das Sucrose PTS übertragen und um den EI-Monomer-Dimer-Zyklus erweitert. Dies ist in Kap. 3.2 ausführlich beschrieben. Durch zahlreiche Experimente konnten außerdem unsichere Parameter identifiziert werden und so das Gesamtmodell validiert werden (Kap. 4.8). Die Verschaltung des Modells des Sucrose PTS mit einem Modell für die Glykolyse bringt das PTS in einen weiteren Zusammenhang und zeigt die Verwendbarkeit des Sucrosemodells in umfassenderen Modellen (Kap. 3.3).

## 1.4 Signalverarbeitung über die Phosphotransfersysteme

Neben der Transportfunktion erfüllen die PTSs in *E. coli* eine wichtige Rolle als ein signalverarbeitendes und -generierendes System innerhalb des Kohlenhydrat-Stoffwechsels (gestrichelte Pfeile in Abb. 1.3, Seite 35). Die PTSs stehen in einer zentralen Position der zellulären Funktionseinheit “Kohlenstoff-Metabolismus” [80]. Die PTS-Signalverarbeitung kann daher als ein Kriterium zur Abgrenzung dieser Funktionseinheit herangezogen werden. Mit der Frage der Abgrenzung von Bereichen des Stoffwechsels beschäftigt sich Kap. 3.5. Das wichtigste regulatorisch wirkende PTS-Protein ist EIIA<sup>Crr</sup>. Es ist an den beiden im ersten Teilkapitel (1.4.1) beschriebenen Phänomenen Katabolitenrepression und Induktorausschluss beteiligt. In der PTS-vermittelten Kohlenhydrat-Chemotaxis spielt dagegen EI eine wichtige Rolle (Kap. 1.4.2). Dies konnte auch durch Simulationsstudien in dieser Arbeit weiter untermauert werden (Kap. 4.9.2). Weitere Wechselwirkungen zwischen PTS- und Nicht-PTS-Proteinen, auf die hier nicht genauer eingegangen werden soll, betreffen die Regulation der Gluconeogenese und verwandter Prozesse durch den Repressor des *fru*-Operons FruR, die Interaktion zwischen EI, der Acetatkinase und möglichen anderen Kinasen und die mögliche Verbindung zwischen dem PTS und der Stickstoff-Regulation [122]. Auf die Induktion von DgsA (Mlc) durch EIICB<sup>Glc</sup> wurde bereits hingewiesen [120].

### 1.4.1 Katabolitenrepression und Induktorausschluss

Alle PTSs einer Zelle können als ein einziges Signalverarbeitungssystem betrachtet werden, das an der Kohlenstoff-Katabolitenrepression beteiligt ist. Die Zelle misst ihren katabolischen Energiezustand, speziell das Phosphoenolpyruvat: Pyruvat-Verhältnis, durch dieses System und verändert entsprechend die Expression transportierender und katabolischer Enzyme [76, 84]. Alle Gene, deren Genprodukte in der “Nahrungssuche” involviert sind, werden von Promotoren exprimiert, deren Transkriptionsrate vom globalen Regulator cAMP-receptor protein CrpA (Gen *crpA*) abhängt. Diese Gene bilden zusammen das *crpA*-Modulon. Der Transport der Phosphorylgruppe vom PEP zum Substrat über die PTS-Proteine führt zu verschiedenen Phosphorylierungsgraden dieser Proteine. Wachsen Zellen auf einem im Überschuss vorhandenen Substrat, liegen die PTS-Proteine, im speziellen EIIA<sup>Crr</sup>, in nicht-phosphorylierter Form vor. In dieser Form hemmt EIIA<sup>Crr</sup> die Aufnahme, bzw. Verstoffwechslung der meisten Nicht-PTS-Substrate, wie zum

Beispiel Lactose, Galactose, Glycerin und Melobiose. Dieser Prozess wird Induktorausschluss genannt [50, 109]. In kohlenhydratlimitierten Zellen dagegen liegen die PTS-Proteine in phosphorylierter Form vor. Das phosphorylierte EIIA<sup>Crp</sup>-P aktiviert auf eine unverstandene Art die Adenylatcyclase CyaA (Gen *cyaA*). Dieses Enzym setzt ATP in das Alarmon cAMP um, dessen Konzentration den Hungerzustand der Zelle widerspiegelt. cAMP kann an das cAMP-receptor protein CrpA binden und der entstandene Komplex kann wiederum aktiviert alle Promotoren des *crpA*-Modulons. Hunger erhöht daher auf globale Art die Genexpression des Katabolismus, während Überschussbedingungen zur Katabolitenrepression oder korrekter zur Nicht-Aktivierung des *crpA*-Modulons führen [73, 137]. Die Induktorkonzentrationen werden dabei streng durch die Substratkonzentration reguliert [36]. Wie bereits erwähnt, aktiviert der cAMP.CrpA-Komplex auch die Expression des *ptsG*-Genes, was ebenfalls eine wichtige Rolle für diese Regulationsvorgänge spielt [63]. Neben der Regulation über cAMP scheint auch eine Veränderung der CrpA-Konzentration wichtig zu sein [52, 58].

Auch Nicht-PTS-Substrate, wie Glucose-6-Phosphat (Glc6P), Gluconat (Glt) und Lactose (Lac) können zu Katabolitenrepression durch niedrige cAMP-Konzentrationen und zu Induktorausschluss führen [52, 54]. Um die Rolle des PEP:Prv-Verhältnisses endgültig klären zu können, fehlten bisher exakte analytische Methoden [53].

## 1.4.2 PTS-vermittelte Kohlenhydrat-Chemotaxis

Der Signaltransduktionsweg der Chemotaxis ist das Paradebeispiel eines rezeptorregulierten Zwei-Komponenten-Signaltransduktionsweges. Dieser vergleichsweise einfache Signalweg zeigt viele grundsätzliche Prinzipien, aber auch noch viele offene Fragen der Signaltransduktion innerhalb der Biologie auf [35].

Die "gerichtete" Schwimmbewegung von Bakterien (Taxis) kann als Folge eines ständigen Umschaltens zwischen zwei Zuständen beschrieben werden. Wird ein Konzentrationsgradient eines Lockstoffs in einer Lösung vorgegeben, spiegelt die Schwimmbewegung des Bakteriums die unterschiedlichen Konzentrationen wider, durch die sich das Bakterium bewegt (Chemotaxis). Schwimmt das Bakterium *Escherichia coli* durch Bereiche mit einem ansteigenden Lockstoffkonzentrationsgradienten, wird ein Signal an den Antriebsmotor gesendet, das die Wahrscheinlichkeit einer Taumelbewegung verringert und eine Bewegung des Bakteriums in Richtung des Gradienten bewirkt. Ähnliches gilt in umgekehrter Richtung.

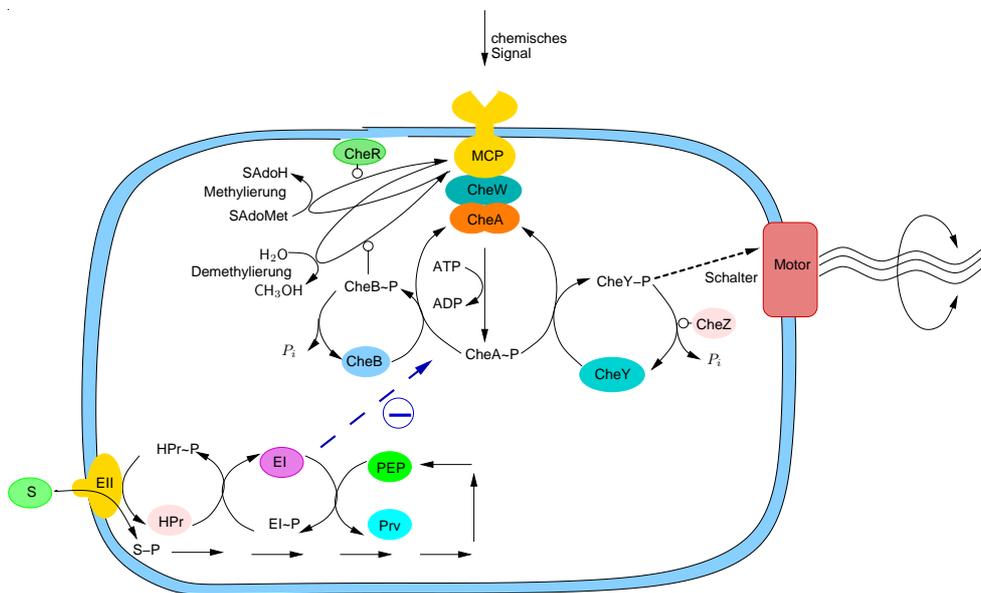
*Escherichia coli* und andere bewegliche Bakterien erkennen viele Kohlenhydrate als chemische Lockstoffe. Einige, wie Maltose, Galactose und Ribose, werden

durch Transmembransensoren (MCPs - methyl-acepting chemotaxis proteins) wahrgenommen (Abb. 1.7). MCP-Moleküle transportieren keine Kohlenhydrate in die Zelle, messen aber extrazelluläre Lockstoffkonzentrationen durch Wechselwirkung mit einer periplasmatischen Bindedomäne. Der Reiz wird durch die Membran zur cytoplasmatischen Domäne übertragen, die wiederum mit den Rotationsschaltern am Flagellenmotor kommuniziert. Dies bewirkt die Kontrolle der Schwimmbewegungen der Zelle [97, 119, 35]. Es werden hierfür verschiedene cytoplasmatische Proteine, vor allem CheA und CheY benötigt. CheA autophosphoryliert und überträgt die Phosphorylgruppe auf CheY. Die Phosphorylierung von CheY induziert eine Konformationsänderung, die eine Interaktion mit dem Flagellenschalter ermöglicht und so zu Flagellenrotation im Uhrzeigersinn (Tumeln oder Zufallsbewegung) führt. Rotation gegen den Uhrzeigersinn (Vorwärtsbewegung) ist der Standardzustand. Das kurzlebige phospho-CheY zerfällt durch selbstkatalysierte Reaktion, eine Reaktion, die durch ein weiteres Protein (CheZ) gesteigert wird. MCP kontrolliert den Fluss der Phosphorylgruppen durch dieses Signalverarbeitungssystem mittels Veränderung der Autophosphorylierungsrate von CheA durch Ligandbindung. Ein Anstieg in der Lockstoffkonzentration bedingt die Hemmung von CheA und so eine gerichtete Vorwärtsbewegung, wogegen ein Abfallen der Attraktorkonzentration zur Stimulierung von CheA und somit zur Taumelbewegung führt [97]. Für die MCP-abhängige Chemotaxis konnte ein Computerprogramm zu Simulationszwecken entwickelt werden, das den Phänotyp zahlreicher Mutanten, in denen Konzentrationen einzelner Komponenten verändert waren, reproduzieren konnte [13].

Kohlenhydrat-Lockstoffe, wie Mannitol, Mannose und Glucitol werden durch einen anderen Mechanismus wahrgenommen (Abb. 1.7). Diese Stoffe werden durch PEP-abhängige PTS in die Zelle transportiert und während des Transportvorgangs als Lockstoffe wahrgenommen. Es ist bekannt, dass die Stoffe aufgenommen werden müssen, um Chemotaxis auszulösen. Stoffwechsel ist dagegen nicht notwendig. Daher lösen auch nicht verstoffwechselbare Analoga Chemotaxis aus. Aufgrund experimenteller Beobachtungen wurde die Hypothese formuliert, dass Phosphorylübertragung über das PTS ein Signal erzeugt, das Flagellenrotation im Uhrzeigersinn unterdrückt und so eine Schwimmbewegung zur höheren Substratkonzentration fördert [97].

Die Signalverbindung zwischen der PTS- und der MCP-Chemotaxis war lange unklar. MCPs werden nicht direkt für die PTS-Chemotaxis benötigt, CheA und CheY dagegen schon, was zu der Hypothese führte, dass das PTS ebenfalls den Gehalt an phospho-CheY moduliert und evt. die CheA-Aktivität.

*Escherichia coli* besitzt etwa 20 EIIs, die jedes für sich als Chemorezeptor für das jeweilige Substrat dienen. Weder die Bindung eines Substrats an ein EII, noch die



**Abbildung 1.7:** MCP- und PTS-vermittelte Chemotaxis in *Escherichia coli*.  
Symbole wie in Abb. 1.3, Seite 35.

Bildung von intrazellulären Kohlenhydrat-Phosphaten lösen eine chemotaktische Reaktion aus. Im Gegensatz dazu sind die allgemeinen PTS-Proteine HPr und EI sowohl für den Transport als auch die Chemotaxis notwendig. Das Flagellensignal entsteht durch eine transportbedingte Veränderung des Phosphatflusses durch diese allgemeinen PTS-Komponenten. Mutantenstämme mit HPr-ähnlichen Proteinen, die in der Phosphat-Transportrate vom EI reduziert waren, zeigten Transport-, aber keine Chemotaxisaktivität. Dies führte zu der Annahme, dass der Phosphorylierungsgrad des EI die Verbindung zum MCP-Signalweg schafft. Gereinigtes dephosphoryliertes EI hemmt im Gegensatz zum phosphorylierten EI~P die Autophosphorylierung des CheA [97].

Folgende biologische Modellvorstellung wurde formuliert: Während der Aufnahme eines PTS-Substrats wird EI schneller dephosphoryliert durch HPr als phosphoryliert durch PEP. Unphosphoryliertes EI häuft sich an und inhibiert die CheA-Autophosphorylierung. Der Phosphat-Fluss zum CheY verringert sich. Dies führt zu einer gerichteten Schwimmbewegung. Es wird angenommen, dass der geschwindigkeitsbestimmenden EI-Monomer-Dimer-Zyklus hier eine zentrale Rolle spielt. Experimentell überprüft wurde dieses Modell durch das Vermessen der Transportaktivitäten von EI zu HPr und von HPr zu EII und der Bestimmung der Fähigkeit Chemotaxis durchzuführen. Eine Reduktion der Transportaktivität vom EI um Faktor 2 verhindert bereits ein bedeutungsvolles Chemotaxis-Signal [97]. Diese

Mutanten wurden in Simulationsstudien untersucht (siehe Kap. 4.9.2). Auch ein großer intrazellulärer Pool an unphosphorylierten EI-Molekülen sollte die PTS-Chemotaxis verhindern [3].

Bei allen Untersuchungen des PTS, so auch hier, tritt das Problem der Komplexbildung ('molecular crowding') *in vivo* und Veränderung der Reaktionsraten und -konstanten im Gegensatz zu den *in vitro*, unter anderen Bedingungen bestimmten Werten. Unter *in vivo*-Bedingungen liegt möglicherweise ein großer Prozentsatz der PTS-Proteine im Komplex vor. Dies kann in Simulationsstudien, durch Erhöhung der Proteinkonzentration, bzw. Betrachtung einer größeren Bandbreite der betroffenen Reaktionskonstanten berücksichtigt werden [132].

## 1.5 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit ist, ein mathematisches Modell des Sucrose PTS zu erstellen und dieses Modell experimentell zu überprüfen. *E. coli* besitzt etwa 20 PTSs zum Transport verschiedener Kohlenhydrate in die Zelle. Die PTSs besitzen kohlenhydratspezifische Enzyme, wie den jeweiligen Transporter, der sich in der cytoplasmatischen Membran befindet. Für das Kohlenhydrat Sucrose sind dies der Transporter EIIBC<sup>Scr</sup> und EIIA<sup>Crr</sup>. Das Enzym I und auch, mit Einschränkungen, HPr versorgen alle PTSs mit Phosphorylgruppen und werden daher als allgemeine PTS-Proteine bezeichnet. Diese vier erwähnten Proteine bilden das Sucrose PTS. Alle PTSs einer Zelle können als ein einziges Signaltransduktionssystem verstanden werden, das in der Kohlenstoff-Katabolitenrepression involviert ist. Sowohl die extrazelluläre Konzentration an Kohlenhydrat, als auch der intrazelluläre Energiezustand der Zelle werden auf biologische Art verrechnet und verschiedene regulatorisch-wirkende Signale erzeugt, die den Metabolismus auf vielfältige Art beeinflussen. Bei der Katabolitenrepression spielt die phosphorylierte Form des EIIA<sup>Crr</sup> eine entscheidende Rolle, indem es die Adenylatzyklase aktiviert, was zur Produktion des wichtigen second Signalmoleküls cAMP führt. Die nicht-phosphorylierte Form des EIIA<sup>Crr</sup> ist beim Induktorausschluss beteiligt und das EI ist bei der PTS-vermittelten Chemotaxis von wichtiger Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein mathematisches Modell des Sucrose PTS erstellt. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf der Beschreibung der Signaltransduktionseigenschaften, das heißt auf der Beschreibung der Abhängigkeit der wichtigen regulatorischen PTS-Signale von der extrazellulären Sucrosekonzentration und der Konzentration der intrazellulären PEP und Pyruvatkonzentrationen. Eine exakte Beschreibung der Signalverarbeitung des PTS als zentrales Signaltransduktionssystem des Kohlenstoff-Metabolismus ist ein wichtiger Beitrag zur mathematischen

Beschreibung der Vorgänge der Katabolitenrepression, des Induktorausschlusses und der PTS-vermittelten Chemotaxis und zur Erstellung eines ganzheitlichen Modells von *E. coli*. Zur experimentellen Überprüfung des Modells des Sucrose PTS wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt und die dafür notwendigen analytischen Methoden entwickelt. Dies betraf insbesondere die Bestimmung der Konzentrationen der intrazellulären Metabolite PEP und Pyruvat.

Im Rahmen dieser Dissertation wird von der Gesamtheit aller 20 Phosphotransferasesysteme (PTSs) gesprochen, wenn allgemeine, für alle PTSs geltende Aussagen getroffen werden, als auch vom Sucrose PTS als speziellem, hier mathematisch und experimentell bearbeitetem System. Die Einzähl Phosphotransferasesystem (PTS) beschreibt das PTS, verstanden als ein Signaltransduktionssystem.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

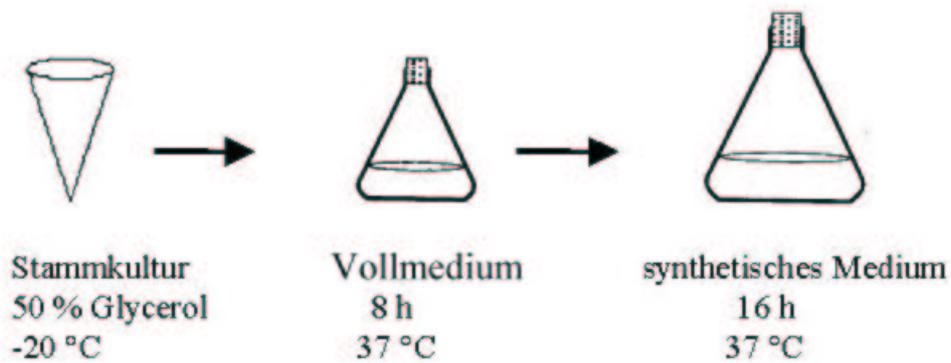
### 2.1 Experimente und Prozessführung

#### 2.1.1 Medien

Zur Stammhaltung wurden die Bakterien in Vollmedium (Tab. 2.1) mit 50% (v/v) Glycerin bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Anzucht von *Escherichia coli* LJ210 ist in Abb. 2.1 zusammengefasst. Ausgehend von der Stammkultur wurde  $100\ \mu\text{l}$  in 50 ml  $\text{LB}_0$ -Medium angezüchtet. Die Kultivierung erfolgte für 8 h in einem Wasserbadschüttler bei  $37\ ^{\circ}\text{C}$  mit 120 U/min. Dann wurden je nach Optischer Dichte der 1. Vorkultur etwa  $500\ \mu\text{l}$  in 200 ml einer 2. Vorkultur mit synthetischem Medium (Minimalmedium  $\text{MM}^+$ , Tab. 2.2) überführt und bei gleichen Bedingungen 16 h inkubiert. Alle Kultivierungen im Erlenmeyerkolben wurden mit einer Drahtspirale aus Edelstahl durchgeführt, um die Belüftung zu verbessern. Zur Beimpfung des Fermenters wurden 150 ml der 2. Vorkultur ad 1.55 l Batch-Medium (Tab. 2.3) angeimpft.

Vollmedium	
Fleischextrakt	20 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
Glycerin	2.5 g/l

**Tabelle 2.1:** Zusammensetzung des Vollmediums für Stammhaltung und 1. Vorkultur. Fleischextrakt und Hefeextrakt wurden eingewogen, gelöst und bei  $121^{\circ}\text{C}$  und 1 bar Überdruck für 30 min autoklaviert. Glycerin wurde danach sterilfiltriert und zugegeben.



**Abbildung 2.1:** Anzuchtschema des Stammes *Escherichia coli* LJ210

Minimalmedium MM <sup>+</sup>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	64 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 mM
C-Quelle (Sucrose, Glycerin, ...)	5 g/l
MgSO <sub>4</sub>	0.3 mM
ZnCl <sub>2</sub>	1 μM
CaCl <sub>2</sub>	10 μM
FeSO <sub>4</sub>	1 μM

**Tabelle 2.2:** Zusammensetzung des synthetischen Nährmediums für die 2. Vor-  
kultur. Die Mediumsbestandteile wurden eingewogen, gelöst und  
sterilfiltriert (0.2 μm Porengröße).

Batch-Medium	
NaCl	1 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 mM
Sucrose	5 g/l
EDTA	0.06 g/l
MgSO <sub>4</sub>	2.1 μM
ZnCl <sub>2</sub>	0.0069 μM
CaCl <sub>2</sub>	0.07 μM
FeCl <sub>3</sub>	0.33 μM

**Tabelle 2.3:** Zusammensetzung des Nährmediums für die absatzweise Prozessführung im Fermenter (Batch-Medium). Die Mediumsbestandteile wurden eingewogen, gelöst und sterilfiltriert (0.2 μm Porengröße).

Alle verwendeten Chemikalien stammen aus kommerziellem Bezug.

#### 2.1.1.1 Medienoptimierung

In einigen Vorexperimenten zeigte sich, dass die Biomassekonzentration im Laufe der stationären kontinuierlichen Prozessführung im Fermenter stetig abnahm. Zur Ermittlung eines möglichen Nährstoffmangels [61, 101] wurde eine Elementaranalyse basierend auf der durchschnittlichen Elementarzusammensetzung einer *E.coli*-Zelle [96] und des in den Vorversuchen verwendeten Mediums durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass alle Elemente bis auf Calcium und Eisen in ausreichender Menge im Medium zur Verfügung gestellt wurden. Calcium erwies sich aber in Hochzelldichtefermentationen als unkritischer Parameter [128]. Als kritisch erwies sich dagegen die Eisenkonzentration. Im Medium, das dann in dieser Arbeit Verwendung fand, wurde die Eisenkonzentration deutlich erhöht. Dies wurde durch den Einsatz des besser löslichen Fe<sup>3+</sup>, statt Fe<sup>2+</sup> und die Verwendung des Komplexbildners EDTA möglich [106, 145]. Die einzusetzende Menge an EDTA wurde in Vorversuchen ermittelt. Das sich ergebende Medium für die kontinuierliche Prozessführung ist in Tab. 2.4 zusammengefasst. In kontinuierlichen Fermentationen wurde damit eine stationäre Biomassekonzentration erreicht. Ammonium und Phosphat wurden in ausreichender Menge zugeführt, so dass das erste limitierende Substrat stets der Zucker war, was durch Kontrollmessungen verifiziert wurde.

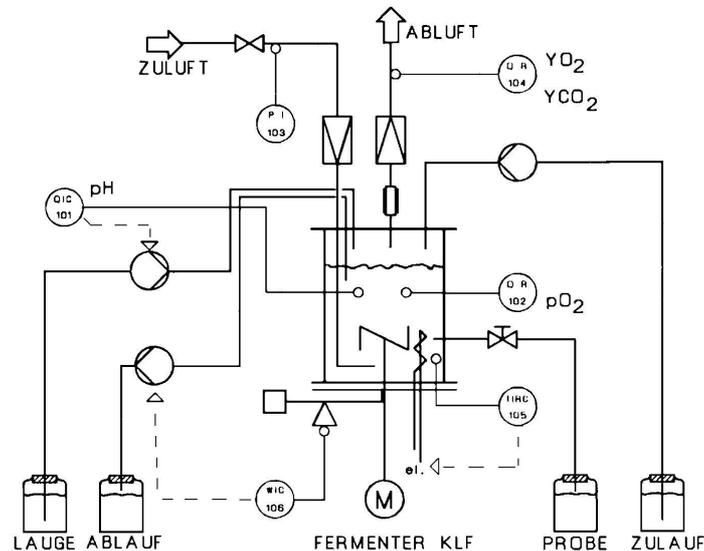
Konti-Medium	
NaCl	1 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	45 mM
Sucrose	17 g/l
EDTA	0.25 g/l
MgSO <sub>4</sub>	24 μM
ZnCl <sub>2</sub>	0.08 μM
CaCl <sub>2</sub>	0.8 μM
FeCl <sub>3</sub>	4 μM

**Tabelle 2.4:** Zusammensetzung des Nährmediums für die kontinuierliche Prozessführung im Chemostaten. Die Mediumsbestandteile wurden eingewogen, gelöst und sterilfiltriert (0.2 μm Porengröße).

## 2.1.2 Verwendete Apparate und Anlagen

Für alle Schüttelkolbenexperimente und die Anzucht der Mikroorganismen wurde ein Wasserbadschüttler der Firma Infors verwendet.

Die absatzweise und kontinuierliche Fermentation wurde nach dem chemostatischen Prinzip in einem Rührreaktor des Typs KLF 2000 (Bioengineering, Wald, Schweiz) mit einem Arbeitsvolumen von 1.5 l unter aeroben und semi-aeroben Bedingungen (Kap. 2.1.3) durchgeführt. Die Anlage verfügt über Mess- und Regeleinrichtungen für Temperatur, Druck, Drehzahl, pH-Wert und Belüftung. Zur Messung der Volumenfraktion von Sauerstoff  $Y_{O_2}$  und Kohlendioxid  $Y_{CO_2}$  wird das Fermenterabgas durch eine Trocknungseinheit einem Abgasanalysator des Typs Siemens Ultramat/Oxymat 6 zugeführt. Abb. 2.2 zeigt den schematischen Aufbau der Versuchsanlage. Durch die Anbindung der Anlage an das Prozessleitsystem Simatic S7 mit der graphischen Benutzeroberfläche WinCC der Firma Siemens konnten Regler für den Substratzulauf und die gelöstsauerstoffkonzentration (Kap. 4.1) realisiert werden. Durch die freie Programmierbarkeit der Software können auch anspruchsvollere Verfahren implementiert und getestet werden. Das Prozessleitsystem dient im Laborbetrieb vor allem dem Bedienen und Beobachten der gefahrenen Anlagen. Des Weiteren werden alle on-line verfügbaren Messgrößen aufgenommen, dargestellt und archiviert. Schaumbildung wurde durch einen Schaumsensor mit daran gekoppelter Antischaummittel-Zugabe (Contraspum, Firma Zschimmer und Schwarz, Lahnstein) unterdrückt. Zur Regelung des pH-Werts wurde 1 N NaOH verwendet. Die Temperierung erfolgt über Heiz- und Kühlfinger. Die *in situ*-Sterilisierung wird durch Durchströmen



**Abbildung 2.2:** Schematischer Aufbau der Fermenteranlage

mit heissem Wasserdampf erreicht. Die Entnahme von Proben erfolgte über ein sterilisierbares Probenahmeventil oder für die Bestimmung intrazellulärer Metabolite mittels der Schnellen Probenahmetechnik (Abb. 4.2, Seite 87).

Zum Gefriertrocknen wurde das Gerät Lyovac GT2 der Firma Finn-Aqua eingesetzt. Die Bestimmung der Optischen Dichte der Kulturen und die enzymatischen Tests wurden mit einem Photometer des Typs Ultrospec 2000 der Firma Pharmacia Biotech und dem Software-Paket Swift durchgeführt. Eine bei 560 nm gemessene Extinktionseinheit entspricht  $0.32 \text{ gTS/l}$  (Trockensubstanz). Für die Trockensubstanz pro Zelle wurde  $2.8 \cdot 10^{-13} \text{ g}$  verwendet [114] und für das durchschnittliche Zellvolumen  $6.83 \cdot 10^{16} \text{ l}$  [161]. Dies ergab einen Umrechnungsfaktor zwischen den Einheiten von:  $1 [\mu\text{mol/gTS}] = 410 [\mu\text{M}]$

### 2.1.3 Durchgeführte Experimente im Fermenter

Zur quantitativen Charakterisierung der Signalverarbeitung über das PTS wurden Experimente im Fermenter durchgeführt. Vor der Beimpfung mit dem, durch das beschriebene Anzucht-Schema (Abb. 2.1) erreichten Inoculum, wurde der Fermenter nach der *in situ*-Sterilisierung mit dem Batch-Medium (Tab. 2.3) befüllt. Der absatzweise Betrieb wurde in einem Volumen von 1.55 l durchgeführt. Eine

ausreichende Sauerstoffversorgung wurde sichergestellt. Bei allen Experimenten, bis auf die Experimente mit Sauerstofflimitierung sank der Sauerstoffpartialdruck  $pO_2$  im Medium nie unter 20% des Sättigungsdrucks und damit die Sauerstoffkonzentration nie unter 1.3 mg/l. Der Sättigungsdruck wurde bei Normaldruck und einer Temperatur von 37°C mittels Begasung des sterilen Mediums mit Luft ermittelt. Wenn nicht anders erwähnt, war die Rührerdrehzahl 1000 U/min und die Belüftungsrate 1 l/min. Die Temperatur betrug für alle durchgeführten Experimente 37°C. Beim Erreichen der Übergangsphase zwischen exponentiellem und stationärem Wachstum wurde durch Einschalten der Zulaufsteuerung und der Ablaufregelung auf kontinuierliche Prozessführung umgeschaltet. Das Volumen wurde hierbei auf 1.4 l verringert.

Der kontinuierliche Prozess wurde, wenn nicht anders beschrieben, mit einer konstanten Verdünnungsrate  $D = 0.1 h^{-1}$  stationär betrieben. Die Verdünnungsrate  $D$  berechnet sich aus dem Quotienten aus stationärem Volumenstrom und Fermentervolumen:

$$D = \frac{q}{V_F} \quad (2.1)$$

mit dem stationären Volumenzu- und -abstrom  $q = q_{zu} = q_{ab}$  und dem Fermentervolumen  $V_F$ .

Das zur pH-Wert-Regelung zugeführte Laugenvolumen wurde durch eine Verringerung des Mediumvolumens ausgeglichen. Es wurden stationäre Werte extrazellulärer und intrazellulärer Metabolite bis zu einer Verdünnungsrate bis  $D = 0.4 h^{-1}$  gemessen (Kap. 4.3).

Zur Charakterisierung des Verhaltens des Signaltransduktionssystems bei dynamischen Veränderungen und damit der Validierung des dynamischen Modells (Kap. 3.2 und Kap. 3.3) wurden D-Sprung-, Puls- und Fütterungsstop-Experimente durchgeführt. Bei einem D-Sprung wird die stationäre Verdünnungsrate sprunghaft auf einen neuen stationären Wert verändert und die Reaktion des Systems, d.h. die Zeitverläufe der Konzentrationen wichtiger Metabolite vermessen (Kap. 4.5). Der Sprung wird durch eine Sollwertänderung in der Zulaufsteuerung erreicht. Bei Pulsexperimenten wurde die Sucrosekonzentration der Fermenterbrühe sprunghaft erhöht. Die Kultur ist hierbei bei einer niedrigen Verdünnungsrate von  $D = 0.1 h^{-1}$  in zuckerlimitiertem Zustand. Der Puls wurde durch eine manuelle Zugabe von 5 ml einer konzentrierten Sucroselösung (84 g/l) realisiert. Der Zulauf wurde dabei nicht verändert. Die Zeitverläufe entsprechender Metabolite sind in Kap. 4.4 gezeigt. Beim Fütterungsstop-Experiment wurde ebenfalls ausgehend

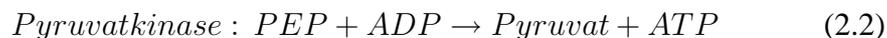
von der stationären Kultur bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  der Zulauf abgestellt und nach 4 Minuten wieder angestellt. Auch hier sind Zeitverläufe aufgenommen worden (Kap. 4.6).

Zur Untersuchung der Veränderungen des Phosphoenolpyruvat: Pyruvat-Verhältnis bei niedrigen Gelöstsauerstoffkonzentrationen wurden stationäre kontinuierliche Kulturen bei limitierenden Sauerstoffpartialdrücken von 5 % und 10 % der Sättigung vermessen (Kap. 4.7). Die regelungstechnische Realisierung dieser prozesstechnischen Aufgabe wurde in Kap. 4.1 beschrieben.

## 2.1.4 Bestimmung intrazellulärer Stoffe

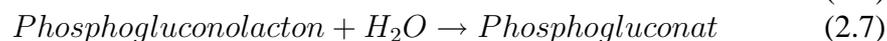
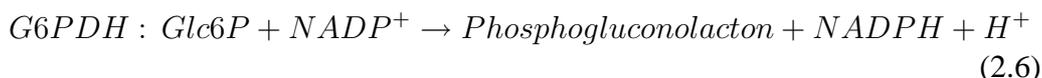
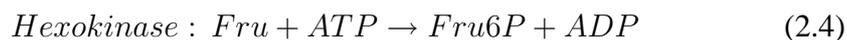
### 2.1.4.1 Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvat (Prv)

Die Konzentrationen an PEP und Prv in den aufgearbeiteten Proben wurden durch einen zweistufigen, gekoppelten enzymatischen Test bestimmt [10]. Dabei wird die Menge des durch PEP und Prv über Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase verbrauchten NADH spektrophotometrisch bei 340 nm gemessen. Es laufen dabei folgende Reaktionen ab:



### 2.1.4.2 Glucose 6-phosphat (Glc6P), Fructose 6-phosphat (Fru6P) und Fructose (Fru)

Auch die Konzentrationen an Glc6P, Fru6P und Fru wurden durch einen mehrstufigen, gekoppelten enzymatischen Test bestimmt [10]. Dabei wurde die Menge des über Hexokinase, Phosphoglucoisomerase und Glucose-6-phosphatdehydrogenase gebildete NADPH spektrophotometrisch bei 340 nm gemessen. Die dabei ablaufenden enzymkatalysierten Reaktionen sind:



#### 2.1.4.3 Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)

Die Messung der Proben wurde mit einem radioaktivem Test (Fa. Amersham, code TRK432) unter Verwendung von [ $^3H$ ]-markiertem cAMP durchgeführt.

#### 2.1.4.4 Phosphorylierungsgrad des EIIA<sup>Crr</sup>

Das Verhältnis des phosphorylierten zur Gesamtmenge an EIIA<sup>Crr</sup> (Phosphorylierungsgrad) wurde wie in [152] beschrieben bestimmt. Nach Probenahme und Zellaufschluss in Natronlauge, Neutralisation mit Natriumacetat und Zugabe von Ethanol, wurden die Proben über Nacht bei  $-70^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach Aufnahme in SDS-Probenpuffer wurde die Probe im SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Western-Hybridisierung wurden die Crr-Banden mit polyklonalen anti-EIIA<sup>Crr</sup>-Antikörpern und Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörpern detektiert [58]. Der anti-EIIA<sup>Crr</sup>-Antikörper wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Genetik (Prof. Lengeler), Osnabrück zur Verfügung gestellt und ist ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, die mit His6-EIIA immunisiert wurden. Die Qualität ist gut. Es zeigen sich nur wenige unspezifische Banden. Die Quantifizierung erfolgte mittels Bildverarbeitung.

#### 2.1.4.5 Makromolekülzusammensetzung

Zur Bestimmung der Metabolitabflüsse in der Metabolischen Flussanalyse (Kap. 3.3.1) wurde die Makromolekülzusammensetzung der Zelle benötigt. Ergänzend zu bereits vorhandenen Werten [14] wurden in ausgewählten Experimenten die Gehalte an DNA [91], RNA [1] und Protein [91] mit etablierten Methoden gemessen.

### 2.1.5 Bestimmung extrazellulärer Stoffe

Die Bestimmung extrazellulärer Konzentrationen wird oft als unproblematisch angesehen. Dass dies nicht immer so ist, zeigte der Versuch der Bestimmung des extrazellulären Prv und PEP aus der stationären kontinuierlichen Fermentation. Die Probe wird in ein vorgekühltes Reagenzglas aufgenommen, 5 Minuten bei  $1^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und danach sofort filtriert (Methode 6, Abb. B.6). Es ergeben sich Konzentration für Prv von 0.05 mM und für PEP von 0.3 mM ( $0.6 \mu\text{mol/gTS}$ ).

Stockt man die Überstände direkt nach der Probenahme mit Standard auf, beträgt die Wiederfindung bei Prv 0-10% und bei PEP 20-70% bei starker Streuung. Die verschiedenen Wiederfindungsraten können mit einem aktiven Transportsystem für das Gärprodukt Prv erklärt werden. Das Abkühlen der Zellsuspension erfolgt im Reagenzglas, das im Eisbad gekühlt wird, zu langsam. Dass heißt, die mit dieser Methode gemessenen Werte sind sehr ungenau und können nur als Abschätzung dienen. Dasselbe gilt auch für Probenahme in -20°C-kalte Spritzen mit Edelstahlkugeln und sofortiger Filtration (Methode 7, Abb. B.7). Unkritisch ist die Bestimmung aus dem Überstand, wenn der Metabolit in hoher Konzentration im Überstand vorliegt, da es dann nur zu einer geringen relativen Veränderung der Konzentration während der Zeit der Probenahme kommt. So konnten für die exponentielle Batch-Phase Konzentrationen von bis zu 400 mM für Prv und 14mM für PEP bestimmt werden. Die relativ hohe Konzentration des energiereichen PEP ist eventuell durch Zellyse während der Batch-Phase zu erklären.

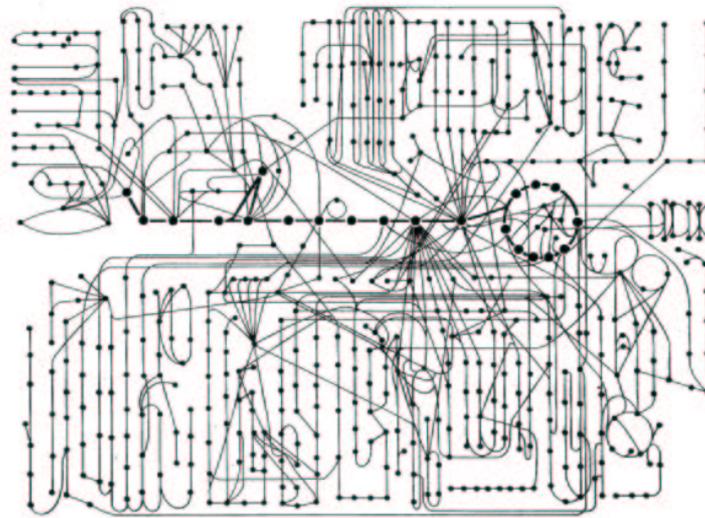
# Kapitel 3

## Modellierung, Simulation und Identifikation

### 3.1 Modellierungssystematik

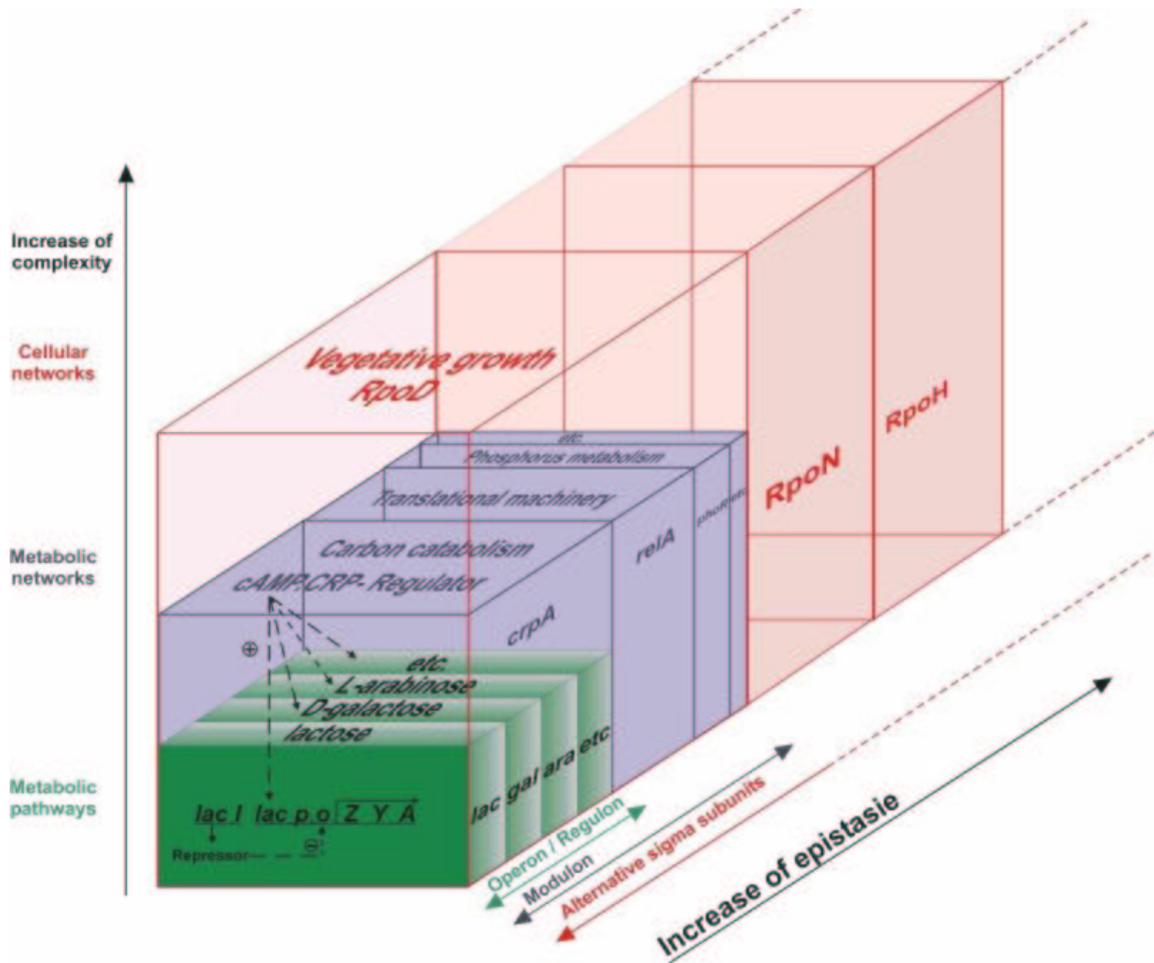
Die Analyse komplexer physiologischer Netzwerke, wie in Abb. 3.1 beispielhaft veranschaulicht, wird durch die große Anzahl an regulatorisch wirksamen Vorwärts- und Rückkopplungsschleifen (feedforward- und feedback) erschwert [73]. Ein Überblick über die Ansätze zur mathematischen Modellierung und Analyse in der Biotechnologie wird in [9] und [167] gegeben. Für *E. coli* wurde in den letzten 20 Jahren ein Einzelzellmodell entwickelt [27, 149]. Das Modell bezieht die Makromolekülzusammensetzung, einige Signalmoleküle und andere Parameter wie Zellvolumen und -oberfläche mit ein. Strukturierende Elemente werden nicht betrachtet und das Modell ist schwer zu verstehen und zu verändern. Ein weiterer Ansatz, die sogenannten kybernetischen Modelle, wurden von Ramkrishna et al. entwickelt [156], um sowohl den sequentiellen, als auch den gleichzeitigen Verbrauch von Substraten zu beschreiben. Der Vorteil dieses Ansatzes ist die Möglichkeit, das Wachstumsverhalten auf verschiedenen Substraten vorherzusagen, wenn als Basis Wachstumsexperimente auf einem einzelnen Substrat herangezogen werden. Nachteile sind, dass weder der spezifische Mechanismus der Induktion und Repression, noch die hierarchische Struktur des regulatorischen Netzwerkes in Betracht gezogen werden [74].

Ein neuer Ansatz [73], der auch in dieser Arbeit verwendet wurde, basiert auf dem Konzept, dass sich der zelluläre Metabolismus in Funktionseinheiten strukturieren lässt, die zur Modellierung verwendet werden können [80, 82]. Komplexe

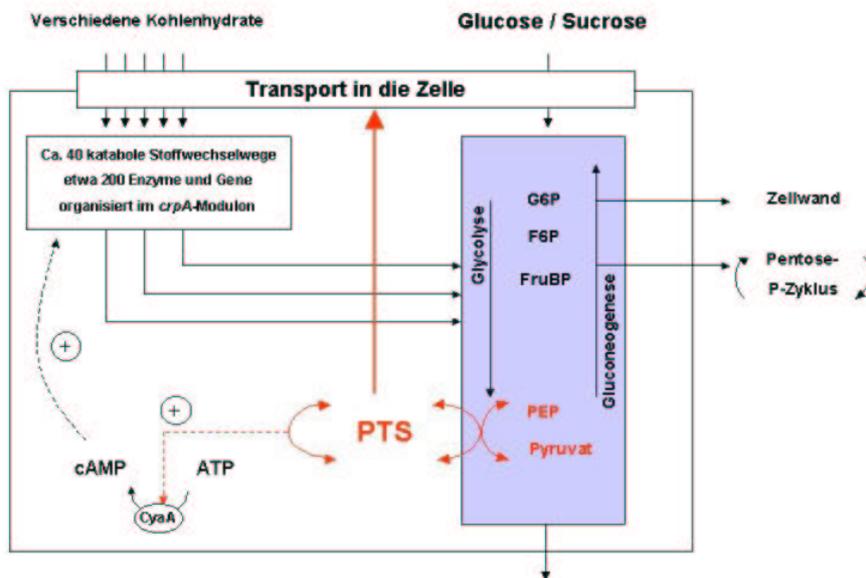


**Abbildung 3.1:** Ausschnitt aus der schematischen Darstellung des Stoffwechselnetzwerks von *Escherichia coli* zur Veranschaulichung der Komplexität biologischer Systeme

metabolische Netzwerke können dadurch in kleinere, relevante Einheiten zerlegt werden. Dies ist notwendig, um Probleme mit einer Vielzahl von Gleichungen und oft unsicheren Parametern zu vermeiden. Dadurch wird die Modellbildung übersichtlicher und transparenter. Des Weiteren wird das Auffinden von Strukturen der zellulären Regulation erleichtert und dadurch das ganzheitliche Verständnis des Metabolismus gefördert [74]. Die Kontrollstrukturen in biologischen Systemen können oft durch einen hierarchischen Ansatz gegliedert werden. Dies ist in Abb. 3.2 für eine bakterielle Zelle schematisch dargestellt [80]. Die Komplexität der Einheiten nimmt dabei auf metabolischer und genetischer Ebene zu. Kleinere Einheiten bilden Blöcke (Operons und Regulons), die unter der Kontrolle eines spezifischen Regulators stehen. Die Regulatoren größerer Blöcke, wie zum Beispiel CrpA, RelA und PhoR (Modulons), sind mit einem Signaltransduktionsnetzwerk verbunden, das Änderungen in der Umgebung oder im physiologischen Zustand (integrierte Information) wahrnimmt (hier nicht dargestellt). Die Modulons können wiederum in noch größeren Einheiten koordiniert werden, wie zum Beispiel RpoD, RpoN und RpoH, und so weiter bis schließlich die gesamte Zelle erfasst wird [80, 84]. Die Kontrolle wird hierbei durch epistatische und globale Regulatoren ausgeübt. Allerdings zeigt sich auf der Ebene der globalen Transkriptionsregulatoren eine starke Vernetzung. Sogenannte dicht überlappende Regulons (dense overlapping regulons DOR) können beschrieben werden [148]. Diese entsprechen dem genetischen Begriff des Modulons.



**Abbildung 3.2:** Hierarchische Struktur einer bakteriellen Zelle [80]. Erläuterungen im Text.

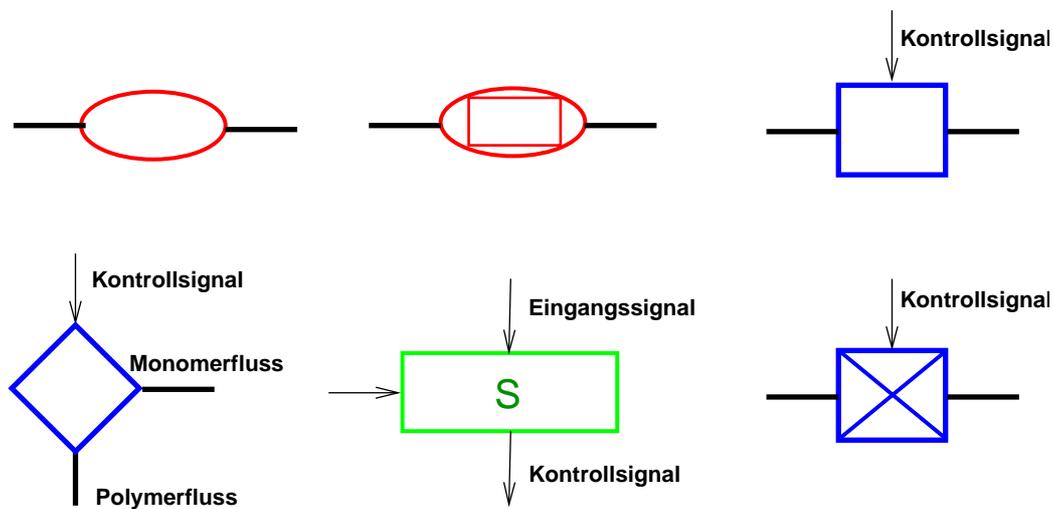


**Abbildung 3.3:** Funktionelle Einheit C-Stoffwechsel in *E. coli* [80]. Erläuterungen im Text.

In [82] wurden daher drei verbale Kriterien zur Abgrenzung biologischer Funktionseinheiten definiert:

- (i) Das Vorhandensein eines enzymatischen Netzwerkes mit einem gemeinsamen physiologischen Ziel
- (ii) Dessen Kontrolle auf genetischer Ebene durch ein gemeinsames regulatorisches Netzwerk und
- (iii) Die Kopplung dieses regulatorischen Netzwerkes an die Umgebung (innerhalb oder außerhalb der Zelle) durch ein Signaltransduktionsnetzwerk.

Diese Prinzipien wurden auf die Proteinsynthese und Stoffwechselwege angewendet [73]. Der C-Stoffwechsel ("Nahrungssuche") von *E. coli* stellt eine solche funktionelle Einheit dar (Abb. 3.3) [80]. Die Einheit ist definiert durch das gemeinsame Ziel Katabolismus, Energieerzeugung und Chemotaxis; die genetische Einheit *crpA*-Modulon und ein gemeinsames Signaltransduktionssystem bestehend aus allen PTS der Zelle. Eine detaillierte Darstellung wurde bereits in Kap. 1.3.1 gegeben. Für die Chemotaxis-Signalkette bestehen zum Beispiel auch Quervernetzungen zur generellen, bzw. MCP-vermittelten Chemotaxis-Funktionseinheit (siehe hierzu auch Kap. 1.4.2). Neben der in dieser Arbeit formulierten Funktionseinheit C-Stoffwechsel ("Nahrungssuche") ließe sich aber auch eine funktionelle Einheit 'Chemotaxis' formulieren, die alle beteiligten Signalketten der MCP-



**Abbildung 3.4:** Elementare Modellbausteine: Stoffspeicher ohne und mit genetischer Information, Stoffwandler, Polymerisator, Signalwandler und Proteinabbau (von links nach rechts und von oben nach unten)

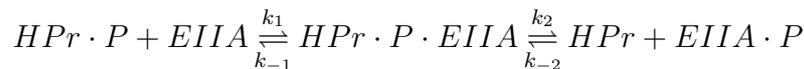
und der PTS-vermittelten Chemotaxis umfassen könnte. Dies zeigt, dass die Frage der Zerlegung komplexer Netzwerkstrukturen in kleinere Funktionseinheiten mit eigener Funktionalität und begrenzter Autonomie noch längst nicht geklärt ist. In der weiteren systembiologischen Forschung wird diese Frage weiter behandelt werden müssen. Der entwickelte formale Algorithmus kann hierzu ein erster Schritt zur Beantwortung sein (Kap. 3.5). Die Arbeit beschäftigt sich im Weiteren mit der mathematischen Beschreibung der Signaltransduktionseigenschaften des Sucrose PTS innerhalb der funktionellen Einheit C-Stoffwechsel (“Nahrungssuche”), sowie der Glykolyse.

Zur Modellierung wurden im höchsten Detaillierungsgrad elementare Modellbausteine definiert [70, 73]. Metabolite werden dabei durch Stoffspeicher und enzymatische Reaktionen durch Stoffwandler abgebildet. Des Weiteren bestehen Bausteine zur Beschreibung von Polymerisations- und Degradationsprozessen, sowie für die Signalverarbeitung (Abb. 3.4). Der Prozess der Modellbildung wird dann verstanden als das schrittweise Verschalten und Kombinieren der Teilmodelle zu höher aggregierten Modellstrukturen. Dies wird in Kap. 3.4 mit dem Modellierungswerkzeug ProMoT für das PTS gezeigt. Teilmodelle organisieren das biologische Wissen in zwei Koordinaten. Die strukturelle Koordinate beschreibt die Anzahl und Art der Ein- und Ausgänge (Terminals). Die Verbindungen zwischen den Teilmodellen werden entsprechend der Art der Terminals festgelegt. Die verhaltensbeschreibende Koordinate wird durch mathematische Gleichungen

beschrieben. Eine Verknüpfung beider Koordinaten wird durch die Zuweisung mathematischer Gleichungen zu den strukturellen Modellbausteinen realisiert. Dies ist zum Beispiel die Zuweisung einer kinetischen Gleichung zu einem Modellbaustein vom Typ Stoffwandler [73, 74].

## 3.2 Sucrose PTS

Die detaillierte Modellierung des Sucrose PTS wurde basierend auf grundlegenden Arbeiten von J.M. Rohwer et al. durchgeführt [131, 132]. Hier wurden die *in vitro* gemessenen kinetischen Parameter aller Komponenten des Glucose PTS der *Enterobacteriaceae* gesammelt. Zur Beantwortung der Frage, ob die *in vitro* gemessenen Parameter das *in vivo*-Verhalten nachbilden können, wurde ein detailliertes kinetisches Modell aufgestellt. Jede Phosphotransferreaktion wurde dabei in zwei Elementarreaktionen zerlegt. Dies ist hier für die Phosphorylübertragung vom HPr zum EIIA<sup>Crr</sup> beispielhaft gezeigt:



Die erste Elementarreaktion beschreibt dabei die Komplexbildung des Phosphoryldonors und des Phosphorylakzeptors und die zweite die Dissoziation des dephosphorylierten Donors und des phosphorylierten Akzeptors. Auf der Basis von Literaturdaten, wie  $K_M$ -Werte, Assoziationskonstanten von PTS-Proteinen für ihre Substrate, sowie Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten für gesamte Phosphorylübertragungsreaktionen, konnten alle Geschwindigkeitskonstanten für die Elementarreaktionen berechnet werden. Alle Parameter konnten dabei aus Literaturdaten gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass mit diesem *in vitro*-Modell *in vivo*-Verhalten, wie zum Beispiel bei variierten Proteinkonzentrationen, beschrieben werden kann. Wichtig ist, dass relativ hohe Proteinkonzentrationen verwendet werden. Dies bildet das sogenannte 'molecular crowding' ab, also die lokale Erhöhung der Proteinkonzentration aufgrund von Komplexbildung *in vivo*, jedoch nicht *in vitro* [132].

In dieser Arbeit wurde das von Rohwer beschriebene Modell verwendet und erweitert. Die zwei Elementarreaktionen wurden dabei jeweils zu einer Gesamt-Phosphorylübertragungsreaktion zusammengefasst [132]. Das Modell wurde um den Scr-spezifischen Transporter EIIBC<sup>Scr</sup> ergänzt. Die notwendigen kinetischen Parameter wurden aus der Literatur entnommen [143, 161, 162]. Des Weiteren wurde das Modell um den Monomer-Dimer-Zyklus des EI erweitert, wie in Abb. 1.3

(Seite 35) dargestellt. Dabei bezeichnet EID, EIDP und EIDP2 das nicht-, mono- und diphosphorylierte EI-Dimer im Gegensatz zu den monomeren Formen EI und EIP. Für die Phosphorylierübertragung vom EI zum HPr wurde sowohl die Möglichkeit der Übertragung vom EI-Monomer, als auch vom Dimer aus berücksichtigt [20].

Für die Bildungs- und Zerfallskonstanten des EI-Dimers wurden die bei 6°C gemessenen Werte [18, 19] auf 37°C umgerechnet, was für die Dissoziationskonstante  $k_d$  des phosphorylierten Dimers beispielhaft gezeigt werden soll. Die Dissoziation benötigt bei 6°C (279 K) 60 Minuten und bei 23°C (296 K) 15 Minuten. Unter Verwendung der Arrhenius-Gleichung [147]

$$k = A \cdot e^{-E_A/RT} \quad (3.1)$$

läßt sich die Aktivierungsenergie  $E_A$  abschätzen:

$$\frac{k_d(279 \text{ K})}{k_d(296 \text{ K})} = \frac{1}{4} = \frac{A \cdot e^{-E_A/(R \cdot 279 \text{ K})}}{A \cdot e^{-E_A/(R \cdot 296 \text{ K})}} = e^{-E_A \cdot (1/279 \text{ K} - 1/296 \text{ K})/R} \quad (3.2)$$

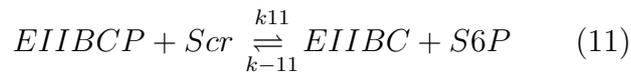
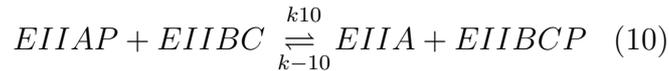
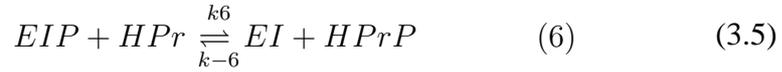
$$\Rightarrow E_A = 56 \text{ kJ/mol} \quad (3.3)$$

Mit dem gleichen Ansatz läßt sich dann aus der bei 6°C gemessenen Dissoziationskonstante  $k_d(279 \text{ K}) = 0.001/s$  des phosphorylierten Dimers die Konstante für 37°C (310 K) abschätzen zu:

$$k_d(310 \text{ K}) = 0.001/s \cdot e^{56 \text{ kJ/mol} \cdot (1/279 \text{ K} - 1/310 \text{ K})/R} = 0.0112/s = 40.3/h \quad (3.4)$$

Für die Assoziationskonstante bei 37°C ergibt sich zu  $k_a(310 \text{ K}) = 1.1 \cdot 10^6/M \cdot s = 1.7 \cdot 10^6 \text{ gTS}/\mu\text{mol} \cdot h$ . Der hier berechnete Wert liegt im Bereich der meisten anderen Proteine ( $10^5 - 10^6/M \cdot s$ ) und nicht, wie der 6°C-Wert um 2-3 Größenordnungen darunter [66, 151, 17, 124]. Für das nichtphosphorylierte Dimer ergeben sich leicht verschiedene Parameter, da  $K'_{eq}$  für die nichtphosphorylierte Form etwa zehnfach höher als für das phosphorylierte Dimer ist [18].

Insgesamt wurde also folgendes Modell für das PTS formuliert:



Alle Reaktionen wurden dabei reversibel angesetzt. Lolkema et al. zeigten, dass der Transporter für Mannitol EnzymII<sup>mtl</sup> als Dimer vorliegt und funktionell ist [92]. Die gesamte Proteinkette des PTS kann als Dimer vorliegen und so die beiden als Dimer vorliegenden Transporter mit Phosphorylgruppen versorgen. Dies wurde in diesem Modell insoweit berücksichtigt, als dass HPr, EIIA und EIIBC jeweils das Monomer, als auch ein Molekül des Dimers bezeichnet. Diese Gleichsetzung ist dann zulässig, wenn entweder alle Moleküle als Dimer vorliegen oder zwischen den kinetischen Konstanten der Moleküle in monomerer oder dimerer Form kein Unterschied besteht. Es wurde angenommen, dass eine der beiden Voraussetzungen erfüllt ist. Die Parameter wurden durch Anpassung an die in Kap. 4 dargestellten Ergebnisse leicht gegenüber den Literaturwerten verändert und sind

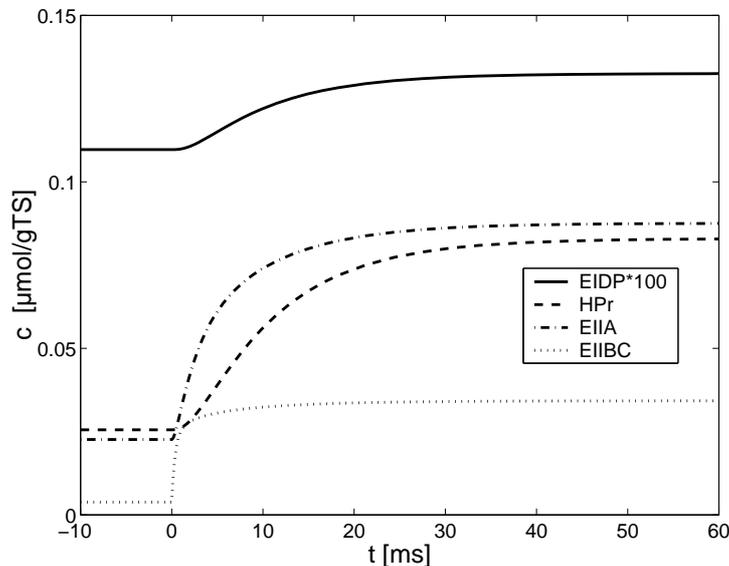
Parameter	
$k_1$	$8.9e + 6 [gTS/\mu mol \cdot h]$
$k_{-1}$	$5.9e + 6 [gTS/\mu mol \cdot h]$
$k_2$	$8.9e + 6 [gTS/\mu mol \cdot h]$
$k_{-2}$	$5.9e + 6 [gTS/\mu mol \cdot h]$
$k_3$	$40.3 [1/h]$
$k_{-3}$	$1.7e + 6 [gTS/\mu mol \cdot h]$
$k_4$	$40.3 [1/h]$
$k_{-4}$	$1.7e + 6 [gTS/\mu mol \cdot h]$
$k_5$	$13.4 [1/h]$
$k_{-5}$	$5.0e + 6 [gTS/\mu mol \cdot h]$
$k_6$	$3.0e + 8 [gTS/\mu mol \cdot h]$
$k_{-6}$	$1.2e + 7 [gTS/\mu mol \cdot h]$
$k_7$	$2.8e + 7 [gTS/\mu mol \cdot h]$
$k_{-7}$	$2.5e + 7 [gTS/\mu mol \cdot h]$
$k_8$	$2.8e + 7 [gTS/\mu mol \cdot h]$
$k_{-8}$	$2.5e + 7 [gTS/\mu mol \cdot h]$
$k_9$	$0.5e + 7 [gTS/\mu mol \cdot h]$
$k_{-9}$	$0.5e + 7 [gTS/\mu mol \cdot h]$
$k_{10}$	$3.0e + 7 [gTS/\mu mol \cdot h]$
$k_{-10}$	$1.1e + 7 [gTS/\mu mol \cdot h]$
$k_{11}$	$2.1e + 7 [l/gScr \cdot h]$
$k_{-11}$	$10.0 [gTS/\mu mol \cdot h]$

**Tabelle 3.1:** Parameter des identifizierten PTS-Modells (Gl. 3.5)

in Tab. 3.1 zusammengefasst. Die Geschwindigkeitskonstante für die Phosphorylübertragung vom  $EIIA^{Crr}$  zum  $EIIBC^{Scr}$  ist unsicher und wurde zur Hälfte der Konstanten für den Transfer zum  $EIICB^{Glc}$  angenommen [131]. Es wurden im Gegensatz zum dynamischen Modell der Glykolyse keine Vereinfachungen wie etwa Quasistationarität oder schnelles Gleichgewicht verwendet [70]. Dies ist sinnvoll, da auch für das detaillierte Modell alle Parameter des Modells auf der Basis von Literaturdaten bestimmt werden können.

### 3.2.1 Untersuchung des dynamischen Verhaltens

In der PTS-vermittelten Chemotaxis wurde eine Veränderung des Bewegungsmusters von *E. coli* auf Glucose-Freisetzung innerhalb von 150 ms festgestellt [98].



**Abbildung 3.5:** Zeitverläufe der Konzentrationen ausgewählter PTS-Proteine bei sprunghafter Erhöhung der Sucrosekonzentration von  $1 \text{ mg/l}$  ( $3 \mu\text{M}$ ) auf  $300 \text{ mg/l}$  ( $900 \mu\text{M}$ ) zum Zeitpunkt  $t = 0 \text{ ms}$ . Die Konzentration des monophosphorylierten EI-Dimers EIDP wurde aus Darstellungsgründen mit dem Faktor 100 multipliziert.

Die Dynamik des PTS ohne die dahintergeschaltete Chemotaxis-Signalkaskade und den Flagellar-Motor (Abb. 1.7, Seite 46), sowie unter Berücksichtigung der Trägheit der Zelle gegenüber der Flagellar-Bewegung, muss innerhalb von etwa 10-50 ms stattfinden. Führt man für das erläuterte PTS-Modell eine sprunghafte Veränderung der Sucrosekonzentration durch, ergab sich Abb. 3.5. Dabei wurde die Sucrosekonzentration von  $1 \text{ mg/l} = 3 \mu\text{M}$  (Limitierung) auf  $300 \text{ mg/l} = 900 \mu\text{M}$  (Sättigung) erhöht, während die anderen Eingangsgrößen konstant gehalten wurden. Alle PTS-Proteine erreichen innerhalb von 3-30 ms einen neuen stationären Zustand. Die Konzentration des monophosphorylierten EI-Dimers EIDP steigt dabei an, während die Konzentration des diphosphorylierten Dimers abnimmt. Es kommt hier also zu einer Verschiebung der Gleichgewichte. Das dynamische Verhalten des PTS spielt im geforderten Bereich ab. Aufgrund dieser Schnelligkeit spielt sich das dynamische Verhalten der Proteinkette für die zu bestimmenden Signaltransduktionseigenschaften des PTS innerhalb der funktionellen Einheit C-Stoffwechsel keine Rolle. Sie befinden sich praktisch immer in einem stationären Zustand. Entscheidend sind die deutlich langsameren Reaktionen der Glykolyse und Genexpression. Allerdings wurde der ebenfalls langsame EI-Monomer-Dimer-Zyklus im nächsten Teilkapitel gesondert untersucht.

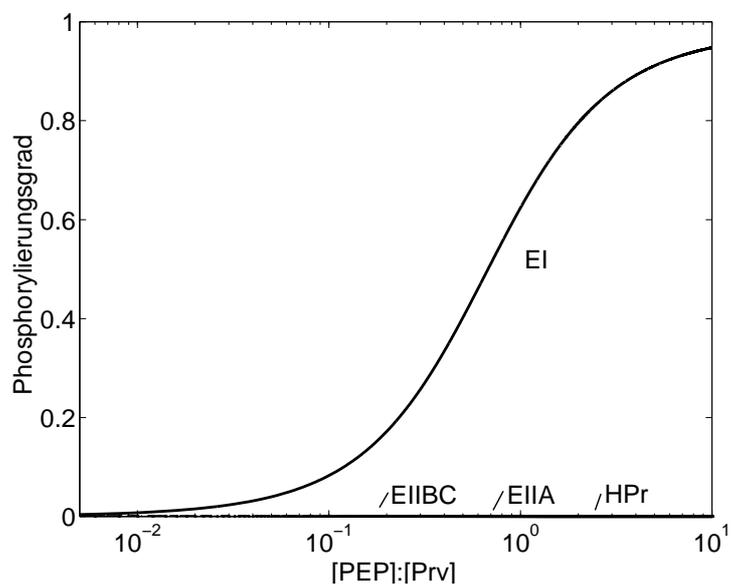
Zur Beschreibung der Signaltransduktionseigenschaften ist die Betrachtung von stationären Kennlinien ausreichend (Kap. 3.2.3).

### 3.2.2 EI-Monomer-Dimer-Zyklus: Simulationsstudien zu verschiedenen Modellvorstellungen

Der Monomer-Dimer-Zyklus wurde oft als geschwindigkeitsbestimmender Schritt innerhalb des PTS angesehen [20]. Dabei war allerdings bisher ungeklärt, ob der Zyklus von Komplexbildung und -zerfall bei jeder Übertragung einer Phosphorylgruppe durchlaufen wird [20]. Simulationsexperimente zeigen (Abb. 3.6), dass auch bei Zuckermangel ( $3 \text{ mg/l} = 9 \mu\text{M}$ ) der Phosphorylierungsgrad der PTS-Proteine HPr, EIIA und EIIBC, d.h. der Anteil von phosphoryliertem Protein an der Gesamtkonzentration (siehe auch Kap. 3.2.3) immer Null ist, wenn die P-Übertragung vom EI zum HPr ist nur vom Monomer aus möglich ist, weswegen das Dimer zuerst dissoziieren und nach erfolgter P-Weitergabe wieder assoziieren muss. Dabei wurden physiologisch relevante PEP:Pyruvat-Verhältnisse (0.01 bis 10) betrachtet. Für Zuckerlimitierung ist aber ein hoher Phosphorylierungsgrad zu erwarten, was für EIIA<sup>Crr</sup> in Kap. 4 auch experimentell gezeigt wurde. Das Modell mit der alleinigen Phosphatübertragung vom EI-Dimer aus mit den bereits aufgeführten kinetischen Parametern muss daher verworfen werden.

Wird dagegen die P-Übertragung vom Monomer und Dimer aus erlaubt, wie in Fig. 1.3, Seite 35 dargestellt, kann das experimentell beobachtete Verhalten auch im Modell erreicht werden. Dies ist im nächsten Teilkapitel ausführlich beschrieben (siehe auch Abb. 3.7). Der Monomer-Dimer-Zyklus wird jetzt kaum noch durchlaufen, sondern die vorherrschende Form ist das Dimer, das nicht mehr ständig in die Monomere zerfällt. Das Dimer kann sowohl die Phosphorylgruppe vom PEP aufnehmen als auch zum HPr weiterleiten. Lolkema et al. zeigten, dass der Transporter für Mannitol EnzymII<sup>mtl</sup> als Dimer vorliegt und funktionell ist [92]. Die gesamte Proteinkette des PTS kann als Dimer vorliegen und so die beiden als Dimer vorliegenden Transporter mit Phosphorylgruppen versorgen. Ein als Dimer vorliegendes und funktionierendes EI passt sehr gut in dieses Bild der komplett als Dimer vorliegenden PTS-Kette.

Eine zweite Möglichkeit zur Erreichung eines physiologisch sinnvollen Modelles ist die deutliche Erhöhung der Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziations- und Assoziationsreaktionen des Dimers. In einer weiteren Simulationsstudie (Daten nicht gezeigt) wurden die Konstanten für Hin- und Rückreaktion der Reaktionen 3-5 in Gl. 3.5 jeweils um denselben Faktor erhöht, was die Gleichgewichtslage ( $K_{eq}$ ) nicht verändert. Ab einem Faktor von etwa 10000 ergeben sich Verläufe



**Abbildung 3.6:** Phosphorylierungsgrad der PTS-Proteine über dem PEP:Pyruvat-Verhältnis bei  $[eSCR] = 0.003 \text{ g/l} \approx 9 \mu\text{M}$ , wenn die Phosphorylierübertragung nur vom EI-Monomer zum HPr möglich ist und der Monomer-Dimer-Zyklus also bei jeder Übertragung durchlaufen werden muss.

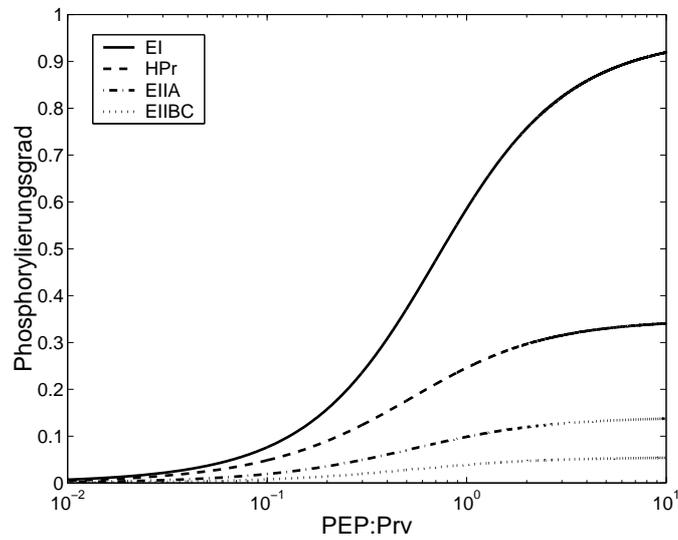
der Phosphorylierungsgrade, ähnlich den Verläufen mit P-Übertragung vom Dimer aus. Es ist unklar, ob solch enorme Steigerungen der Reaktionsraten durch das bisher nicht berücksichtigte 'molecular crowding', also die lokale Erhöhung der Proteinkonzentration und Komplexbildung, *in vivo* erreicht wird. In dieser Arbeit wurde daher mit einer möglichen P-Übertragung vom Dimer aus gerechnet. Eventuell könnte in einem solchen Fall auch auf die Beschreibung von Monomer und Dimer verzichtet werden.

Durch diese Studie wird der Nutzen der mathematischen Modellierung und Simulation deutlich. Es können Hypothesen für Teilbereiche des Stoffwechsels, die sich bisher einer experimentellen Messung entzogen haben, erarbeitet werden.

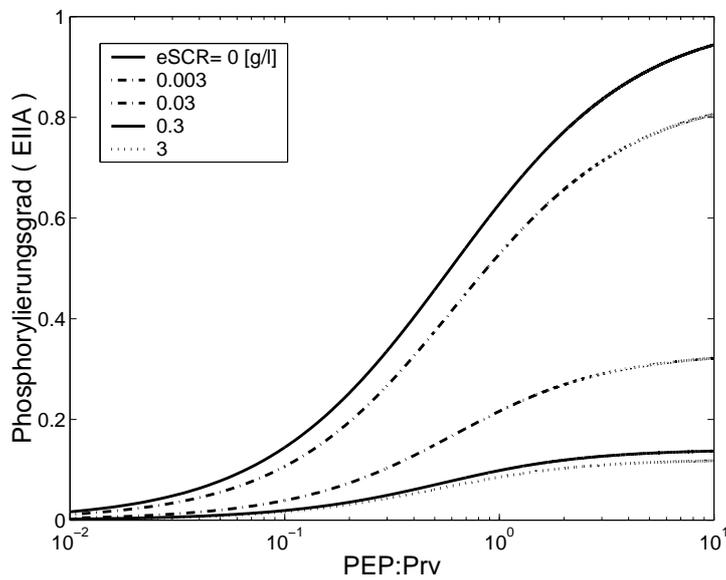
### 3.2.3 Stationäre Kennlinien

Zur Beschreibung der Signaltransduktionseigenschaften des PTS wurden stationäre Kennlinien berechnet. Diese beschreiben die Abhängigkeit der Phosphorylierungsgrade der PTS-Proteine, d.h. des Anteils von phosphoryliertem Protein an Gesamtprotein, von der Substrat-, sowie PEP- und Prv-Konzentration. Die letztgenannten Größen stellen die Eingangsgrößen und die Phosphorylierungsgrade die Ausgangsgrößen des Systems bezüglich der Signaltransduktion dar. Die vierte Eingangsgröße Sucrose 6-Phosphat (Scr6P) beeinflusst im physiologisch relevanten Bereich weder den Stofffluss, noch die Signaltransduktion über das PTS und wurde deswegen nicht betrachtet [132]. Für eine Sucrosekonzentration von  $[Scr] = 0.3 \text{ g/l}$  ergibt sich für die PTS-Proteine die in Fig. 3.7 dargestellte Abhängigkeit. Mit zunehmendem PEP:Pyruvat-Verhältnis ergibt sich jeweils auch ein zunehmender Phosphorylierungsgrad, wobei die Verläufe für die einzelnen PTS-Komponenten unterschiedlich sind. Dies bedeutet, dass man an den einzelnen Gliedern der Signaltransduktionskette verschiedene Signale abgreifen kann. Diese können der Realisierung von verschiedenen regulatorischen Vorgängen über das PTS, wie etwa Katabolitenrepression und Chemotaxis dienen. Die errechneten Kennlinien hängen nicht nur vom PEP:Pyruvat-Verhältnis, sondern auch von der Gesamtmenge an PEP und Pyruvat ab. Für Gesamtkonzentrationen von mehr als  $4 \mu\text{mol/gTS}$  ist dies zu vernachlässigen, wie in den Berechnungen für Fig. 3.7 geschehen.

Bezieht man die Abhängigkeit von der dritten Eingangsgröße, der extrazellulären Sucrosekonzentration, in die Darstellung der Kennlinien mit ein, ergibt sich für  $EIIA^{Crr}$  der in Abb. 3.8 gezeigte Verlauf. Der Phosphorylierungsgrad des wichtigen Signals  $EIIA^{Crr}$  hängt, genauso wie der der anderen Komponenten, auch stark



**Abbildung 3.7:** Stationäre Kennlinien des PTS: Phosphorylierungsgrade der PTS-Proteine als Funktion des PEP:Pyruvat-Verhältnis bei konstanter Sucrosekonzentration  $[Scr] = 0.3 \text{ g/l} = 0.9 \text{ mM}$



**Abbildung 3.8:** Stationäre Kennlinien für  $EIIA^{Crr}$ . Phosphorylierungsgrade als Funktion des PEP:Pyruvat-Verhältnis und der Sucrosekonzentration

von der extrazellulären Zuckerkonzentration ab. Für niedrige Zuckerkonzentrationen ergibt sich ein hoher Phosphorylierungsgrad, was einer hohen Konzentration von  $EIIA^{Crr}$ -P entspricht und damit zu einer Aktivierung der cAMP-Produktion über die Adenylatcyclase führt, bei gleichzeitiger Verringerung des Induktorausschlusses über das unphosphorylierte  $EIIA^{Crr}$ . Bei hohem Zuckergehalt dagegen ergeben sich niedrige Phosphorylierungsgrade, die zu einer Drosselung der cAMP-Produktion und zu verstärktem Induktorausschluss führen.

Das PTS erweist sich damit als integrierendes System, das sowohl Signale von außerhalb, als auch innerhalb der Zelle verrechnet und daraus Ausgangssignale erzeugt. Die vorgestellten Kennlinien beschreiben die Signaltransduktion über das PTS auf geeignete Weise für *in vivo* Betrachtungen. Das Zusammenspiel mit den im Vergleich langsameren Prozessen der Glykolyse wird im nächsten Teilkapitel (Kap. 3.3) behandelt.

## 3.3 Glykolyse

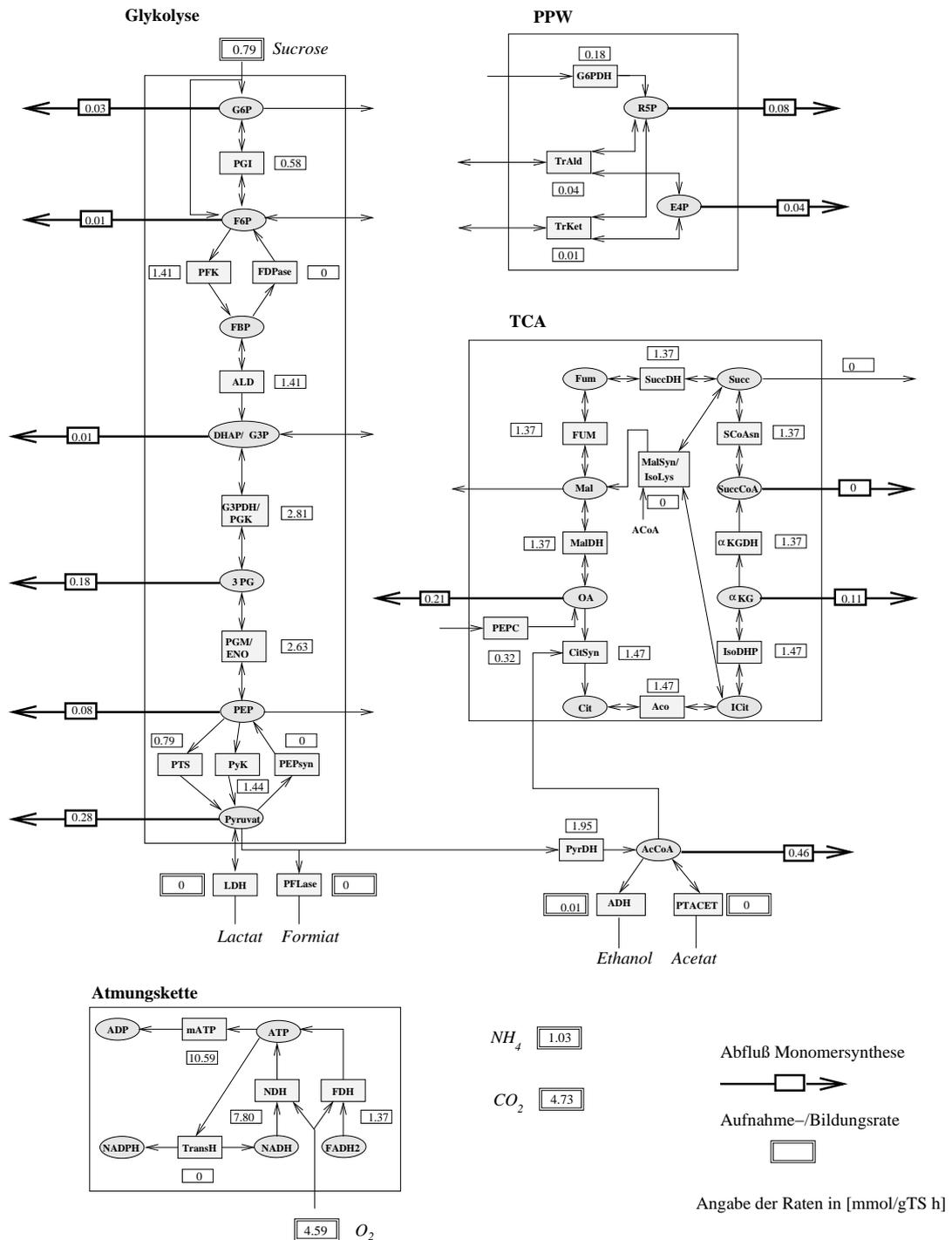
Zur Charakterisierung der Signaltransduktion innerhalb der funktionellen Einheit C-Stoffwechsel (Abb. 3.3, Seite 61) wird auch das Zusammenspiel des Sucrose PTS mit der Glykolyse betrachtet. Das PTS-Produkt Scr6P wird über ScrB und ScrK in die Glykolyse eingespeist und die Endprodukte der Glykolyse PEP und Pyruvat sind wiederum Eingangsgrößen für das PTS. PTS und Glykolyse stellen somit einen geschlossenen Kreis dar. In Abb. 3.9 sind alle Metabolite und die betrachteten Reaktionen dargestellt.

### 3.3.1 Metabolische Flussanalyse

Ziel des Verfahrens der metabolischen Flussanalyse ist die Berechnung von Stoffflussverteilungen durch ein gegebenes Reaktionsnetzwerk mit Hilfe von Messungen der Aufnahme- und Produktionsraten extrazellulärer Stoffe im stationären Zustand [70]. Daten zur Kinetik und Regulation werden hierzu nicht benötigt. Die theoretischen Grundlagen sind ausführlich in [115] dargestellt. Die Anwendung des Verfahrens auf die katabolischen Abbaureaktionen in *E. coli* wurde ebenfalls bereits beschrieben [139, 70].

In Abb. 3.10 ist die berechnete Flussverteilung für aerobes Wachstum einer stationären kontinuierlichen Kultur bei einer Durchflussrate von  $D = 0.1 [h^{-1}]$  dargestellt. Die doppelt umrandeten Vierecke enthalten die gemessenen Aufnahme- und





**Abbildung 3.10:** Flussverteilung für aerobes Wachstum auf Sucrose einer stationären kontinuierlichen Kultur von *E. coli* LJ210 bei einer Verdünnungsrate von  $D = 0.1 [h^{-1}]$ . Symbole wie im Text erläutert.

Bildungsraten der extrazellulären Produkte und Substrate. Intrazelluläre Metabolite sind in ein Oval eingetragen und Enzyme in ein einfach umrandetes Viereck. Ins Modell aufgenommen wurden nur die intrazellulären Metabolite, die sich an Verzweigungspunkten des Stoffwechsels befinden. Die fett gezeichneten Pfeile aus den Einheiten heraus, beschreiben die Abflüsse in die anabolische Monomersynthese.

Am Verzweigungspunkt Glc6P fließen Stoffströme sowohl in die Glykolyse, als auch in den Pentosephosphatweg (PPW). Das Verhältnis beträgt etwa  $\frac{3}{4}$  zu  $\frac{1}{4}$  und liegt damit auch für Sucrose in dem Bereich wie es für Wachstum auf Glucose (30-50% in den PPW) bestimmt wurde [70, 158, 157].

Die durch die etabolische Flussanalyse bestimmten Stoffflüsse (Reaktionsraten) dienen der Berechnung der maximalen Reaktionsrate für die dynamische Modellierung. Dabei kann mittels des kinetischen Ansatzes für ein Enzym bei bekannter stationärer Reaktionsrate  $r^*$ , Konzentrationsvektor  $\underline{c}^*$  und Parametervektor  $\underline{p}^*$  die maximale Rate für die enzymatisch katalysierte Reaktion  $r_{max}$  bestimmt werden:

$$r_{max} = \frac{r^*}{f(\underline{c}^*, \underline{p}^*)} \quad (3.6)$$

### 3.3.2 Dynamisches Modell

Das dynamische Modell für die Glykolyse wurde bereits beschrieben [70, 71, 161, 162]. Es umfasst die Metabolite und Reaktionen, wie in Abb. 3.9 dargestellt. Die verwendeten kinetischen Ansätze und die Parameter des Modells, die zum Teil durch Identifikation aus experimentellen Ergebnissen bestimmt wurden, sind in Anhang A (Seite 124) zusammengefasst.

Die Glykolyse-Enzyme werden weitgehend konstitutiv exprimiert, so dass ihre Gesamtkonzentration relativ konstant ist. Dies ist in einigen Arbeiten experimentell nachgewiesen worden [7], speziell durch DNA-Expressionsprofiling mittels Microarrays. Hier wurden kaum Expressionsunterschiede der Glykolyse-Enzyme beim Vergleich von Wachstum auf Glucose und Glycerol gefunden [118]. Und auch bei einer Überexpression wichtiger Enzyme kam es kaum zu einer Veränderung des Gesamtflusses über die Glykolyse, was auf eine hohe Robustheit dieses zentralen Stoffwechselwegs hindeutet [138].

Die Abflüsse in die Biosynthesereaktionen, wie in Abb. 3.10 aufgeführt, sind als Reaktionen erster Ordnung beschrieben [70]. Die Konstanten wurden aus der

Flussanalyse und den stationären Metabolitkonzentrationen bestimmt:

$$r_{Metabolit}^{syn} = k_{Metabolit}^{syn} \cdot [Metabolit] \quad (3.7)$$

Noch nicht im Modell enthalten sind zwei spezifische Prv-Transporter, wie bereits beschrieben [75, 78]. Diese werden für Experimente mit dem Substrat Pyruvat von Bedeutung sein.

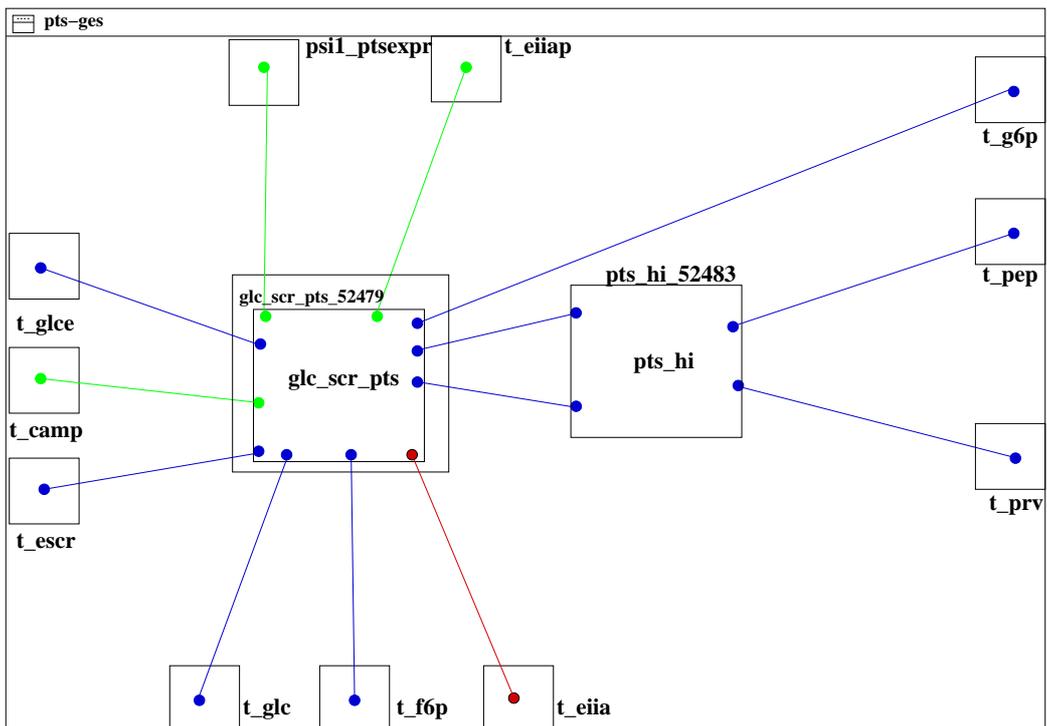
### 3.4 Modellierungswerkzeug, Sensitivitätsanalyse und Parameteridentifikation

Die dynamischen Modelle für das PTS und die Glykolyse wurden mittels des Modellierungswerkzeugs ProMoT implementiert [41]. ProMoT bietet die Möglichkeit mittels objekt-orientierter Modellierung das skizzierte Modellierungskonzept (Kap. 3.1) anzuwenden und die zu erstellenden Modellgleichungen automatisch zu generieren. Diese können anschließend simuliert und analysiert werden. Beispielsweise kann eine Sensitivitätsanalyse der Modellparameter sowie eine Schätzung unbekannter Parameter aus experimentellen Daten erfolgen [42]. Die Implementierung erfolgt durch Verknüpfung der in Abb. 3.4 dargestellten elementaren Modellbausteine und Zuweisung der entsprechenden kinetischen Ansätze. Der strukturelle Modellaufbau ist für den PTS-Baustein in Fig. 3.11 und Fig. 3.12 gezeigt.

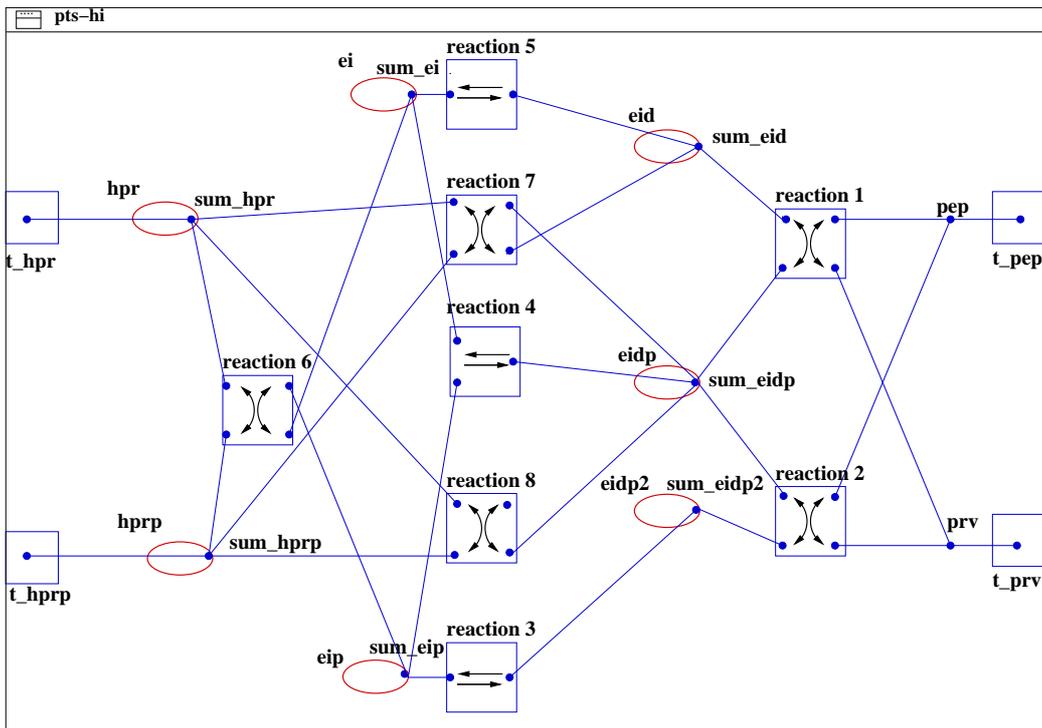
Die Strukturierung und hierarchische Gliederung erfolgt dabei anhand der festgelegten biologischen funktionellen Einheiten und Untereinheiten.

Mit ProMoT können Modelle für die Simulationsumgebung DIVA erstellt werden. Der ProMoT-Benutzer kann so auf die umfangreichen in DIVA implementierten Simulations- und Analysemethoden, sowie die numerischen Methoden zurückgreifen [99, 155]. Einfache Simulationen sind auch mit parallel in MATLAB (und ACSL) implementierten Modellen durchgeführt worden. Sensitivitätsanalysen und Parameteridentifikation sind allerdings aus Gründen enorm langer Rechenzeit kaum mehr in MATLAB zu realisieren.

Innerhalb der Modellvalidierung kommt der Schätzung von unsicheren oder unbekanntem Parametern mit Hilfe von Messdaten aus einem realen Experiment eine wichtige Aufgabe zu. Es ist hierfür notwendig, dass diese Parameter gegenüber der Zielfunktion aus der Differenz zwischen simulierten Messgrößen und Messdaten sensitiv sind. Daher ist vor einer Parameterschätzung zu überprüfen, ob eine



**Abbildung 3.11:** Implementierung des PTS-Bausteins mittels des Modellierungswerkzeugs ProMoT. Das PTS wird hierbei zur Vereinfachung in die allgemeinen (pts\_hi) und die spezifischen Proteine (glc\_scr\_pts) aufgeteilt. Ein- und Ausgänge für Konzentrationen sind mit “t\_” gekennzeichnet.



**Abbildung 3.12:** ProMoT-Implementierung des Bausteins für die allgemeinen PTS-Proteine EI und HPr. Ein- und Ausgänge für Konzentrationen sind mit “t\_” gekennzeichnet. Die Nummerierung der Stoffwandler ist entsprechend Gl. 3.5.

solche Parametersensitivität vorliegt. Diese Sensitivitätsanalyse wurde in dieser Arbeit auf der Basis der Fisher-Informationsmatrix durchgeführt, was in früheren Arbeiten bereits ausführlich dargestellt wurde [99, 161]. Dieses Verfahren liefert die Parameter des Modells, die mit den gegebenen Messdaten und der geforderten Genauigkeit gemeinsam geschätzt werden können.

Für die Parameteridentifikation muss die Zielfunktion für das Schätzverfahren minimiert werden [99]. Als numerische Löser wurden hierfür in MATLAB die Routine SIMPS (Simplex-Strategie) und die bereits etablierte Evolutionsstrategie verwendet [127]. Das Verfahren erwies sich allerdings gegenüber der Identifikation mit DIVA als sehr langsam.

### **3.5 Abgrenzung biologischer Funktionseinheiten mit mathematischen Methoden**

Zur Abgrenzung relevanter Einheiten aus dem komplexen Metabolismus-Netzwerk einer Zelle können neben den hier verwendeten verbalen Kriterien auch formale mathematische Verfahren geprüft werden [29, 141]. Speziell die Metabolische Kontrolltheorie ist hierfür eingesetzt worden [62, 133]. Sie ist eine Analyse-methode für die Bestimmung der Verteilung der Kontrolle des Flusses und der Metabolitkonzentrationen in einem Stoffwechselweg durch die Enzyme, die den Stoffwechselweg bilden.

Ein neues Verfahren, das sich bei einem ersten Vergleich mehrerer Vorgehensweisen als vielversprechend erwies, soll hier dargestellt werden. Es verwendet ein bereits formuliertes DAE-Modell (Differential- und algebraische Gleichungen) eines biologischen Netzwerkes. Zustände des Modells können dabei sowohl Metabolit- und Enzymkonzentrationen, als auch Konzentrationen extrazellulärer Substrate oder der Biomasse sein. Ziel war eine gleichzeitige Gruppierung sowohl von Metaboliten, als auch von Genprodukten zu ermöglichen, da zur Modellierung einer Funktionseinheit sowohl Metabolit-, als auch Genproduktkonzentrationen mathematisch in einer Einheit beschrieben werden müssen. Dies entspricht nicht der Abgrenzung von genetischen Funktionseinheiten, wie sie von biologischer Seite seit langem vorgenommen werden und die in einer genetischen Strukturierung in Operons, Regulons und Modulons resultiert. Mit der Hilfe von Linkage-Methoden aus der Cluster-Analyse konnten die modellierten Zustandsvariablen unter Verwendung eines Abstandsmaßes unterteilt werden [8, 43].

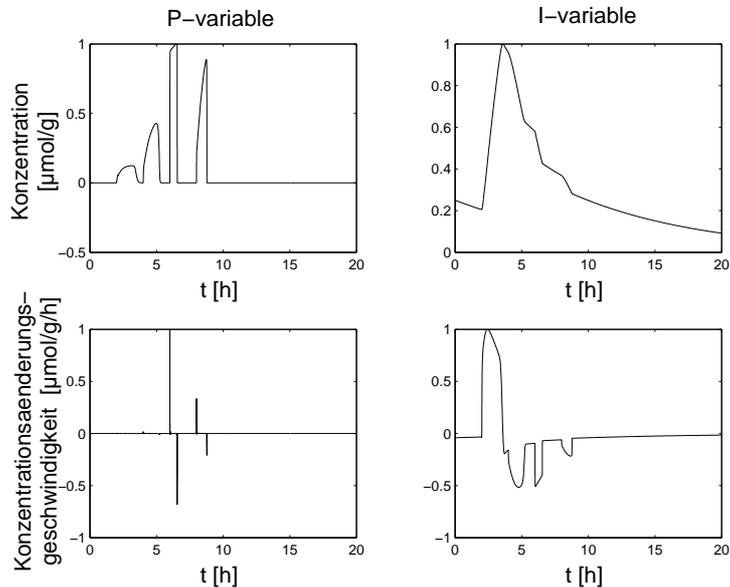
Die Linkage-Methoden sind statische Verfahren und ermöglichen die interne Strukturierung einer Menge von Objekten. Sie werden in zahlreichen Anwendungen

eingesetzt. Man benötigt hierfür ein Abstandsmaß zwischen den zu strukturierenden Objekten, das die Strukturierungskriterien widerspiegelt. Dies kann entweder direkt aus den Objekten oder über einen zugehörigen Eigenschaftsvektor berechnet werden. Die betrachteten Objekte sind hier die Elemente des Reaktionsnetzwerkes, repräsentiert durch die Zustände des DAE-Modells [161]. Aus der Abstandsinformation erhält man durch einen Linkage-Algorithmus [43] eine Baumstruktur (Dendrogramm), die die hierarchische Gliederung der Variablen darstellt. Diese Hierarchie basiert, anders wie das von Lengeler formulierte Konzept [80], nicht auf Epistasie, also auf der Dominanz eines Regulators über einen anderen, sondern auf einem quantifizierbaren Abstandsmaß. Es existieren verschiedene Linkage-Methoden (single, complete, average, centroid, ward), die sich jeweils nur im Subalgorithmus zur Abstandsberechnung unterscheiden. Basierend auf dieser Hierarchie können Gruppen von Zuständen isoliert werden, die kaum mit anderen Zuständen wechselwirken und daher den gesuchten Einheiten, bzw. Untereinheiten entsprechen.

Es wurden verschiedene Abstandsmaße untersucht, die sich in zwei Gruppen aufteilen lassen: Erstens auf der Basis der Jacobi-Matrix des linearisierten Systems an verschiedenen Punkten des Zustandsraumes und zweitens auf der Basis von typischen Lösungen des Systems. Unter Verwendung der Jacobi-Matrix konnten gute Ergebnisse für Metabolische Netzwerke ohne Genexpression erzielt werden, während eine gleichzeitige Gruppierung von Metaboliten und Genprodukten nicht möglich war (nicht gezeigt).

Ein zweiter Ansatz war die Verwendung von typischen Lösungen (Trajektorien) des Modells. Durch Korrelierung, wann die verschiedenen Zustände aktiv sind, erhält man die für den Linkage-Algorithmus notwendige Abstandsinformation. Die entscheidenden Schritte des Algorithmus waren die Wahl von typischen Trajektorien und die Definition von Aktivität. Es wurden zwei Arten von Variablen definiert, entsprechend dem typischen Verlauf ihrer Trajektorien: Langsame I-Variablen (Integral) zeigen normalerweise flache Rampen mit verschiedenen Steigungen in den betrachteten Zeitintervallen (Abb. 3.13). Sie wurden aktiv definiert, wenn ihre Konzentration zunimmt, d.h. die Ableitung positiv ist. Genprodukte fallen normalerweise in diese Klasse. Im Gegensatz dazu sind schnelle P-Variablen (Proportional) durch Sprünge, bzw. steile Rampen gekennzeichnet und wurden als aktiv definiert, wenn ihr Werte über einem bestimmten Schwellenwert liegen. Formal wurden die langsamen und schnellen Variablen über die Berechnung eines Index  $I_i$  getrennt:

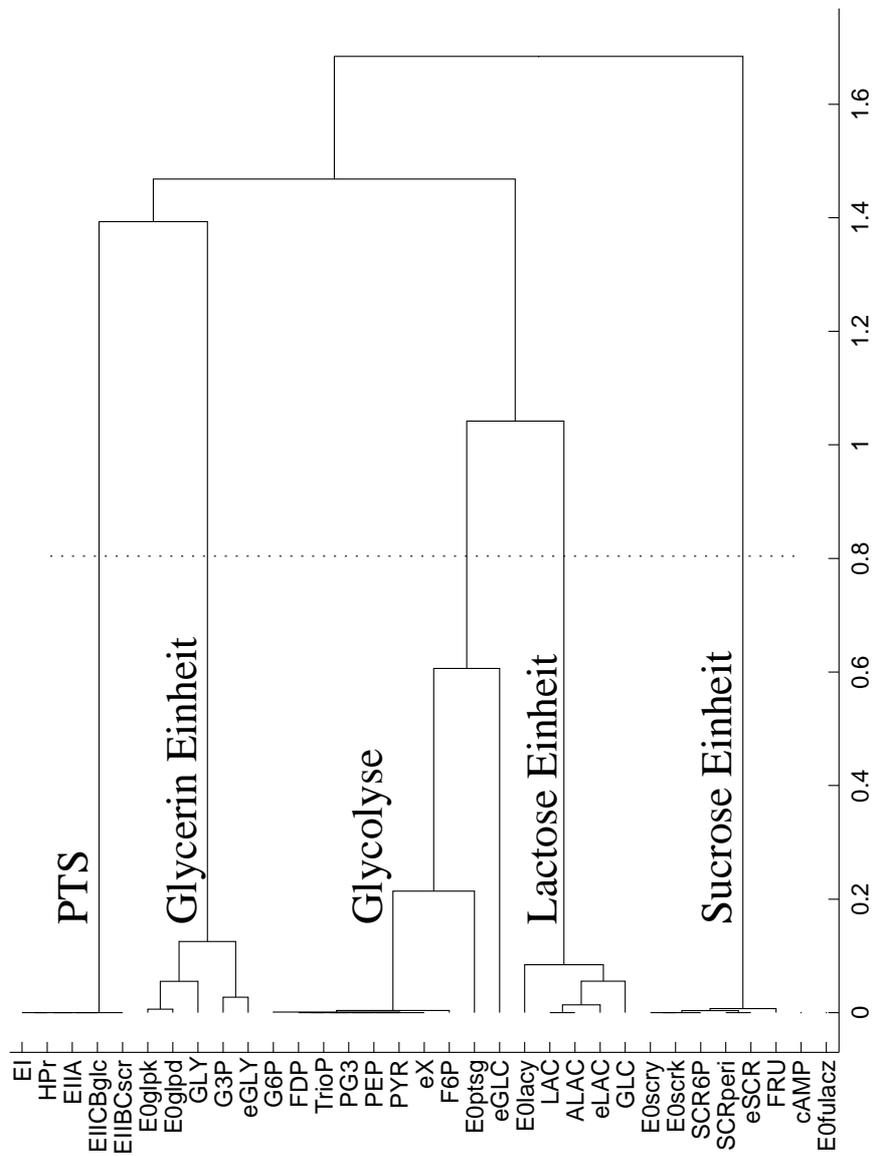
$$I_i = \frac{f_i^{max}}{f_i} \quad (3.8)$$



**Abbildung 3.13:** Normierte Trajektorien und deren Ableitungen von typischen P- und I-Variablen. Erläuterungen siehe Text.

mit dem Maximum  $f_i^{max}$  und dem Mittelwert  $\bar{f}_i$  der Konzentrationsänderungsgeschwindigkeit des Stoffes  $i$  entlang der betrachteten Trajektorie. Für eine schnelle Komponente (P-Variable) ist die maximale Konzentrationsänderungsgeschwindigkeit hoch verglichen mit Mittelwert, da sich die Konzentration des Stoffes  $i$  nach einer Änderung der Umgebungsbedingungen zuerst schnell, dann aber kaum noch ändert. Daher ist für schnelle P-Variablen der Index  $I_i$  kleiner als für langsame I-Variablen. In der Anwendung dieses Algorithmus auf weitere Modelle und Zustandsvariablen können weitere Definitionen von Aktivität notwendig werden. Dies wird in weiterführenden Betrachtungen mit anderen Modellen, zum Beispiel zur EGF-Signalverarbeitung, untersucht.

Unter Verwendung dieser Aktivitätsdefinition konnte der Abstand zwischen zwei Zuständen berechnet werden, abhängig davon wie oft beide Zustände in einer typischen Trajektorie zusammen aktiv sind. Basierend auf diesem Abstandsmaß konnte die Baumstruktur mit den bereits erwähnten Linkage-Methoden berechnet werden. Für ein Modell, das neben den in dieser Arbeit verwendeten Module für das Scr-PTS und die Glykolyse, auch noch Bausteine für den Transport von Glucose, Lactose und Glycerin enthält [161], ist das sich ergebende Dendrogramm in Abb. 3.14 gezeigt [74]. Es wurden alle Zustände des Modells, also auch die extrazellulären, miteinbezogen, was für eine Bestimmung der intrazellulären Einheiten nicht unbedingt notwendig ist. Zur Identifikation isolierter Einheiten betrachtet



**Abbildung 3.14:** Dendrogramm: Erzeugt durch Cluster-Analyse eines Modells des Transports von vier Kohlenhydraten und der Glykolyse [161]. Die horizontale Achse beschreibt den Abstand zwischen den Zuständen und Gruppen. Durch Auftrennung an der gestrichelten Linie erhält man die benannten Einheiten.

man den Abstand zwischen der Einheit und dem Zusammenschlusspunkt mit einer weiteren Einheit. Dieser Isolationsindex ist ein Maß für die Abgetrenntheit einer Einheit. Bei PTS, der Glycerin-Einheit und der Sucrose-Einheit ist ein hoher Isolationsindex zu erkennen. Wie bereits erläutert, werden in den mit diesem Algorithmus ermittelten Einheiten sowohl Metabolite, als auch Genprodukte zusammengefasst.

Für die Glykolyse und die Lactose-Einheit ist er etwas geringer, doch immer noch hoch genug, um sie als separierte Einheiten zu identifizieren. Dieser etwas geringere Abstand ist aus biologischer Sicht nicht zu erklären. Dagegen sind die Abstände bei Abstandsmaß  $\approx 1.4$  (rechts der gestrichelten Linie) zu gering, um eine weitere hierarchische Strukturierung dieser fünf Einheiten (metabolic pathways) zu erhalten. So können Einheiten, wie das hierarchisch dominante *crpA*-Modulon nicht erkannt werden.

Einige Ergebnisse wie die Zuordnung der Gesamtkonzentration des Glucose-Transporters (E0ptsg) zur Glykolyse sind ungewöhnlich bezüglich der klassischen Einteilung. Es wurden aber alle mit verbalen Kriterien definierten Einheiten (PTS, Glycerin-Einheit, Glykolyse, Lactose-Einheit, Sucrose-Einheit) ebenfalls durch diesen formalen Algorithmus gefunden. So sind zum Beispiel für das PTS alle dazugehörigen modellierten Zustände EI, HPr, EIIA, EIICB<sup>Glc</sup> und EIIBC<sup>Ser</sup> durch U-Linien geringer Höhe verbunden. Die Höhe der U-Linien repräsentiert den Abstand zwischen den verbundenen Zuständen. Die verschiedenen PTS-Proteine sind daher sehr eng miteinander verbunden und klar getrennt von den anderen Einheiten. Dasselbe zeigt sich auch für die anderen Gruppen. PEP und Prv wurden hier der Glykolyse und nicht dem PTS zugeordnet. Betrachtet man nur die funktionelle Einheit Sucrose-Transport und -Metabolismus und die Glykolyse, so ergaben sich zwei Untereinheiten: Das Sucrose-PTS und die Glykolyse mit den Metaboliten Glc6P und Fru bis PEP und Prv.

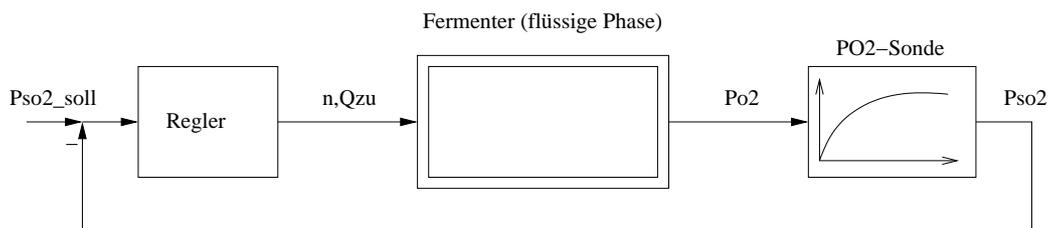
Dieser formale, mathematische Ansatz bietet die Möglichkeit, biologisch-motivierte Strukturen im Hinblick auf die tatsächliche Vernetzung zu überprüfen. Der Ansatz muss aber noch an weiteren Modellen anderer Struktur überprüft werden. Im Weiteren kann er zur Strukturierung komplexer metabolischer Netzwerke unbekannter oder unsicherer Struktur verwendet werden und so derartige Netzwerke einer modularen Modellierung zugänglich machen. Ein ähnlicher Ansatz wurde bereits zum Clustering der Zellzyklusproteine von *Caulobacter crescentus* basierend auf Expressionsdaten verwendet [47] und kann also sowohl mit experimentellen wie auch simulierten Daten genutzt werden. Dies wurde auch mit anderen Ansätzen zur Cluster-Analyse bereits gezeigt [22][110][171].

# Kapitel 4

## Experimentelle und Simulations-Ergebnisse

### 4.1 Sauerstoffregelung

Es soll die gelöste Sauerstoffkonzentration bei stationären kontinuierlichen Kulturen auf einem konstanten, relativ kleinen Wert von 5 bis 10 % der Sättigung gehalten werden. Der in Abb. 4.1 skizzierte Regelkreis wurde betrachtet. Im Fermenter können drei Phasen unterschieden werden, die Biophase bestehend aus den Mikroorganismen, die Flüssigphase und die Gasphase [161]. Der Stoffübergang  $r_{O_2}$  des Sauerstoffs aus der gasförmigen Phase, bestehend aus aufsteigenden Gasblasen und dem Gasvolumen über der Flüssigkeit, in die flüssige Phase wird durch



**Abbildung 4.1:** Regelkreis der  $p_{O_2}$ -Regelung mit Führungsgröße  $P_{so2\_soll}$ , der Regelgröße  $P_{o2}$  und dem Messwert  $P_{so2}$ . Als Stellgrößen können sowohl die Drehzahl  $n$  des Fermenterrührers, als auch der Volumenstrom  $Q_{zu}$  der Zuluft verwendet werden.

Gleichung 4.1 beschrieben:

$$r_{O_2} = k_l \frac{A}{V_F} (c^* - [O_2]) = k_l a (c^* - [O_2]) \quad (4.1)$$

$k_l$ : Stoffübergangszahl

$\frac{A}{V_F} = a$ : Volumenbezogene Phasengrenzfläche

$c^*$ : Gleichgewichtskonzentration an der Phasengrenzfläche

In der Regel kann man den Transport des Sauerstoffs von der Phasengrenzfläche in den Kern der Flüssigkeit als den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt annehmen. Für die Bilanz des Sauerstoffs in der flüssigen Phase ergibt sich mit dem Zu- und Abfluss und dem volumenbezogenen zeitveränderlichen Verbrauch  $q_v(t)$  durch den Stoffwechsel der Mikroorganismen:

$$\frac{dc}{dt} = k_l a (c^* - [O_2]) - q_v(t) + D([O_2]^{zu} - [O_2]) \quad (4.2)$$

Zur Messung der Sauerstoffkonzentration als Partialdruck  $p_{O_2}$  wird am ISR eine Platin-Silber-Sauerstoffsonde der Firma Bioengineering eingesetzt. Bei ausreichender Anströmung weist der Sensor PT<sub>1</sub>-Verhalten auf. Die Anzeige erreicht 98 % des Endwerts in weniger als 45 s. Dies entspricht einer maximalen Zeitkonstante  $T_S = 11.5$  s. Der vom Sensor angezeigte Messwert  $p_{sO_2}$  wird über folgende Sensorgleichung beschrieben:

$$\dot{p}_{sO_2} = \frac{1}{T_S} (p_{O_2} - p_{sO_2}) \quad (4.3)$$

Es treten eine Reihe von Störungen auf. Messrauschen ergibt sich bei hohen Rührerdrehzahlen dadurch, dass Luftblasen mit hoher Geschwindigkeit gegen die Membran des Sauerstoffsensors prallen und diese dadurch in Berührung mit der gesättigten Grenzschicht der Luftblase kommt. Bei niedrigen Drehzahlen können Luftblasen zeitweise an der Membran haften. Der dabei angezeigte Wert der Messrichtung strebt mit der Zeitkonstante der Sonde gegen den Sättigungswert. Des Weiteren führt verbrauchter Elektrolyt zu immer schwächeren SONDENSIGNALEN. Störungen des Sauerstoffverbrauchs treten durch die pulsformige Zugabe des Antischaummittels (Kap. 2.1.2) und durch Pumpenschleiß bedingte Schwankungen in der Feedingrate auf.

Es wurden eine Reihe von Regelverfahren untersucht [48, 4]. Die besten Resultate wurden mit einem adaptiven PI-Regler je nach Stellgröße mit oder ohne Anti-Windup erzielt. Als Stellgrößen wurden sowohl die Rührerdrehzahl, als auch die

Belüftungsrate verwendet. Der PI-Regler macht den Sollwert zu einer stabilen Ruhelage des geschlossenen Regelkreises und hat keine bleibende Regelabweichung. Allerdings muss ein Kompromiss zwischen schneller Ausregelung von Regelabweichungen und Störanfälligkeit eingegangen werden.

Von adaptiven Reglern spricht man, wenn die Reglerparameter bei Änderung der Streckenparameter ebenfalls geändert werden. Dazu muss die Parameteränderung der Strecke erkannt werden und eine Adaptionsstrategie vorliegen, nach der die Parameter des Reglers verändert werden. Selbsteinstellende Adaptionsfähigkeit wurde durch einen adaptiven Regler mit Rückführung (des Integratorinhalts  $I$ ) erreicht. Die Reglergleichung 4.4 beschreibt die Abhängigkeit der Stellgröße  $y$  von der Regelabweichung  $e$  und dem Integratorinhalt  $I$ :

$$y = P\left(e + \frac{1}{T_i}I\right) \quad (4.4)$$

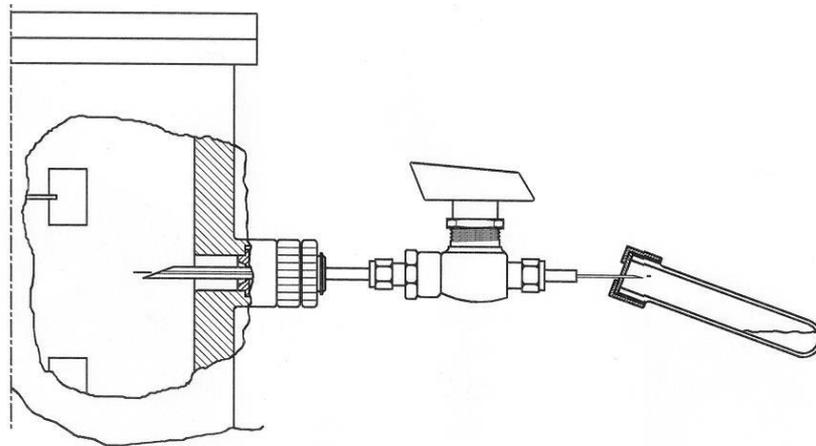
Für den adaptiven Regler wurden die Änderungen des Integratorinhalts  $I$  und der Reglerverstärkung  $P$  mit folgender Adaptionsregel implementiert:

$$\dot{I} = \begin{cases} -b_1 I + e & ; I > I_{soll} + \Delta I \\ e & ; I_{soll} \leq I \leq I_{soll} + \Delta I \\ b_2 I + e & ; I < I_{soll} \end{cases} \quad (4.5)$$

$$\dot{P} = \begin{cases} b_1 P & ; I > I_{soll} + \Delta I \\ 0 & ; I_{soll} \leq I \leq I_{soll} + \Delta I \\ -b_2 P & ; I < I_{soll} \end{cases} \quad (4.6)$$

Bei großen Sollwertsprüngen, aber auch plötzlichen Änderungen der Streckenparameter kann es zu länger andauernden großen Regelabweichungen kommen. Diese können den Integratorinhalt des PI-Reglers stark verändern. Wenn die Stellgröße an die Stellwertbeschränkung stößt, ist die weitere Integration der Regelabweichung jedoch nicht mehr sinnvoll. Durch dieses Hochwinden (Windup) des Integrators können nicht schwingungsfähig parametrisierte Regler starke Schwingungen erzeugen. Man kann dieses Verhalten durch sogenannte Anti-Windup-Strategien verhindern [5]. Dies erwies sich in Versuchen mit dem Volumenstrom der Zuluft als Stellgröße als sinnvoll und wurde mit der Stellgröße  $y$ , der Regelabweichung  $e$ , der Reglerverstärkung  $P$  und der Nachstellzeit  $T_i$  in folgender Berechnungsvorschrift realisiert:

$$I = \begin{cases} \int edt & ; y_{min} \leq y \leq y_{max} \\ \left(\frac{y_{min}}{P} - e\right)T_i & ; y < y_{min} \\ \left(\frac{y_{max}}{P} - e\right)T_i & ; y > y_{max} \end{cases} \quad (4.7)$$



**Abbildung 4.2:** Schnelle Probenahmetechnik [139]. Erläuterungen im Text.

## 4.2 Methodenentwicklung: Analytik intra- und extrazellulärer Metabolite

### 4.2.1 Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen

Der Umsatz intrazellulärer Metabolite liegt im Bereich weniger Sekunden [126][37][153]. Dies erfordert ein Abstoppen (Quenching) des Zellmetabolismus in weniger als einer Sekunde, um nachträgliche Veränderungen der Konzentrationen zu verhindern [135]. In der Literatur sind Methoden beschrieben. Diese wurden überprüft. Des Weiteren ist eine einfache schnelle Probenahmetechnik notwendig, die mittels einer Nadel mit dünnem, kurzem Metallrohr realisiert wurde (Abb. 4.2). Der Fermenterinhalt strömte ohne zusätzlich angelegten Überdruck aus. Auch für die Probenahmeröhrchen wurde kein Unterdruck verwendet. Diese einfache Technik erlaubt eine Entnahme von Proben aus dem Fermenter innerhalb von ca. 800 ms. Eine ähnliche Probenahmetechnik mit Verwendung von Unterdruck in den Probenahmeröhrchen wurde von Theobald verwendet [153].

Weitere Problemfelder, die beim Quenching zu beachten sind, sind Empfindlichkeit gegen Störungen während der Kulturführung im Fermenter oder im Schüttelkolben, Zellaufschluss bei Einfrieren der Zellen, zum Teil Instabilität der Metabolite bei hohen Temperaturen und Enzymaktivität bei tiefen Temperaturen.

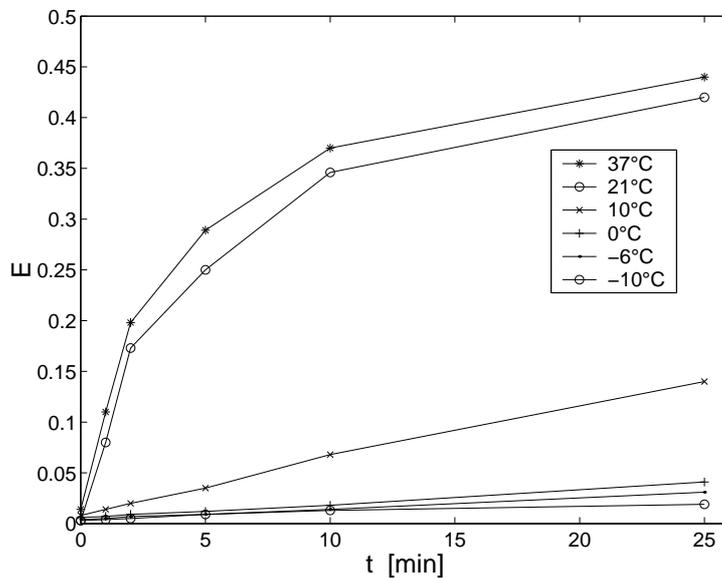
Will man intra- und extrazelluläre Konzentrationen getrennt bestimmen, ist eine schnelle Abtrennung des Mediums von der Zellmasse notwendig. Kritisch hier-

bei ist neben der benötigten Zeit, dass extrazellulär vorliegende Metabolite an der Zellmembran anhaften können und so die Messung desselben intrazellulär vorliegenden Metaboliten verfälschen können. Zur Abtrennung wurden ebenfalls einige Methoden untersucht.

Der letzte notwendige Schritt ist der Aufschluss der Zellen, um die intrazellulären Metabolite messen zu können. Auch hierzu sind verschiedene Methoden möglich.

#### **4.2.1.1 Studie zur Enzymaktivität bei Temperaturen bis $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$**

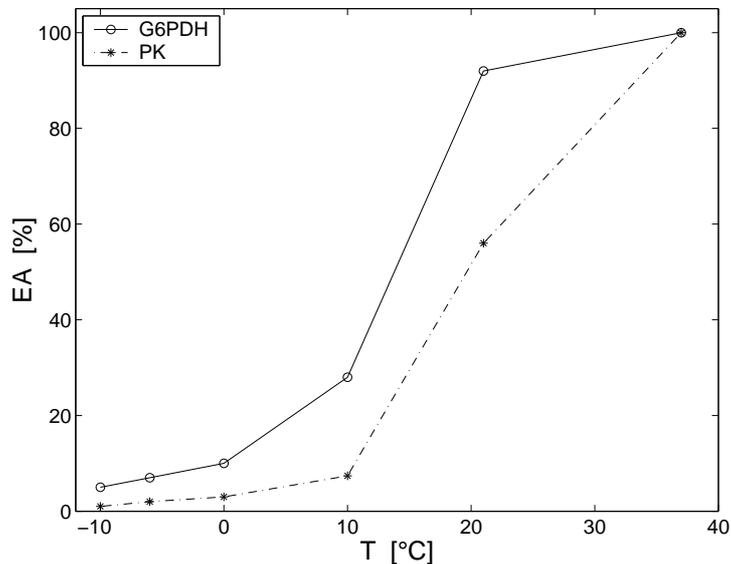
Zum Abschätzen der verbleibenden Aktivität der Enzyme Glucose 6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) und Pyruvat-Kinase (PK) bei Quenching mittels Abkühlen der Zellen wurden die enzymatischen Tests für die Glc6P- und PEP-Bestimmungen (siehe Kap. 2.1.4.1, bzw. 2.1.4.2) bei verschiedenen Temperaturen mit einer Standardlösung bekannter Konzentration (0.5 g/l Glc 6-P, bzw. 0.15 mM PEP) durchgeführt. Im Wasserbad wurde ein Becherglas mit dem zehnfachen Ansatz aller Reagenzien, die für eine Konzentrationsbestimmung notwendig sind ohne das Substrat, auf die entsprechende Temperatur gebracht und gehalten. Durch einen Magnetrührer war eine stetige Durchmischung des Ansatzes und der Kühlflüssigkeit gewährleistet. Bei positiven Temperaturen wurden die Messungen in einem beheizbaren Wasserbad durchgeführt. Die tiefen Temperaturen wurden mit Kältemischungen aus Wasser, Eis und Ammoniumchlorid realisiert. Hierzu wurden zu jeweils 500 g Eis und 300 g Wasser bei  $0^{\circ}\text{C}$  3 g, bei  $-6^{\circ}\text{C}$  60 g und bei  $-10^{\circ}\text{C}$  100 g Ammoniumchlorid zugegeben. Die Temperatur im Becherglas wurde durch ein Thermometer mit Sensorstab durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des ebenfalls temperierten Substrats gestartet. Die verwendeten Enzyme waren G6PDH aus Hefe und PK aus Kaninchenmuskulatur (Roche). Zu definierten Zeitpunkten wurden die enzymatische Umsetzungen durch Quecksilberchlorid abgestoppt. Hierzu wurde je ein Zehntel des Reaktionsansatzes in temperierte Eppendorff-Cups überführt, in denen bereits Quecksilberchlorid (14  $\mu\text{l}$ , 50 mg/ml) vorgelegt war. Es erfolgte eine sofortige Durchmischung. Quecksilberchlorid führt zu einem vollständigen Abstoppen der Reaktion, ohne die Extinktion zu beeinflussen, was in Vorversuchen gezeigt wurde. Dem enzymatischen Ansatz musste zur Gefrierpunktniedrigung bei  $-6^{\circ}\text{C}$  13% und bei  $-10^{\circ}\text{C}$  25% Methanol zugesetzt werden. Die Extintionsverläufe bei verschiedenen Temperaturen sind für G6PDH in Abb. 4.3 dargestellt. Bei den tieferen Temperaturen wird im betrachteten Messzeitraum der Endwert der Reaktion nicht erreicht.



**Abbildung 4.3:** Messung der Reaktionskinetik der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase bei verschiedenen Temperaturen

Aus den Steigungen der Umsetzung sind die relativen spezifischen Enzymaktivitäten bei verschiedenen Temperaturen bestimmt worden (Abb. 4.4).

Bei 0 Grad sind die Enzyme zu etwa 3% (PK) und 10% (G6PDH) aktiv. Zieht man eine typische intrazelluläre Glc6-P-Konzentration für *E. coli* von etwa  $2 \mu\text{mol/gTS}$  und eine Enzymaktivität bei  $37^\circ\text{C}$  von etwa  $5000 \mu\text{mol/gTS h}$  [70], in Betracht, so errechnet sich für  $0^\circ\text{C}$  ein möglicher Umsatz des gesamten vorhandenen Glc6P innerhalb von 14 Sekunden. Für  $10^\circ\text{C}$  ergibt sich 5 Sekunden und für  $-10^\circ\text{C}$  immerhin noch 28 Sekunden. Diese Abschätzung lässt sich auf den gesamten Metabolismus der Zelle übertragen. Methoden, bei denen das Abstoppen des Metabolismus nur durch ein Abkühlen der Zellen auf eine Temperatur um den Gefrierpunkt des Wassers herum erreicht werden soll, können also, sobald sie länger als einige Sekunden benötigen, zu einer deutlichen Verfälschung der Messergebnisse führen. Diese Methoden (wie zum Beispiel das unten beschriebene Abstoppen des Stoffwechsels mit eiskalter Saline) sind daher als sehr kritisch zu bewerten.



**Abbildung 4.4:** Messung der relativen spezifischen Enzymaktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase bei verschiedenen Temperaturen

#### 4.2.1.2 Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvat (Prv)

Diese beiden Metabolite sind zur Beschreibung des PTS sehr wichtig, da sie direkte Eingangssignale darstellen. Zur Methodenentwicklung wurde deswegen die Messung dieser beiden Metabolite exemplarisch herangezogen.

**Veröffentlichte intrazelluläre PEP- und Prv-Messungen für *Escherichia coli*.** Für PEP bestimmte Hogema zwischen 1.6 und 3.8 mM in gewaschenen Zellen, denen wiederum die C-Quelle, auf der sie vor dem Waschen gewachsen waren, zugesetzt wurde [50]. Hierbei wurde das Problem von extrazellulär vorliegendem PEP und Prv umgangen, die Zellen jedoch vor der Messung sehr lange behandelt. Als Quenchingmittel wurde Perchlorsäure eingesetzt, wie auch schon in früheren Arbeiten [174] und für *Saccharomyces cerevisiae* [153]. Zellaufschluss mittels Perchlorsäure wurde auch bereits nach Quenching in Methanol bei *E. coli* eingesetzt. Für den stationären Zustand einer kontinuierlichen Kultur ergab sich dabei 1.2 mM [146]. In gehungerten Zellen nach Glucose-Puls wurde mittels einer Extraktionsmethode mit kochendem Wasser und HPLC-Analytik PEP zwischen 0.35 mM (vor dem Puls) und 0.03 mM (nach dem Puls) bestimmt [12].

Der Aufschluss mit kochendem Wasser wurde bereits für *Streptococcus lactis* beschrieben [154]. Lowry et al. stoppten den Zellmetabolismus nach Filtration auf Trockeneis und schlossen die Zellen mit Perchlorsäure und EDTA auf. Sie maßen für Zellen aus der exponentiellen Phase, die auf Glucose gewachsen waren, etwa 0.1 mM, für Wachstum auf diversen anderen C- und N-Quellen zwischen 0.1 mM und 1 mM und für Acetat-gewachsene Zellen 0.2 mM [93, 55]. Quenching in flüssigem Stickstoff und anschließendes Kochen in TRIS/EDTA ergab für den stationären Zustand einer kontinuierlichen glucoselimitierten Fermentation eine PEP-Konzentration von 2.2 mM [139].

Für intrazelluläres Pyruvat wurden mit den oben aufgeführten Methoden folgende Werte gemessen: 0.4 bis 1.2 mM [50], 0.4 mM sowohl für Glucose-, als auch Acetat-gewachsene Zellen [93, 55] und 2.8 mM für den stationären Zustand der kontinuierlichen Fermentation [139], bzw. 6.5 mM [146].

**Weitere veröffentlichte Methoden.** Quenching mit 60%-igem Methanol (-45°C, bzw. -40°C) und Zellaufschluss mit Chloroform wurde für *Aspergillus niger* [134] und Hefe [65] angewendet. Für Hefe wurde auch gezeigt, dass Waschen mit einem Methanol-Wasser-Gemisch (50/50, v/v, -40°C) nicht zur Verfälschung der Bestimmung intrazellulärer Metabolite führt [135]. Für *Escherichia coli* wurde auch der Zellaufschluss mit TCA schon früh beschreiben [168, 95], ebenso wie der Aufschluss mit TRIS/EDTA, Ethanol, Butanol, Schwefelsäure, Ameisensäure [95] und mit Methanol.

**Methodenentwicklung.** Für die Methodenentwicklung wurden, wenn nicht anders beschrieben, jeweils Standards (0.15 mM PEP und 0.15 mM Pyruvat) und wie Probe behandelte Standards verwendet. Hierzu wurde dasselbe Volumen an Standard, wie in der jeweiligen Methode an Probe genommen wurde, genauso behandelt wie Probe und am Ende der Aufreinigung und Messung die Wiederfindung bestimmt. Außerdem wurden Proben aus einer stationären kontinuierlichen Kultur ( $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ ) von *Escherichia coli* LJ210 und mit Standard aufgestockte stationäre Proben vermessen. Hierzu wurde direkt nach der Probenahme aus dem Fermenter ebenfalls eine definierte Menge an Standard dazugegeben (aufgestockt). Durch Messung und Vergleich mit einer nicht aufgestockten Probe, wurde auch hier die Wiederfindung des Standards bestimmt. Die im Folgenden beschriebenen Methoden sind im Anhang B (ab Seite 128) dargestellt.

Für den *Formiat-Aufschluss* (Methode 4, Abb. B.4) wurden die Zellen durch Filtrieren (Millipore Durapore Membranfilter, Porengröße  $0.2 \mu\text{M}$ ) vom Medium abgetrennt. Mit 2 ml Saline wurde nachgespült. Und die Zellen wurden dann in kochender Ameisensäure aufgeschlossen. Der Vorgang der Probenahme dauerte bis hierher etwa 20 Sekunden. Nach Neutralisation, Zentrifugation und Gefriertrocknung (Gerät Lyovac GT2, danach lösen in 1.5 ml Aqua dest.) erfolgte die Messung [95]. Das Abstoppen des Zellmetabolismus sollte hier durch rasches Nachspülen des Filters mit eiskalter Saline erreicht werden. Dieses Verfahren ist kritisch zu bewerten, da es zum einen recht lange dauert, gemessen an den turn-over-Zeiten und zum anderen bei tiefen Temperaturen um den Gefrierpunkt noch Enzymaktivität vorhanden sein kann, wie in einer Studie (Kapitel 4.2.1.1) gezeigt werden konnte. Des Weiteren waren die Ergebnisse stark schwankend und schlecht reproduzierbar. Auch konnte ein Zersetzen speziell der phosphorylierten Metabolite (PEP, Glc6P, Fru6P) von etwa 50% gezeigt werden. Aus diesen Gründen wurde diese Methode nicht weiterverfolgt.

Bei der direkten Injektion in gekühlte, hochkonzentrierte *Perchlorsäure* (35%,  $-20^\circ\text{C}$ ) erfolgte das Abstoppen des Metabolismus durch Temperaturerniedrigung und gleichzeitige Denaturierung der Enzyme (Methode 9, Abb. B.9). Eine gute Durchmischung wurde durch sofortiges Schütteln gewährleistet. Die Mischtemperatur betrug etwa  $+5^\circ\text{C}$ . Der Zellaufschluss wurde durch drei Gefrier-Tau-Zyklen realisiert. Hierzu wurden die bei  $-20^\circ\text{C}$  gefrorenen Proben in ein Eisbad ( $+1^\circ\text{C}$ ) gestellt und durch ständiges Schütteln in etwa 20 Minuten aufgetaut. Daraufhin wurden die Proben wieder bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Danach wurde die Probe neutralisiert und vermessen. Nachteile bei dieser Methode sind, dass die Temperaturerniedrigung wegen des Mischungsverhältnisses Perchlorsäure/Probe nicht schnell genug erfolgt und relativ viele Bearbeitungsschritte zu einem hohen Fehler führen. Eine Änderung des Mischungsverhältnis wird durch das bei der Neutralisation anfallende Perchlorat verhindert. Standardmessungen haben gezeigt, dass etwa 80% des vorgelegten PEP zersetzt wurden, während Prv zu nahezu 100% wiedergefunden wurde. Vor allem aus diesem Grund wurde die Methode verworfen. Des weiteren störte das anfallende Perchlorat die enzymatische Bestimmung der Metabolite, was auch durch Zentrifugieren nicht vollständig verhindert werden konnte.

Weniger konzentrierte *Perchlorsäure* (7%) wurde in Verbindung mit drei Gefrier-Tau-Zyklen ebenfalls zum Zellaufschluss verwendet. Das Abstoppen des Metabolismus erfolgte hierbei durch Zugabe der Probe in ein auf Trockeneis ( $-70^\circ\text{C}$ ) stehendes Reagenzglas (Methode 5, Abb. B.5). Nach Auftauen bei  $0^\circ\text{C}$  (in 30 Minuten im Eisbad bei  $+1^\circ\text{C}$ , unterstützt durch Schütteln) wurde die Probe zehn Minuten zentrifugiert und danach wurden die Zellen mit der Perchlorsäure versetzt.

Metabolit	$c_{\text{Niederschlag}} [\mu\text{mol}/\text{gTS}]$	$c_{\text{Überstand}} [\mu\text{mol}/\text{gTS}]$
Prv	0.4	1.0
PEP	0.6	3.5
Glc6P	0.1	0.6

**Tabelle 4.1:** Verteilung verschiedener Metabolite zwischen Niederschlag und Überstand nach Quenching in gekühltem Methanol (-70°C) und Aufschluss mit Perchlorsäure (7%)

Auf diese Weise ist ein Abtrennen der Zellen vom Medium möglich. Allerdings war die Zeit für das Zentrifugieren zu lange, wie der Studie zur Enzymaktivität bei tiefen Temperaturen (Kapitel 4.2.1.1) zu entnehmen ist.

Nach Quenching der Zellen in ein auf Trockeneis stehendes Reagenzglas wurden die Zellen auch durch Kochen in *TRIS/EDTA* aufgeschlossen [95, 139]. Trotz der bereits beschriebenen Probleme für das Quenching wurden in der stationären Kultur Werte für Prv (0.6-1.6  $\mu\text{mol}/\text{gTS}$ , 2.0-4.4  $\pm$  0.5  $\mu\text{mol}/\text{gTS}$ ) und PEP (2.7-4.7  $\mu\text{mol}/\text{gTS}$ , 2.0-3.7  $\pm$  0.4  $\mu\text{mol}/\text{gTS}$ ) gemessen, die im Bereich der Literaturwerte liegen. Bei mit Standard aufgestockten Proben kam es jedoch zu einem Verlust des aufgestockten Standards. Ein Teil des PEP konnte dabei während des Kochens zu Prv dephosphoryliert werden.

Nach dem Quenching im Reagenzglas auf Trockeneis wurde auch der Zellaufschluss mit einem *Ethanol (75%) / HEPES (0.25 M, pH 7.5)-Gemisch* untersucht [45]. Die Ergebnisse waren kaum reproduzierbar und waren mit jeweils 0.4  $\pm$  0.2  $\mu\text{mol}/\text{gTS}$  für PEP und Prv sehr niedrig. Die Methode wurde für die Metabolite des zentralen Stoffwechsels verworfen, wurde aber für die cAMP-Analytik verwendet, da hier eine getrennte Bestimmung von intra- und extrazellulärer Konzentration erforderlich ist (Kapitel 4.2.1.5).

Derselbe Aufschluss mit *Perchlorsäure (7%)* wurde auch nach Quenching in gekühltem *Methanol (-70°C)* überprüft. Nach Zentrifugation (-20°C) wurden die Zellen mit Perchlorsäure und drei Gefrier-Tau-Zyklen (Methode 10, Abb. B.10) aufgeschlossen. Neben der aufwendigen Aufarbeitung stellt der in Methanol stattfindende Zellaufschluss ein wichtiges Problem dar. Nach dem Quenching befinden sich etwa 50 - 80% der Metabolite im Überstand (Tab. 4.1). Bei dieser Methode blieb dagegen der wie Probe behandelte Standard zu circa 95% erhalten. Die Metabolite blieben auch im gekühlten Methanol stabil (Methode 8, Abb. B.8). Eine direkte Messung im Methanol-Überstand war wegen einer erheblichen Störung (Trübung) der enzymatischen Reaktion durch das Methanol nicht möglich. Da im stationären Zustand der Zucker-limitierten kontinuierlichen Kultur weder

Zellen	Lebendzellzahl [%]
unbehandelt	95
Quenching mit Methanol (-70°C, 100%)	5
Quenching in Reagenzglas (-70°C)	90

**Tabelle 4.2:** Vergleich der Lebendzellzahlen von *Escherichia coli* LJ210 aus einer stationären kontinuierlichen Kultur nach verschiedenen Quenching-Methoden bei -70°C, ermittelt durch Färbung mit Acridin-Orange

PEP und Prv, noch Glc6P extrazellulär gefunden wurden, waren die hohen Metabolitkonzentrationen im Überstand nach Quenching dem Zellaufschluss oder Herausströmen aus der Zelle zuzuschreiben. Auch zur Messung der Gesamtkonzentration war die Methode wegen sehr schlechter Reproduzierbarkeit nicht geeignet.

Das Gleiche gilt für Kochen der Probe in einem *Ethanol (75%) / HEPES (0.25 M, pH 7.5)-Gemisch* nach erfolgtem Quenching in gekühltem *Methanol* (Methode 11, Abb. B.11). Die Reproduzierbarkeit ist sehr schlecht. Die Färbung mit dem Vitalitätsfarbstoff Acridin-Orange [67, 150] zeigte bei Zellen nach Methanol-Quenching etwa 95% tote Zellen im Gegensatz zu etwa 5% bei der unbehandelten Kontrolle (Tab. 4.2). Für das Quenching der Zellen in einem auf Trockeneis stehenden Reagenzglas wurden etwa 10% an toten Zellen festgestellt, so dass diese Art des Quenchings durchaus in Betracht gezogen werden kann.

Als geeignetste Methode erwies sich die direkte Injektion der Probe in kochendes *Ethanol (75%) / HEPES (0.25 M, pH 7.5)-Gemisch*, Inkubieren bei +90°C und Lyophilisieren (Methode 1, Abb. B.1). Hierbei wurden 5 ml des Ethanol-Puffer-Gemisches bei +95°C im Wasserbad für zwei Minuten vorinkubiert. Das Gemisch erreichte dabei eine Temperatur von etwa +80°C. Das Reagenzglas mit dem Gemisch wurde herausgenommen, schnell außen abgetrocknet und gewogen. Danach wurden etwa 2 ml Probe zugegeben und das exakte Volumen mittels Waage bestimmt. Das Gemisch wurde nun für vier Minuten im Wasserbad inkubiert. Danach erfolgte Abkühlen im Eisbad auf 0°C für 10 Minuten. Nach Zentrifugieren für 5 Minuten bei +1°C, wurde der Überstand abgenommen, lyophilisiert und in 1.5 ml Aqua dest. resuspendiert und die Probe gemessen. Dieses Verfahren beruhte auf einer von Gonzales et al. für Hefe angewandten Methode [45]. Der wie Probe behandelte Standard wurde bei Prv zu 95% und bei PEP zu 80% wiedergefunden, siehe auch Tab. 4.4. Die Wiederfindung bei mit Standard aufgestockten Proben betrug für Prv 80% und für PEP etwa 70%, das heisst ein Teil der Menge dieser Metabolite wurde während der Probenahme durch die Zellen oder Zellbestandteile umgesetzt, bzw. der Messung entzogen. Da bei dieser Metho-

de nur die Gesamtkonzentrationen der Metabolite bestimmt werden konnten, ist sie für Batch-Fermentationen und Schüttelkolben-Experimente ungeeignet (Kapitel 2.1.5). Sie kann aber für kontinuierliche Zucker-limitierte Fermentationen angewendet werden, da hier Prv und PEP extrazellulär nur in geringen Konzentrationen vorliegen und dies deshalb vernachlässigt werden kann (Kapitel 2.1.5). Bei der Probenahme kühlte das Gemisch für etwa 10 Sekunden bis auf 65°C, wurde aber dann über 80°C gehalten. Die gegenüber der Originalarbeit [45] leicht verringerte Ethanolkonzentration (58%, statt >66%) beeinflusste die Messergebnisse nicht. Für die kontinuierliche Kultur ergaben sich bei einer Verdünnungsrate von  $D = 0.1h^{-1}$  stationäre Konzentrationen von  $0.65 \pm 0.15 \mu\text{mol/gTS}$  für Prv und  $1.4 \pm 0.15 \mu\text{mol/gTS}$  für PEP, die im Bereich der aufgeführten Literaturwerte liegen. Die weiteren Ergebnisse werden in Kapitel 4 (ab Seite 84) dargestellt.

#### 4.2.1.3 Glucose 6-Phosphat (Glc6P), Fructose 6-Phosphat (Fru6P) und Fructose (Fru)

Zur Überprüfung des Modells für die Glykolyse sind Messungen von weiteren Glykolyse-Metaboliten unabdingbar [153]. Es wurden Glc6P, Fru6P und Fru ausgewählt. Die Analytik ist aber auch auf weitere Metabolite ausweitbar.

**Veröffentlichte intrazelluläre Glc6P- und Fru6P-Messungen für *Escherichia coli*.** Bhattacharya maß in gehungerten Zellen nach Glucose-Puls mittels einer Extraktionsmethode mit kochendem Wasser und HPLC-Analytik für Glc6P zwischen 0.35 mM (vor dem Puls) und 1.03 mM (nach dem Puls) [12]. Lowry et al. stoppten den Zellmetabolismus nach Filtration auf Trockeneis und schlossen die Zellen mit Perchlorsäure und EDTA auf. Sie maßen für Zellen aus der exponentiellen Phase, die auf Glucose gewachsen waren, etwa 0.8 mM und für Acetatgewachsene Zellen zwischen 0.2 mM und 0.5 mM [93, 55]. Moses und Sharp maßen für verschiedene C-Quellen zwischen 1.1 und 3.2 mM [111]. Quenching in flüssigem Stickstoff und anschließendes Kochen in TRIS/EDTA ergab für den stationären Zustand einer kontinuierlichen Fermentation eine Glc6P-Konzentration von 3.5 mM [139], bzw. 0.3 mM [146].

Für intrazelluläres Fru6P wurden mit den oben aufgeführten Methoden folgende Werte angegeben: 0.64 mM (vor dem Puls) und 0.91 mM (nach dem Puls) [12], 0.34 mM für Glucose-gewachsene Zellen und zwischen 0.1 mM und 0.7 mM für Wachstum auf diversen C-Quellen [93, 55], zwischen 0.02 und 1.3 mM für verschiedene C-Quellen [111] und 0.6 mM für eine stationäre kontinuierliche Kultur [139].

**Methodenentwicklung.** Die Methodenentwicklung wurde analog zu den PEP- und Prv-Methoden (Kapitel 4.2.1.2) durchgeführt, allerdings nicht in derselben Ausführlichkeit. Es ergaben sich nahezu dieselben Ergebnisse und Schlussfolgerungen, auf deren ausführliche Darstellung daher verzichtet wird. Einige interessante Punkte sollen aber erwähnt werden:

Extrazellulär liegt in der stationären kontinuierlichen Kultur, das heisst bei einer konstanten Verdünnungsrate von  $D = 0.1 h^{-1}$ , weder Glc6P, noch Fru6P vor. Die Wiederfindung des aufgestockten Standards in Proben, die direkt in kochendes EtOH/HEPES-Gemisch injiziert wurden (Methode 1, Abb. B.1), beträgt 85% für Glc6P und 90% für Fru6P, siehe auch Tabelle 4.4. Nach dem Aufschluss mit Ameisensäure (Methode 4, Abb. B.4) konnten für Glc6P intrazelluläre Konzentrationen von 1.2 - 2 mM und für Fru6P von 0.5 - 1.1 mM bestimmt werden. Für den EtOH/HEPES-, sowie den PCA-Aufschluss nach Probenahme im Reagenzglas auf Trockeneis (Methoden 11 und 5, Abb. B.11 und B.5) und den EtOH/HEPES-Aufschluss nach Quenching in Methanol (Methode 11, Abb. B.11) konnten weder Glc6P noch Fru6P nachgewiesen werden. Mit dem Aufschluss mittels TRIS/EDTA wurden für Glc6P Konzentrationen von etwa 2 mM gemessen, wobei der Nachweis des aufgestockten Standards zu 80% gelang. Die Fru6P-Messung (Probe und Aufstockung) war unsicher. Die Methode ist für Glc6P geeignet.

#### 4.2.1.4 Zusammenfassung der Methodenentwicklung für die Glykolyse-Metabolite

In Tabelle 4.3 sind alle untersuchten Methoden und die jeweiligen relevanten Fehlerquellen dargestellt. Für das Abstoppen des Zellmetabolismus erwiesen sich die Injektion in gekühltes Methanol (100%,  $-70^{\circ}\text{C}$ ) wegen der auftretenden Zellyse und der schlechten Reproduzierbarkeit und Filtrationsmethoden wegen des zu langsamen Quenchings als ungeeignet. Geeignet ist das Quenching in einem auf Trockeneis stehenden Reagenzglas. Wird diese Methode allerdings mittels Zentrifugieren bei  $0^{\circ}\text{C}$  zum Abtrennen der Biomasse verwendet, ist sie wegen der Enzymaktivität bei  $0^{\circ}\text{C}$  zweifelhaft. Weitere vorgeschlagene Verfahren zur Biomasseabtrennung wie Filtrieren oder direktes Zentrifugieren sind ebenfalls zu langsam. Das Methanol-Quenching entfällt wegen der erwähnten Zellyse. Aus diesen Gründen wurde Methode 1 (Direkte Injektion in kochendes EtOH/HEPES, Abb. B.1) trotz des erwähnten Nachteils, dass keine Trennung in intra- und extrazelluläre Konzentration möglich ist, verwendet. Die Wiederfindung der verschiedenen Metabolite (Standards), auch in aufgestockten stationären Proben, ist in Tab. 4.4 zusammengefasst. Eine Wiederfindung von 100% hieße, dass die gesamte eingesetzte Standardmenge am Ende der Behandlung nachgewiesen werden kann.

Methoden	Fehlerquellen
(4) Filtrieren, Kochen in Ameisensäure	Zu langsames Quenching, schlechte Reproduzierbarkeit, Denaturierung von PEP, G6P, F6P
(9) Injektion in 35%-PCA ( $-20^{\circ}\text{C}$ )	Zu langsames Quenching, viele Bearbeitungsschritte, Denaturierung von PEP
(5) Gekühltes Rggl. ( $-70^{\circ}\text{C}$ ), Aufschluss mit PCA	Enzymaktivität bei $0^{\circ}\text{C}$ , viele Bearbeitungsschritte
(3) Gekühltes Rggl. ( $-70^{\circ}\text{C}$ ), Aufschluss durch Kochen mit TRIS/EDTA	Enzymaktivität bei $0^{\circ}\text{C}$ , Verlust des aufgestockten Standards
(2) Gekühltes Rggl. ( $-70^{\circ}\text{C}$ ), Aufschluss mit kochendem EtOH/HEPES	Enzymaktivität bei $0^{\circ}\text{C}$
(10) Gekühltes Methanol ( $-70^{\circ}\text{C}$ ), Aufschluss mit PCA	Zellaufschluß, viele Bearbeitungsschritte, schlechte Reproduzierbarkeit
(11) Gekühltes Methanol ( $-70^{\circ}\text{C}$ ), Aufschluss mit kochendem EtOH/HEPES	Zellaufschluß, schlechte Reproduzierbarkeit
(1) Injektion in kochendes EtOH/HEPES	Extrazellulär vorliegende Metabolite (Gesamtmessung)

**Tabelle 4.3:** Methoden zur Analytik intrazellulärer Metabolite mit relevanten Fehlerquellen, wie im Text erläutert. Die Nummerierung entspricht der Reihenfolge im Anhang B.

Metabolit	Wiederfindung Standard [%]	Wiederfindung Aufstockung [%]
Glc	85	85
Scr	83	
G6P	89	85
F6P	93	90
Fru	82	
PEP	80	70
Prv	95	80

**Tabelle 4.4:** Wiederfindung von Standards verschiedener Metabolite und auf stationäre Proben aufgestocktem Standard nach vierminütigem Kochen in Ethanol/HEPES (Methode 1, Abb. B.1)

Bei einer Wiederfindung von 90% gehen also 10% verloren. Die Wiederfindung ist ausreichend hoch.

#### 4.2.1.5 Zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP)

Zur Bestimmung des wichtigen Alormons oder sekundären Signalstoffs (second messenger) cAMP wurden mehrere Verfahren zum Abstoppen des Zellstoffwechsels und zur Trennung der Zellen vom umgebenden Medium getestet. Diese Schritte der Probenahme sind auch für cAMP kritisch. Es ist nicht bekannt, wie die Regulation des intrazellulären cAMP-Spiegels durchgeführt wird. Deswegen wurde auch hier versucht, ein möglichst schnelles Abstoppen des Metabolismus zu realisieren. Da bis zu 95% des cAMP extrazellulär vorliegt [30, 102], muss eine sorgfältige Trennung der Zellen vom Medium erfolgen, um die für die Regulationsvorgänge entscheidende Konzentration an intrazellulärem cAMP exakt bestimmen zu können. Auch für den Aufschluss der Zellen sowie die Aufarbeitung der Proben wurden mehrere Verfahren getestet.

**Veröffentlichte Methoden.** Epstein et al. gewinnen Überstände durch Filtration oder durch Abkühlen der Kultur und Zentrifugation. Der intrazelluläre Gehalt an cAMP wird nach Filtration mit Filtern der Porengröße 0.65  $\mu\text{m}$  und Extraktion durch Kochen in 0.2 N Schwefelsäure bestimmt [30]. Die von der Gruppe Ferenci publizierten Ergebnisse mit cAMP-Messungen [116, 117] entstanden aufgrund von direkter Filtration aus der Chemostat-Kultur. Der Filter mit den Zellen wird sofort in eisgekühltes Ethanol (60%) überführt und das Ethanol vor der Messung

abgezogen. Überständewerte wurden direkt aus dem Filtrat bestimmt [117]. Takahashi et al. und Inada et al. bestimmen die extrazelluläre Konzentration aus Überständen, die sie nach zweiminütigem Zentrifugieren gewinnen [152, 57]. Hogema et al. haben mehrere Methoden für das Quenching verglichen: Zentrifugieren, Filtrieren und Quenching in kaltem Methanol. Als zuverlässigste Methode erwies sich Filtrieren durch Glassfaserfiltern und Kochen in Ameisensäure [52, 51].

**Veröffentlichte cAMP-Messungen.** Für intrazelluläre Messungen aus der exponentiellen Phase einer Schüttelkolbenkultur werden Werte zwischen  $0.7 - 5 \mu\text{M}$  [51],  $0.3 - 2.5 \mu\text{M}$  [30] und  $15 \mu\text{M}$  [116] angegeben. Für extrazelluläre Werte wurde ebenfalls aus der exponentiellen Phase eines Schüttelkolbenversuchs  $220 \mu\text{M}$  gemessen [116]. Die cAMP-Exkretion ist mit der intrazellulären Konzentration korreliert [30].

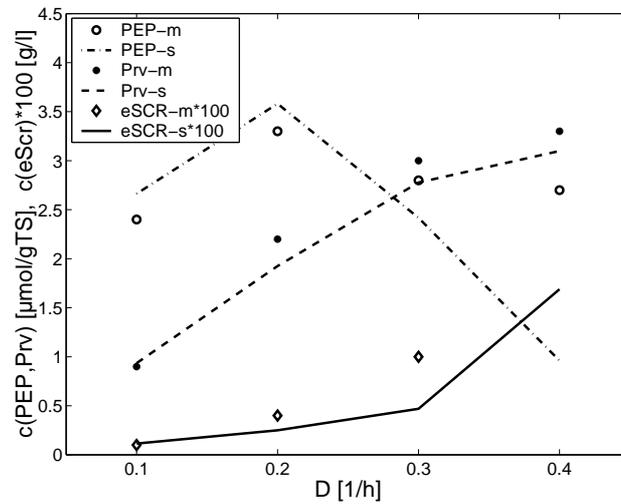
**Überprüfung verschiedener Methoden.** Gemessen wurde in einer Sucrose-limitierten stationären Chemostat-Kultur mit der Verdünnungsrate  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ . Methode 3 (TRIS/EDTA, Abb. B.3) [139] erlaubt nur eine Bestimmung der Gesamtkonzentration und scheidet aus diesem Grund aus. Der gemessene Wert für die stationäre Chemostat-Kultur beträgt  $150 \mu\text{M}$ . Methode 4 (Formiat-Methode, Abb. B.4) [52] lieferte für die intrazelluläre Konzentration der stationär wachsenden Kultur:  $12 \pm 5 \mu\text{M}$ . Aufgrund des relativ hohen Werts und vor allem der großen Streuung wurde diese Methode nicht weiterverfolgt. Methode 2 (Trockeneisbad, Ethanol/HEPES, Abb. B.2) basiert auf der Aufschlussmethode von Gonzales [45], ergänzt um eine neue Quenching-Methode. Die Probe wird in ein auf Trockeneis stehendes Reagenzglas injiziert und gefriert innerhalb von etwa 20 Sekunden. Nach Auftauen im Eisbad (Dauer etwa 20 Minuten, unterstützt durch ständiges Schütteln) wird die Probe bei  $+1^\circ\text{C}$  zentrifugiert und der erhaltene Niederschlag durch Zugabe von 5 ml kochendem Ethanol/HEPES-Gemisch (s. Methode 1) aufgeschlossen. Nach vierminütigem Inkubieren und Abkühlen im Eisbad (10 Minuten), wird der Überstand durch Zentrifugieren gewonnen und vermessen. Es tritt bei dieser Methode keine Zellyse auf [161]. Ein kritischer Punkt war die vollständige Abtrennung der extrazellulären Flüssigkeit (Auswischen mit einem Tuch) nach dem Zentrifugieren. Die Wiederfindung des eingesetzten Standards betrug 90% - 100%. Für die intrazelluläre cAMP-Konzentration der Chemostat-Kultur von *E. coli* LJ210 ergab sich  $4.0 \pm 0.8 \text{ nmol/gTS}$  ( $1.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ). Für die extrazelluläre cAMP-Konzentration unter diesen Bedingungen ergab sich  $286 \pm 59 \text{ nmol/gTS}$  ( $120 \pm 25 \mu\text{M}$ ). Beide Werte lagen im Bereich der oben aufgeführten Literaturwerte. Die intrazelluläre Konzentration erhöhte sich bei Zugabe extrazellulären Standards, was darauf hindeutete, dass ca. 0.2% des Mediums beim

Trocknen nicht entfernt wird, was bei diesen Konzentrationsverhältnis kaum ins Gewicht fällt. In einer exponentiell auf Sucrose wachsenden Schüttelkolbenkultur von *E. coli* LJ210 wurde ein geringerer Wert gemessen (1.7 nmol/gTS) [161], was aber damit übereinstimmte, dass bei höheren Wachstumsraten ein geringerer cAMP-Gehalt erwartet wird [122]. Aufgrund der guten Ergebnisse mit Standards wurde Methode 2 (Abb. B.2) für die cAMP-Messungen in dieser Arbeit verwendet.

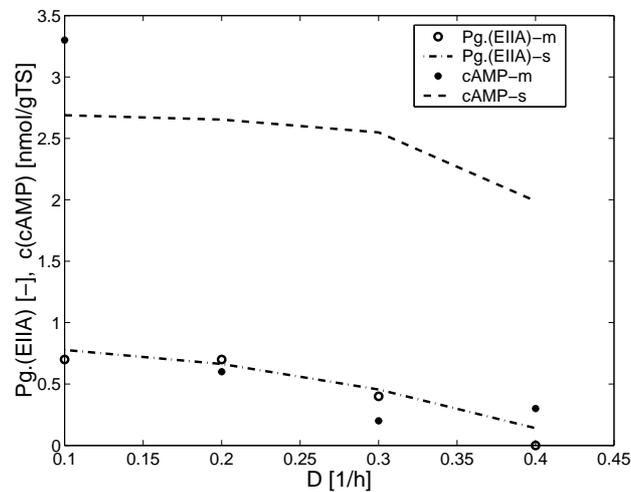
### 4.3 Stationäre kontinuierliche Kultur

Für die stationäre kontinuierliche Kultur von *Escherichia coli* LJ210 wurden die Konzentrationen von Scr, PEP und Prv, sowie der Phosphorylierungsgrad des EIIA<sup>Crr</sup> und die Konzentration von cAMP bestimmt. Stationär meint hier im biverfahrenstechnischen Sinn eine Fermentationskultur, die bei einer definierten Wachstumsrate konstant wächst und nicht wie im biologischen Sinne eine “nicht-wachsende” Kultur. Die gemessenen Werte sind die für die Validierung des PTS-Modells wichtigen Eingangs- und Ausgangsgrößen. Der Fermentationsprozess wurde dabei mit den Verdünnungsraten  $D = 0.1 - 0.4 h^{-1}$  betrieben. Dies entspricht Generationszeiten von 415 und 104 Minuten. Nach der Änderung der Verdünnungsrate wurde das Erreichen des neuen stationären Zustands durch Verfolgung der Abluftkonzentrationen von Sauerstoff und Kohlendioxid, sowie der Biomassekonzentration kontrolliert. Die gemessenen Werte wurden mit den durch das Modell errechneten Werten in Abb. 4.5 und Abb. 4.6 dargestellt.

Die stationäre (konstante) intrazelluläre Konzentration von PEP nimmt mit steigender Verdünnungsrate  $D$  zu, erreicht bei  $D = 0.2 h^{-1}$  (Generationszeit 108 Minuten) ihren Maximalwert und fällt danach wieder leicht ab, wohingegen die Pyruvatkonzentrationen bei steigender Verdünnungsrate stetig zunimmt, bis bei der maximalen untersuchten Verdünnungsrate von  $D = 0.4 h^{-1}$  (Generationszeit 415 Minuten) eine intrazelluläre Konzentration von  $[Prv] = 3.3 [\mu mol/gTS]$  erreicht wird (Abb. 4.5). Dies erscheint durch einen deutlich größeren Fluss vom PEP wegen der erhöhten PTS-Transportrate plausibel. Beide Verläufe werden vom Modell ausreichend gut beschrieben, was darauf hinweist, dass Veränderungen der Enzymkonzentrationen tatsächlich kaum eine Rolle spielen, wie in Kap. 3.3 diskutiert. Bei sehr hohen Verdünnungsraten ( $D = 0.4 h^{-1}$ , Generationszeit 415 Minuten) kommt es allerdings zu größeren Abweichungen, speziell bei der PEP-Konzentration, wobei hier doch Verschiebungen im metabolischen Netzwerk durch veränderte Genexpression eine Rolle spielen können. Die extrazelluläre Sucrosekonzentration steigt ebenfalls mit steigender Verdünnungsrate



**Abbildung 4.5:** Stationäre Konzentrationen der PTS-Eingangsgrößen Scr (aus Darstellungsgründen mit Faktor 100 multipliziert), PEP und Prv bei verschiedenen Verdünnungsraten in der kontinuierlichen Prozessführung. Punkte markieren Messungen und Linien Simulationsergebnisse.



**Abbildung 4.6:** Stationäre Konzentrationen der Ausgangsgrößen Phosphorylierungsgrad von  $EIIA^{Crr}$  und intrazelluläres cAMP bei verschiedenen Verdünnungsraten in der kontinuierlichen Prozessführung. Punkte markieren Messungen und Linien Simulationsergebnisse.

an, was auch durch das Modell wiedergegeben wird (Abb. 4.5). Der Anstieg wird vom Modell weniger steil berechnet, als im Experiment gemessen, wobei diese Messungen allerdings wegen Problemen in der Prozessführung stark fehlerbelastet sind (Kap. 2.1.5).

Das PTS-Ausgangssignal Phosphorylierungsgrad des EIIA<sup>Crr</sup> nimmt mit steigender Verdünnungsrate und damit niedrigerem PEP:Prv-Verhältnis und erhöhter Sucrosekonzentration wie erwartet ab (Abb. 4.6). Durch den erhöhten Transport werden dem PTS vermehrt Phosphorylgruppen entzogen und ein niedrigerer stationärer Phosphorylierungsgrad stellt sich ein. Gegenüber einem Phosphorylierungsgrad von etwa 70% bei  $D = 0.1 h^{-1}$  und  $D = 0.2 h^{-1}$ , erhält man für  $D = 0.3 h^{-1}$  etwa 40% und für  $D = 0.4 h^{-1}$  praktisch 0%. Bei dieser hohen Transportrate sind dem System an dieser Stelle alle Phosphorylgruppen entzogen.

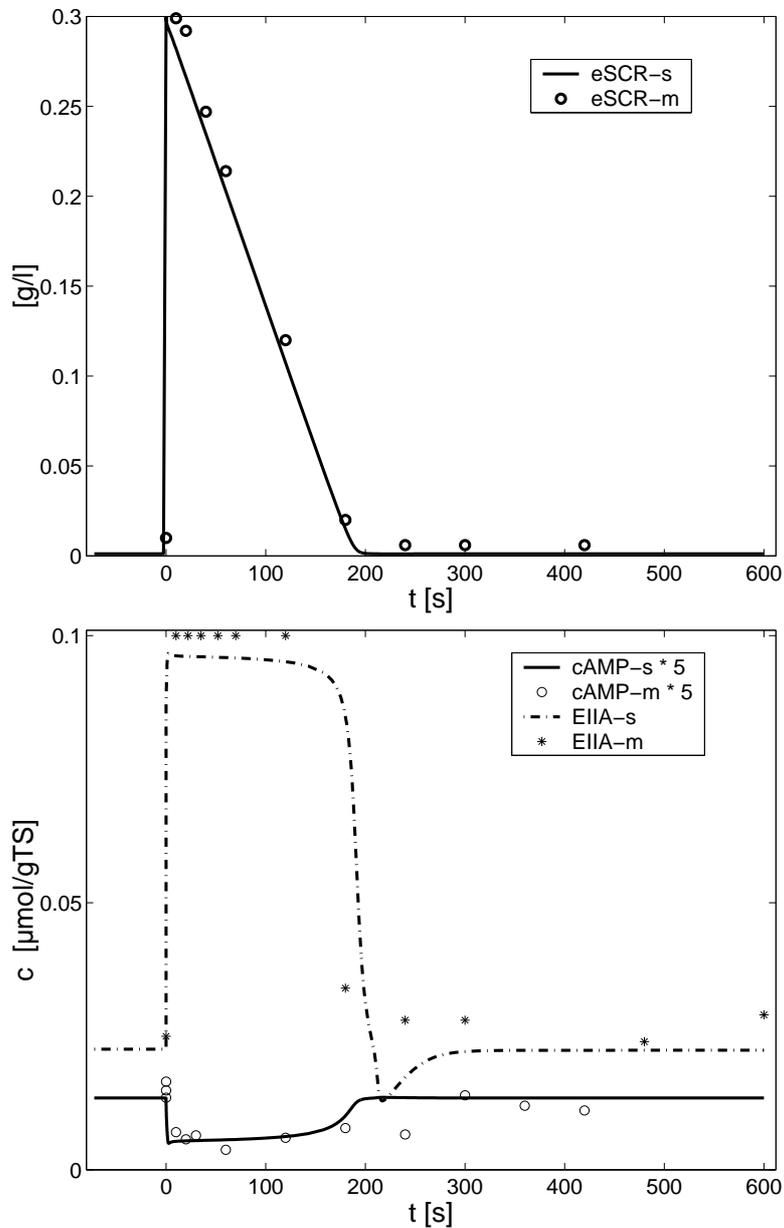
Die intrazelluläre Konzentration des second messenger cAMP nimmt mit steigender Verdünnungsrate und damit besserer Substratversorgung der Zelle ab, wobei simulierter und gemessener Verlauf nicht übereinstimmen. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die EIIA<sup>Crr</sup>-Phosphorylierung nicht das einzige regulatorisch wirkende Signal für die Adenylatzyklase ist, wie bereits vermutet [53, 125, 152].

## 4.4 Pulsexperiment

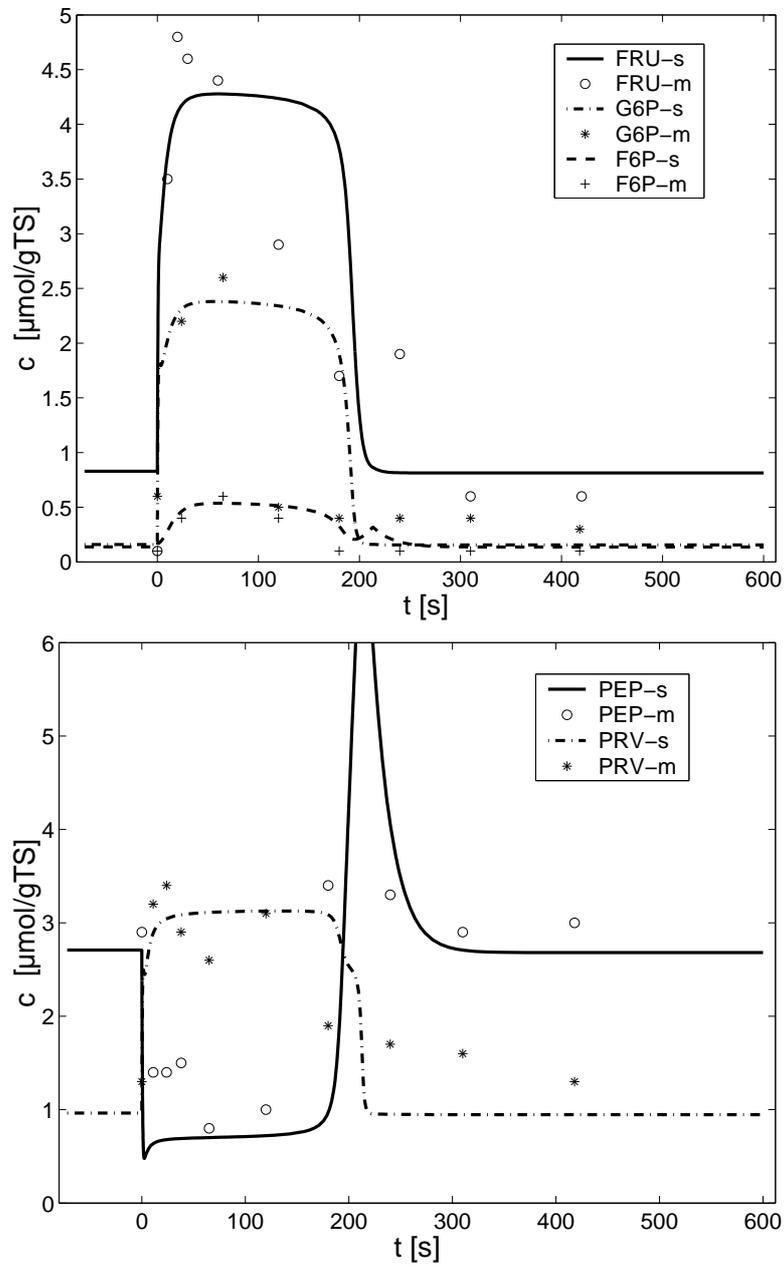
Die stationäre kontinuierliche, auf Sucrose wachsende Kultur ( $D = 0.1 h^{-1}$ ) von *E. coli* LJ210 wurde durch pulsformige Erhöhung der extrazellulären Sucrosekonzentration ( $eScr$ ) aus dem stationären Zustand ausgelenkt und die Reaktion des Systems durch Messung wichtiger Zustandsgrößen (Metabolitkonzentrationen) verfolgt. Die Kultur befand sich bei einer stationären Sucrosekonzentration von etwa  $1 mg/l = 3 \mu M$  im induzierten Zustand. Die Anregung wurde durch Zugabe einer definierten Menge konzentrierter Sucrose-Lösung bis zu einer Endkonzentration von  $0.3 g/l$  erreicht. Da die Art der Anregung dem in der Regelungstechnik gebräuchlichen Verfahren der Charakterisierung des Übertragungsverhaltens eines Systems durch Anregung mit dem Testsignal Impuls ähnlich ist, wird hier ebenfalls der Begriff Pulsexperiment verwendet.

In Abb. 4.7 und 4.8 sind die gemessenen und simulierten Zeitverläufe dargestellt.

In Abb. 4.7 oben erkennt man die sprunghafte Erhöhung der Sucrose-Konzentration, welche im Verlauf von etwa 200 s wieder verbraucht wird. Es stellte sich dann derselbe stationäre Wert von  $[eScr] = 1.2 mg/l = 3.3 \mu M$  wieder ein wie



**Abbildung 4.7:** Dynamische Antwort des PTS und des intrazellulären cAMP (mit Faktor 5 multipliziert) auf eine Störung des stationären Zustands einer kontinuierlichen Kultur ( $D = 0.1 h^{-1}$ ) von *E. coli* LJ210 durch Sucrose-Puls. Die extrazelluläre Sucrosekonzentration wurde dabei zum Zeitpunkt  $t = 0 s$  von  $1 mg/l$  auf eine Endkonzentration von  $[eScr] = 300 mg/l$  erhöht. Punkte markieren Messungen und Linien Simulationsergebnisse.



**Abbildung 4.8:** Dynamische Antwort der Glykolyse auf eine Störung des stationären Zustands einer kontinuierlichen Kultur ( $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ ) von *E. coli* LJ210 durch Sucrose-Puls. Die extrazelluläre Sucrosekonzentration wurde dabei zum Zeitpunkt  $t = 0 \text{ s}$  von  $1 \text{ mg/l}$  auf eine Endkonzentration von  $[eScr] = 300 \text{ mg/l}$  erhöht. Punkte markieren Messungen und Linien Simulationsergebnisse.

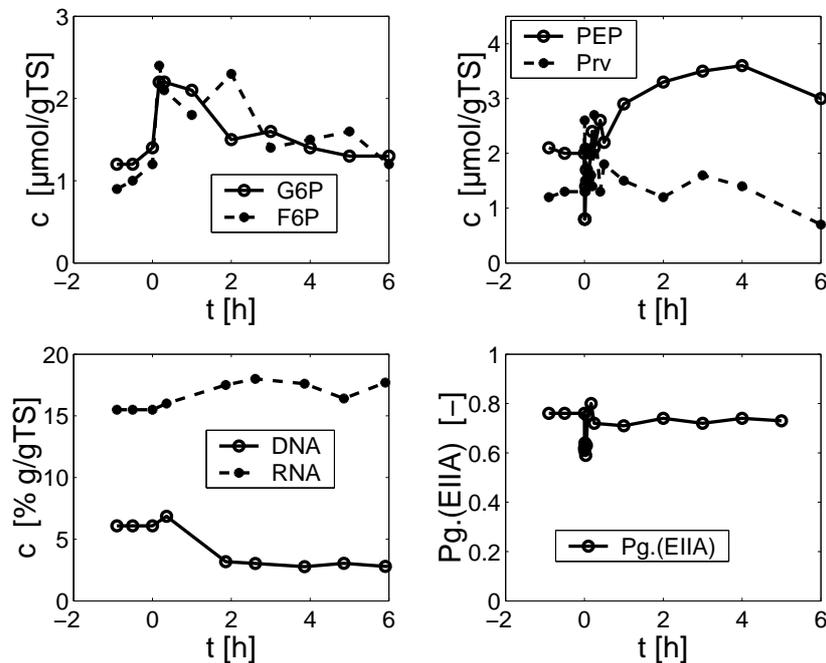
vor der Störung. Innerhalb dieses relativ kurzen Zeitintervalls können regulatorische Effekte auf Ebene der Genexpression vernachlässigt werden. Der Puls konnte in allen gemessenen und simulierten Zustandsgrößen verfolgt werden. So ist dies in Abb. 4.8 oben für die in der Glykolyse früh auftretenden intrazellulären Metabolite Glc6P, Fru und Fru6P gut zu erkennen. Glc6P und Fru6P wurden jeweils aus ihrem stationären Zustand ausgelenkt, erreichten für die Zeit der Zuckersättigung ein neues stationäres Niveau und kehrten dann nach dem Verbrauch der Sucrose wieder in den früheren stationären Zustand zurück. Für die intrazelluläre Fructose Fru wurde ein ähnlicher Verlauf simuliert. Die streuenden Messwerte könnten allerdings auch durch andere Verläufe beschrieben werden. In Abb. 4.8 unten ist eine gute Übereinstimmung von Experiment und Simulation für Prv zu erkennen. Der Phosphoryl-Donor PEP wurde durch den erhöhten Abfluss durch den deutlich erhöhten Transport stark vermindert und nimmt für diese Zeit einen stationären Wert von  $[PEP] \approx 1 \mu\text{mol}/gTS$  ein, der aber noch deutlich über Null liegt. Das in der Simulation zu erkennende Überschwingen bei der Rückkehr in den stationären Zustand konnte so im Experiment noch nicht nachgewiesen werden und könnte auch auf einen strukturellen Fehler im Modell, zum Beispiel in der Beschreibung der Abflüsse in die Biosynthese, hindeuten.

In Abb. 4.7 unten ist die Konzentration des PTS-Proteins  $EIIA^{Crr}$  in nichtphosphorylierter Form dargestellt. Diese wurde bestimmt aus dem gemessenen Phosphorylierungsgrad des Proteins und dem in der Literatur vorhandenen Messwert für die Gesamtkonzentration von  $[EIIA^{Crr}]_t = 0.1 \mu\text{mol}/gTS$  [132].  $EIIA^{Crr}$  befand sich während der erhöhten Sucrosekonzentration komplett im dephosphorylierten Zustand. Dies ermöglicht einen erhöhten Induktorausschluss über  $EIIA^{Crr}$  und führt zu einer verringerten cAMP-Produktion durch die Adenylatzyklase CyaA. Die intrazelluläre Konzentration an cAMP nahm sprunghaft ab und stieg nach Ende der Pulsphase wieder auf den früheren stationären Zustand.

Die simulierten Trajektorien beschreiben die gemessenen Zeitverläufe gut. Aufgrund der zahlreichen Messungen konnten etwa 12 Parameter des Modells identifiziert werden, die in Anhang A enthalten sind.

## 4.5 Sprungexperimente

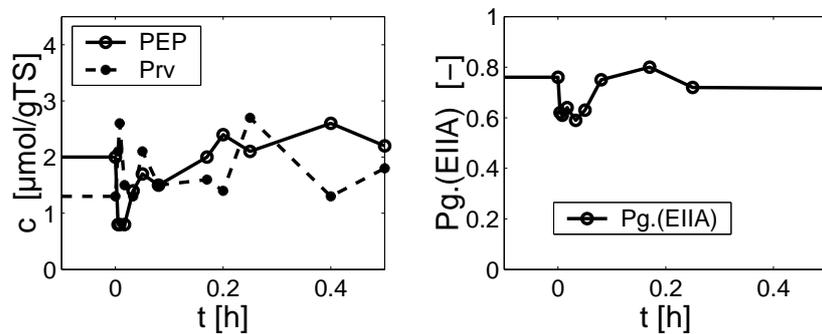
Während der kontinuierlichen Prozessführung mit der Verdünnungsrate  $D = 0.1 h^{-1}$  (Generationszeit 415 Minuten, stationäre Sucrosekonzentration  $1 mg/l$ ) wurde die sich im stationären Zustand befindliche Kultur durch sprunghafte Erhöhung der



**Abbildung 4.9:** Sprunghafte Erhöhung der Verdünnungsrate von  $D = 0.1 h^{-1}$  (Generationszeit 415 Minuten, stationäre Sucrosekonzentration  $1 mg/l$ ) auf  $D = 0.2 h^{-1}$  (Generationszeit 208 Minuten, stationäre Sucrosekonzentration  $3 mg/l$ ) zum Zeitpunkt  $t = 0 h$ . Verlauf der intrazellulären Metabolite Glc6P, Fru6P, PEP und Prv, sowie der Makromoleküle DNA und RNA und des Phosphorylierungsgrads von EIIA<sup>Crr</sup> im Zeitfenster bis 6 h.

Verdünnungsrate auf  $D = 0.2 h^{-1}$  (Generationszeit 208 Minuten, stationäre Sucrosekonzentration  $3 mg/l$ ) zum Zeitpunkt  $t = 0 h$  gestört. Die Art der Anregung ist dem in der Regelungstechnik gebräuchlichen Verfahren der Charakterisierung des Übertragungsverhaltens eines Systems durch Anregung mit dem Testsignal Sprung ähnlich und wird hier, wie in der Bioverfahrenstechnik üblich, als D-Sprung bezeichnet. Bis zur Einstellung eines neuen stationären Zustands wurden die Zeitverläufe wichtiger Metabolite und Makromoleküle gemessen und in Abb. 4.9 im Zeitfenster bis 6 h und Abb. 4.10 im Zeitfenster bis 0.5 h dargestellt.

Am Verlauf der intrazellulären Metabolite ist zu erkennen, dass vor Erreichen eines neuen (veränderten) stationären Zustands eine Übergangsphase von etwa 2 bis 4 Stunden durchlaufen wurde. Dies gilt auch für die DNA- und RNA-Konzentrationen. Der neue stationäre Zustand war also durch eine veränderte Makromolekülzusammensetzung der Zelle gekennzeichnet. Allerdings bleibt in zukünftigen Experimenten zu klären, welchen Einfluss eine eventuelle Änderung der Zellgröße hat.



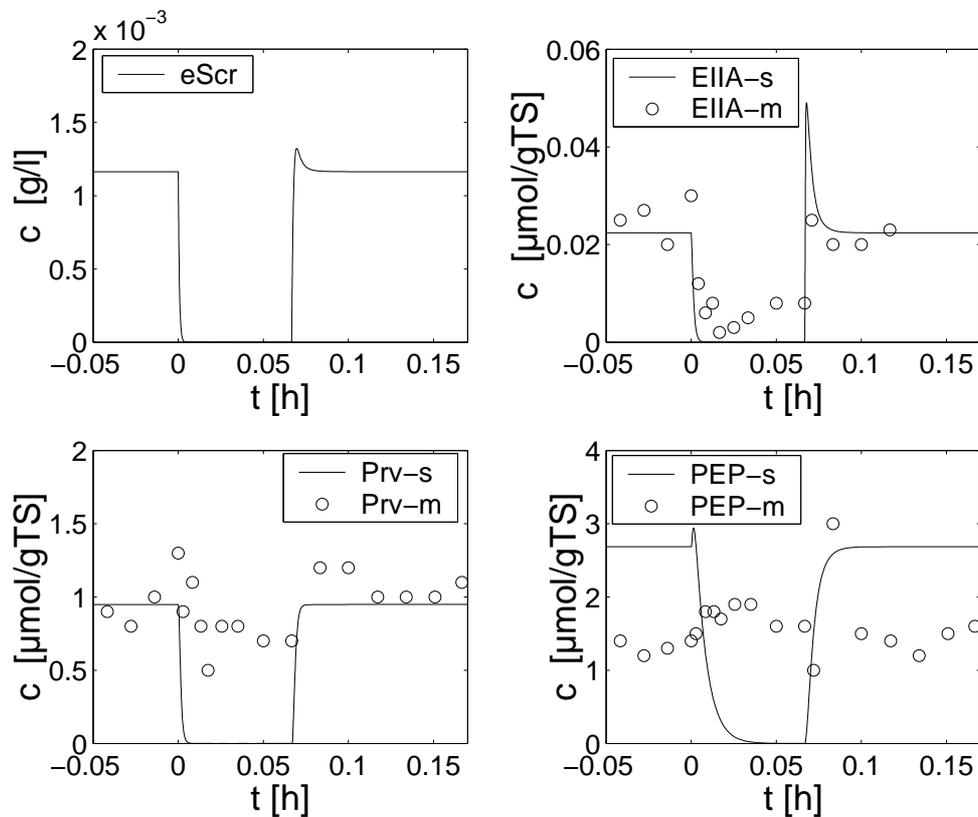
**Abbildung 4.10:** Sprunghafte Erhöhung der Verdünnungsrate von  $D = 0.1 h^{-1}$  (Generationszeit 415 Minuten, stationäre Sucrosekonzentration  $1 mg/l$ ) auf  $D = 0.2 h^{-1}$  (Generationszeit 208 Minuten, stationäre Sucrosekonzentration  $3 mg/l$ ) zum Zeitpunkt  $t = 0 h$ . Verlauf der intrazellulären Metabolite PEP und Prv, sowie des Phosphorylierungsgrads von  $EIIA^{Crr}$  im Zeitfenster bis 0.5 h.

Die Neusynthese der Makromoleküle ist im mathematischen Modell bis jetzt nicht vorgesehen. Für die stationären Zustände der modellierten Metabolite stimmten die Simulations- und experimentelle Ergebnisse aber überein (Abb. 4.5), ebenso wie für den qualitativen Verlauf der Phosphorylierungsgrads des  $EIIA^{Crr}$  (Daten nicht gezeigt). Der Phosphorylierungsgrad war für einen Zeitraum von etwa  $0.1 h$  um etwa 20% verringert und kehrte danach praktisch wieder auf den Wert bei  $D = 0.1 h^{-1}$  zurück. Für den nicht gezeigten Sprung von  $D = 0.1 h^{-1}$  auf  $D = 0.4 h^{-1}$  sprang der Phosphorylierungsgrad bereits vor dem ersten Messwert (15 s) auf Null und veränderte sich dann nicht mehr. Durch den stark erhöhten Transport wurde der Phosphoryl-Pool des PTS komplett entleert. Dies war bei  $D = 0.2 h^{-1}$  nicht zu beobachten.

Insgesamt war die schnelle Dynamik der Phosphoryl-Entleerung des PTS beim D-Sprung vergleichbar mit dem Puls-Experiment (Kap. 4.4) und die langsame Dynamik der Genexpression mit dem verwendeten Modell nicht zu beschreiben. Dies kann in zukünftigen Arbeiten in einem Gesamtzellmodell mit detaillierterer Beschreibung der Biosynthese erfolgen.

## 4.6 Fütterungsstop-Experimente

Beim Fütterungsstop-Experiment wurde ebenfalls ausgehend von der stationären Kultur bei  $D = 0.1 h^{-1}$  der Zulauf abgestellt und nach 4 Minuten (0.067 Stun-



**Abbildung 4.11:** Fütterungsstop-Experiment. Ausgehend von der stationären Kultur bei  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  wird bei  $t = 0 \text{ h}$  der Zulauf abgestellt und nach 4 Minuten ( $t = 0.067 \text{ h}$ ) wieder angestellt. Dargestellt sind gemessene (Punkte) und berechnete (Linien) Verläufe der externen Sucrosekonzentration eScr, sowie des Phosphorylierungsgrads von  $\text{EIIA}^{Crr}$ .

den) wieder angestellt. Der Sauerstoffpartialdruck in der Lösung,  $p_{O_2}$ , nahm dabei sprunghaft zu und fiel nach Einschalten des Feedings wieder auf den stationären Wert der kontinuierlichen Kultur (Daten nicht gezeigt). Dieser Versuch kann daher auch als “Inverser Puls” bezeichnet werden, im Gegensatz zum beschriebenen Sucrose-Puls-Experiment (Kap. 4.4), der ein spiegelbildliches  $p_{O_2}$ -Signal lieferte.

Die gemessenen und berechneten Zeitverläufe der externen Sucrose-Konzentration eScr, sowie des Phosphorylierungsgrades von  $\text{EIIA}^{Crr}$  sind in Abb. 4.11 gezeigt. Die Sucrosekonzentration war mit den verwendeten analytischen Methoden im mg-Bereich nicht zu bestimmen. Der berechnete Verlauf zeigte eine rasche Abnahme der Sucrose praktisch bis auf Null und nach Wiedereinschalten des Feedings eine ebenso rasche Rückkehr auf den stationären Wert. Das PTS-Protein

EIIA<sup>Crr</sup> lag, während keine Nährlösung zugeführt wird, komplett phosphoryliert vor, da die Phosphorylgruppen nicht mehr zum Transport benötigt werden und damit rückstauten. Dies konnte im Experiment gezeigt werden, das auch gut vom mathematischen Modell beschrieben wird (Abb. 4.11 rechts oben). Auch der phosphorylierte Metabolit PEP lag während des Inversen Pulses in einer konstanten, eventuell leicht erhöhten Konzentration vor und kehrte nach bei erneutem Feeding wieder auf den stationären Wert zurück. Der in diesem Experiment bestimmte stationäre Wert lag mit  $1.8 \mu\text{mol}/gTS$  geringfügig unter dem stationären Wert, der sich in den übrigen Messungen ergeben hat ( $2.6 \mu\text{mol}/gTS$ ) und damit auch unter dem berechneten Wert. Vom Modell wurde allerdings ein ständiger Abfluss des Metaboliten und damit eine Entleerung des Pools beschrieben. Durch einen bisher im Modell nicht berücksichtigten Regulationsmechanismus wird die Konzentration von PEP auf einem hohen Niveau gehalten. Die physiologische Funktion kann sein, dass bei erneutem Auftreten von Substrat der Transport sofort mit maximaler Geschwindigkeit starten kann. Auch dieses Verhalten sollte durch ein Gesamtzellmodell mit detaillierterer Beschreibung der Biosynthese zu beschreiben sein. Auch für den intrazellulären Pool an Prv ergab sich im Modell eine Entleerung, die im Experiment nicht zu beobachten war. Es kam nur zu einer geringen Absenkung der Konzentration, die durch einen verminderten Fluss vom PEP zu erklären war. Insgesamt bietet dieses Experiment eine Möglichkeit in weiterführenden Arbeiten die Verschaltung von Einheiten des zentralen Kohlenstoff-Metabolismus zu studieren.

## 4.7 Sauerstofflimitierung

Zur Untersuchung der Veränderung des Phosphoenolpyruvat:Pyruvat-Verhältnis und des Phosphorylierungsgrades von EIIA<sup>Crr</sup> bei niedrigen Gelöstsauerstoffkonzentrationen wurde die stationäre kontinuierliche Kultur ( $D = 0.1 h^{-1}$ ) bei limitierenden Sauerstoffpartialdrücken von 5% und 10% der Sättigung vermessen. Die regelungstechnische Realisierung dieser prozesstechnischen Aufgabe wurde in Kap. 4.1 beschrieben. Die Kultur wurde nach aerobem kontinuierlichem Wachstum (mindestens drei Tage) auf Sucrose sauerstofflimitiert gefahren. Nach mindestens zwei Tagen wurden die Messungen durchgeführt. Die Messergebnisse sind in Tab. 4.5 zusammengefasst. Mit abnehmendem Sauerstoffpartialdruck in der Lösung und damit erhöhter Sauerstofflimitierung ergab sich eine Erhöhung des PEP:Prv-Verhältnis von 1.6 bei  $p_{O_2} = 70\%$  zu 2.8 bei  $p_{O_2} = 5\%$ . Die Gesamtmenge von PEP und Prv stieg leicht an. Gleichzeitig erhöhte sich auch der Phosphorylierungsgrad des EIIA<sup>Crr</sup> leicht, während die extrazelluläre Sucrosekonzentration keiner messbaren Veränderung unterlag. Diese Messwerte wurden

$p_{O_2}$ [%]	PEP [ $\mu\text{mol/gTS}$ ]	Prv [ $\mu\text{mol/gTS}$ ]	PEP:Prv	eScr [g/l]	Pg.(EIIA) [-]
70	2.5	1.6	1.6	0.002	0.70
10	2.9	1.4	2.1	0.002	0.72
5	3.6	1.3	2.8	0.002	0.76

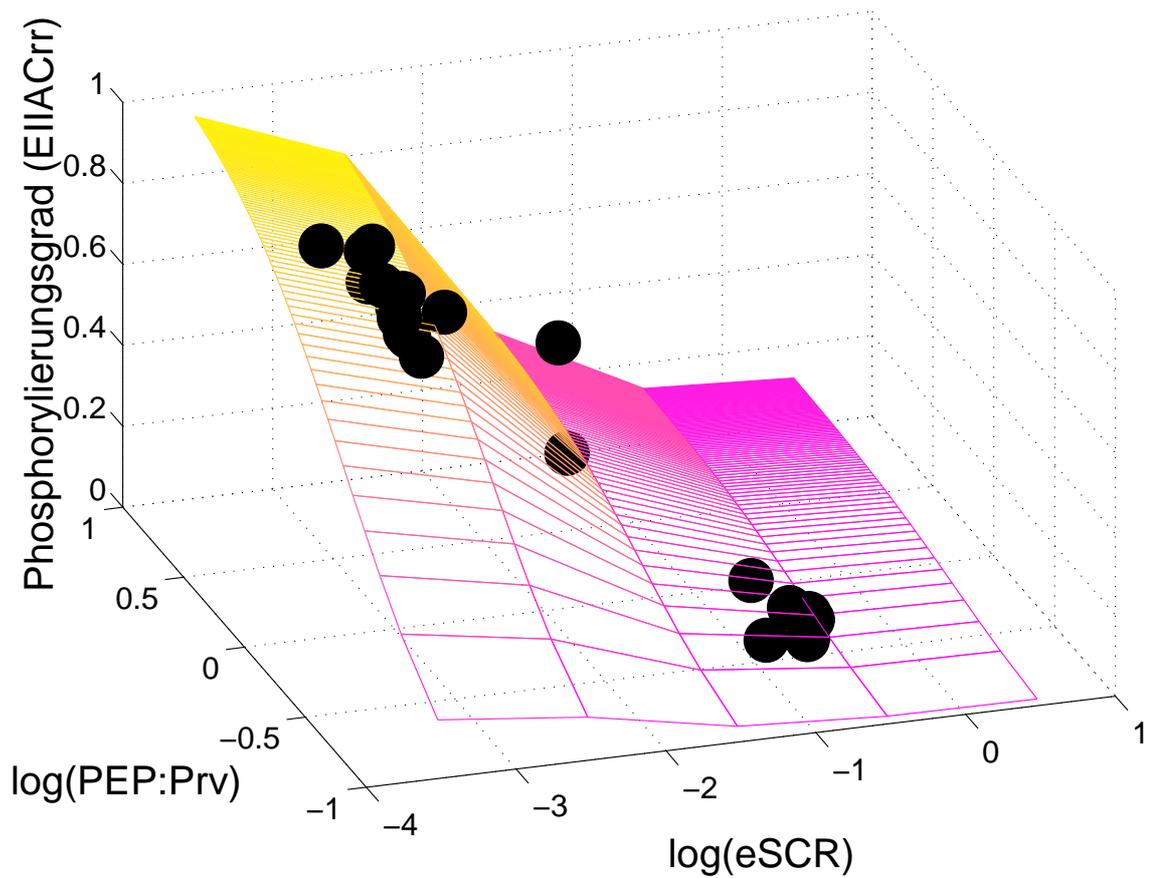
**Tabelle 4.5:** PEP:Prv-Verhältnis, Sucrosekonzentration und Phosphorylierungsgrad von EIIA<sup>Crp</sup> in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration während der stationären kontinuierlichen Prozessführung ( $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ ).

ebenfalls für die Validierung der PTS-Kennlinien herangezogen, die im nächsten Teilkapitel dargestellt ist.

Bei Sauerstofflimitierung kommt in *E. coli* das wie das *crpA*-Modulon ebenfalls global wirkende Regulationssystem ArcA/B ins Spiel. Es kommt zu zahlreichen regulatorischen Eingriffen auf der Ebene der Genexpression. Dies betrifft auch den zentralen Kohlenstoff-Katabolismus [113]. Dies resultiert in einer Veränderung der Stoffflüsse durch das zentrale metabolische Netzwerk [169]. Es kann damit auch zu einer Verschiebung des PEP:Prv-Verhältnisses kommen, wie im Experiment gezeigt. Auch die beim Aerob-Anaerob-Übergang stattfindenden langsamen dynamischen Prozesse mit Zeitkonstanten im Stundenbereich sind bereits beschrieben [26]. Die exakte mathematische Beschreibung dieser Vorgänge erfordert die Verschaltung der Biologischen Funktionseinheiten für das *crpA*-Modulon mit dem ArcA/B-System. Diese systembiologische Fragestellung wird in einem nachfolgenden Projekt bearbeitet, wobei auch noch das bei Stickstoffmangel wichtige globale Regulationssystem NtrB/C miteinbezogen wird.

## 4.8 Kennlinien-Validierung

Mit den in den vorigen Kapiteln beschriebenen Ergebnissen konnten die berechneten stationären Kennlinien für das PTS experimentell validiert werden. In Abb. 4.12 ist das Kennlinienfeld des PTS aufgetragen. Dargestellt ist der Phosphorylierungsgrad von EIIA<sup>Crp</sup> in Abhängigkeit des PEP:Prv-Verhältnis und der extrazellulären Sucrosekonzentration. Man erkennt, dass die maximale Phosphorylierung bei hohem PEP:Prv-Verhältnis und geringer Sucrosekonzentration erreicht wird. Im Gegensatz dazu ist EIIA<sup>Crp</sup> bei geringem PEP:Prv-Verhältnis und hoher Sucrosekonzentration praktisch vollständig dephosphoryliert. Die Phosphorylierung hängt von beiden Parametern ab, wobei bei hohen Zuckerkonzentrationen der Einfluss des PEP:Prv-Verhältnis sehr gering ist. EIIA<sup>Crp</sup> ist in diesem Fall dephospho-



**Abbildung 4.12:** Berechnetes Kennlinienfeld (Gl. 3.5) und experimentelle Ergebnisse (Punkte) für das PTS. Dargestellt ist der Phosphorylierungsgrad von  $EIIA^{Crr}$  in Abhängigkeit des PEP:Prv-Verhältnisses und der Sucrosekonzentration.

ryliert. Gleiches gilt für ein sehr geringes PEP:Prv-Verhältnis. Die Zuckerkonzentration ist dann hierbei von untergeordneter Wichtigkeit. Wie hier gut zu erkennen ist, integriert das PTS die Eingangssignale von außerhalb und innerhalb der Zelle zu einem Ausgangssignal.

Die Punkte in Abb. 4.12 stellen die gemessenen Daten dar. Diese sind aus verschiedenen Experimenten gewonnen worden und spiegeln verschiedene Stoffwechselsituationen wieder. Die Signalübertragungseigenschaften des PTS in diesen verschiedenen Experimenten werden durch das Modell sehr gut beschrieben. Die Abweichung der Messpunkte vom Kennlinienfeld ist gering. Auch die von Hogema [50] gemessenen Daten lassen sich durch das Modell gut beschreiben (Daten nicht gezeigt).

Als entscheidende Modellparameter erwiesen sich die Geschwindigkeitskonstanten für die Phosphorylübertragung von HPr zu EIIA<sup>Crr</sup> ( $k_9$ ,  $k_{-9}$ ). Aufgrund der vorhandenen Messinformation über den Phosphorylierungsgrad des EIIA<sup>Crr</sup> konnten die Parameter für den Zu- und Abfluss zu und von EIIA<sup>Crr</sup> identifiziert werden. Gegenüber dem von Rohwer et al. veröffentlichten Modell [132], wurden die Geschwindigkeitskonstanten  $k_7$ ,  $k_8$ ,  $k_9$ ,  $k_{10}$  und  $k_{-9}$  verringert und  $k_{-7}$  und  $k_{-8}$  leicht erhöht, was insgesamt eine Verringerung des Flusses über das PTS bedeutet. Betrachtet man zum Beispiel den EIIA<sup>Crr</sup>-Phosphorylierungsgrad von 70% im stationären Zustand der kontinuierlichen Kultur bei einer Verdünnungsrate  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ , so wird dieser nun durch das angepasste Modell beschrieben. Mit den ursprünglichen Parametern hätte sich ein Phosphorylierungsgrad unter diesen zuckerlimitierten Bedingungen von nahezu 100% ergeben.

Es steht nun ein detailliertes Modell des PTS zur Verfügung, das experimentell gut validiert wurde. Dieses Modell kann in Simulationsstudien dazu verwendet werden, um am Rechner *in silico* zu experimentieren, analog zu Experimenten, wie sie der Biologe im Labor *in situ* durchführen kann. Dieses Verfahren soll im folgenden Teilkapitel veranschaulicht werden.

## 4.9 Weiterführende Simulationsstudien

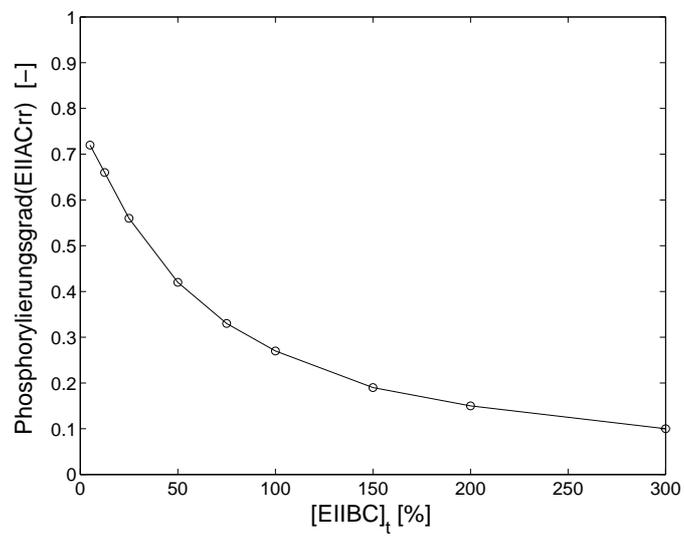
Über *in silico*-Experimente lassen sich die Ergebnisse von realen Experimenten im biologischen Labor abschätzen, die zum einen zeitaufwendig und schwierig durchzuführen sind oder zum anderen mit dem momentanen Stand der Technik nicht realisierbar sind. Die Variation der Proteinkonzentration eines PTS-Proteins kann über die Amplifikation des entsprechenden Gens mittels gentechnischer Methoden erreicht werden. Dies ist aber ebenso ein sehr aufwendiger Versuch, wie

die systematische Analyse der PTS-vermittelten Chemotaxis, wie sie im zweiten Unterkapitel gezeigt ist. Ein bereits in dieser Arbeit beschriebenes Beispiel ist die Untersuchung des EI-Monomer-Dimer-Zyklus (Kap. 3.2.2), die zeigte, dass der Zyklus wohl nicht bei jeder Phosphoryl-Transferreaktion durchlaufen wird.

#### 4.9.1 Variation der Proteinkonzentrationen

Der Verlauf der berechneten und experimentell validierten Kennlinien, die die Signaltransduktionseigenschaften des PTS beschreiben, hängt neben den bisher betrachteten Eingangsgrößen  $e_{Scr}$ , PEP und Prv, auch von der Gesamtkonzentration der PTS-Proteine ab. Diese Abhängigkeit liefert der Zelle eine weitere Eingriffsmöglichkeit zur Anpassung der Signalübertragung an die jeweiligen Bedingungen. Die Expression der Substrat-spezifischen EIIs hängt in starkem Maße von der Konzentration des Substrats und des globalen Regulators, wie cAMP.CrpA ab [122]. Und auch für die generellen PTS-Proteine EI und HPr wird eine zwei- bis dreifache Veränderung ihrer Konzentration in Abhängigkeit verschiedener Kohlenstoffquellen beschrieben, wobei auf Glucose die höchsten Konzentrationen erreicht werden [103]. Des Weiteren wurden zahlreiche Studien an gentechnisch manipulierten Stämmen mit gegenüber dem Wildtyp veränderten PTS-Proteinkonzentrationen durchgeführt [39, 132, 144, 159]. In diesem Zusammenhang interessant ist auch die gentechnische Konstruktion eines Multidomänen-Fusionsproteins aller vier Proteine des Glucose-PTS. Die Phosphoryltransfer-Aktivität des gereinigten Fusionsproteins war drei- bis viermal höher als die einer äquimolaren Mischung der isolierten Proteine [100]. Dieses Phänomen kann *in vivo* aufgrund von Komplexbildung und damit verbundener lokaler Erhöhung der Proteinkonzentrationen eine wichtige Rolle spielen [132].

Die Abhängigkeit der PTS-Signaltransduktion von den Proteinkonzentrationen soll am Beispiel der Konzentration des Transporters EIIBC<sup>Scr</sup> und ihrem Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad des EIIA<sup>Cr</sup> erläutert werden. Die berechnete Abhängigkeit ist in Abb. 4.13 gezeigt. Der Phosphorylierungsgrad änderte sich von 10 % bis 70 %, wenn die EIIBC-Konzentration von 5% bis 300 % der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration von  $[EIIBC]_t = 0.036 [\mu\text{mol}/gTS]$  variiert wurde. Diese Konzentration wurde von Rohwer et al. aus Glucose-Schüttelkolbenexperimenten bestimmt [132] und beschrieb auch die Sucroseexperimente gut. Lag der Transporter nur in geringer Menge vor, stauten sich aufgrund einer verminderten Gesamtreaktionsrate die Phosphorylgruppen im PTS, was gleichbedeutend mit einem hohen Phosphorylierungsgrad ist. Bei hoher Transporterkonzentration wurden die Phosphorylgruppen vermehrt abgezogen, falls, wie in dieser Studie vor-



**Abbildung 4.13:** Berechnete Abhängigkeit des stationären Phosphorylierungsgrads von  $EIIA^{Crr}$  von der Gesamtkonzentration des Transporters  $EIIBC^{Scr}$  (in % der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration) bei konstanten Eingangsgrößen  $eScr = 0.03 \text{ g/l} = 88 \mu\text{M}$  (Sättigung) und  $PEP : Prv = 2$ .

ausgesetzt, genügend Substrat vorhanden war. Es ergab sich ein niedrigerer Phosphorylierungsgrad. Ähnlich starke Abhängigkeiten wurde auch bei weiteren Untersuchungen für andere Gesamtkonzentrationen gefunden. In weiterführenden Arbeiten sollten auch analytische Verfahren zur Quantifizierung der Gesamtkonzentrationen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen entwickelt und etabliert werden, um so die Signalverarbeitung über das PTS noch differenzierter beschreiben zu können.

## 4.9.2 PTS-vermittelte Chemotaxis

Zur quantitativen Analyse der PTS-vermittelten Chemotaxis, deren Grundlagen in Kap. 1.4.2 erläutert wurden, liegen einige experimentelle Daten vor: In *in vivo*-Untersuchungen nach fotoinduzierter Freisetzung von PTS-Substraten wie Glucose und computerunterstützter Bewegungsanalyse konnten Reaktionen der PTS-Chemotaxis von innerhalb 200 ms gemessen werden [98]. Dynamische Veränderungen des PTS, hier speziell des EI, müssen also in einem Zeitfenster von etwa 10-30 ms erfolgen können, damit die gesamte Signaltransduktion, das Schalten des Motors und die Reaktion der Zelle genügend schnell erfolgen kann. Der Schwellenwert für Glucose in diesem Test liegt bei 10 nM. Bei 50 nM ist die Sättigung fast erreicht und ab 200 nM wird die Dephosphorylierung des phospho-CheY limitierend. Mit 50-100 nM Glucose wurde bereits eine vorwärtsgerichtete Schwimmbewegung erreicht, doch die Antwortrate nahm mit steigender Glucosekonzentration noch weiter zu. Ein  $K_M$ -Wert von 5  $\mu\text{M}$  wurde in Transporttests gemessen. In einer abschätzenden Rechnung ergibt sich, dass Substrattransport nahe des Schwellenwertes oder des Sättigungswertes zu sehr geringen Veränderungen der intrazellulären PEP-Konzentration (kleiner 1%) führt, was deswegen nicht als Signal für die PTS-Chemotaxis in Frage kommen kann. EI dagegen ändert sich zwischen 25% und 45% und kann daher die Signalfunktion erfüllen [98].

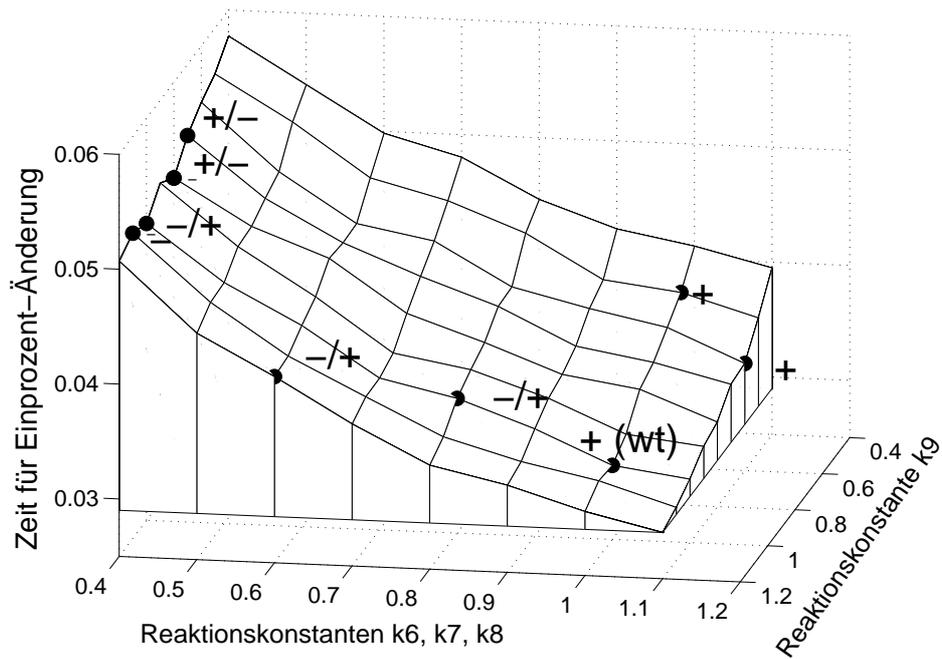
In ausführlichen Simulationsstudien wurden diese experimentellen Ergebnisse mit Berechnungen durch das Modell verglichen [123]. Im ersten Schritt wurde hierzu das PTS im stationären Zustand durch Sprünge in der extrazellulären Sucrosekonzentration ausgelenkt, wie dies *in vivo* in einem Zuckergradienten vorstellbar ist. Es wurde dabei von stationären Sucrosekonzentrationen im Bereich von 0.3 mg/l (0.9  $\mu\text{M}$ ) bis 100 mg/l (290  $\mu\text{M}$ ) ausgegangen und Sprünge von 0.01 % bis 100 % ausgeführt. Insgesamt wurden in dieser Studie 30000 Sprünge berechnet und die Reaktion der einzelnen PTS-Komponenten analysiert. Betrachtet wurde das Erreichen einer einprozentigen Änderung der jeweiligen PTS-Komponente bezogen auf ihre Gesamtkonzentration. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.6 zusammengefasst. Das bisher vermutete verbindende Element zwischen PTS und Chemotaxis-

PTS-Protein	Antwortzeit [ms]	Antworthöhe [%]
EID	8-10	20-50
EI	1000-4000	1-4
HPr	8-30	2-5
EIIA	6-37	3-8
EIIBC	1	2-10

**Tabelle 4.6:** Antwortzeiten und -höhe (bezogen auf die Gesamtkonzentration des jeweiligen Proteins) auf Sprünge in der extrazellulären Sucrosekonzentration, wie im Text erläutert.

Signalkette ist das dephosphorylierte EI-Monomer (EI). Diese Komponente reagiert viel zu langsam im Vergleich zu den geforderten 20 ms und zeigt auch nur eine geringe prozentuale Konzentrationsveränderung. Das unphosphorylierte EI-Dimer (EID) dagegen reagiert innerhalb des geforderten Zeitfensters mit einer hohen Konzentrationsänderung von 20 % bis 50 % und ist damit mit deutlich höherer Wahrscheinlichkeit als das EI-Monomer das gesuchte verbindende Element. Dieses Ergebnis ist natürlich von dem gewählten mathematischen Modell abhängig. Würde man zum Beispiel durch eine deutliche Erhöhung der entsprechenden Parameter (siehe hierzu Kap. 3.2.2) davon ausgehen können, dass der EI-Monomer-Zyklus in jeder Phosphoryl-Transferreaktion durchlaufen wird, würden sich natürlich in auch andere Ergebnisse in einer solchen Simulationsstudie ergeben. Die anderen PTS-Komponenten reagieren ebenfalls schnell genug, um eine Reaktion der Zelle innerhalb von 200 ms zu ermöglichen, zeigen aber eine deutlich geringere Antworthöhe und erscheinen daher als mögliche verbindende Elemente auch eher unwahrscheinlich.

In einer zweiten Simulationsstudie wurde das Verhalten des EI-Dimer (EID) genauer untersucht. Simuliert wurde hierzu ein von Lux et al. durchgeführtes Experiment [97]. Hierbei wurden gentechnisch veränderte Stämme bezüglich des Glucose PTS konstruiert, die die Phosphoryl-Übertragung vom EI zum EIIA<sup>Crr</sup> durch verschiedene HPr und HPr-ähnliche Proteine bewerkstelligen. Diese Proteine besitzen verschiedene Phosphoryltransfer-Aktivitäten von EI und zu EIIA<sup>Crr</sup>, die auch experimentell bestimmt wurden. Die verschiedenen Stämme wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, weiterhin PTS-vermittelte Chemotaxis durchzuführen und das Ergebnis in qualitativer Art festgehalten. Dieses Experiment wurde nun auch im Rechner durchgeführt. Hierzu wurden die beiden Phosphotransferaktivitäten des HPr jeweils in einem Bereich von 40 % bis 120 % variiert und an jedem dieser Punkte die beschriebenen Simulationen mit Sucrose-Sprüngen durchgeführt. Trägt man nun die berechnete Zeit für eine EID-Konzentrationsänderung von einem Prozent auf, ergibt sich Abb. 4.14.



**Abbildung 4.14:** Zeit für relative Änderung der EID-Konzentration um ein Prozent bei Sprüngen der extrazellulären Sucrosekonzentration über den (genetisch veränderten) Phosphotransferaktivitäten des HPr von EI (Konstanten  $k_6$ ,  $k_7$ ,  $k_8$ ) und nach EII (Konstante  $k_9$ ). Vergleich mit qualitativen experimentellen Beobachtungen zur Glucose-PTS-Chemotaxis [97]: + Ch. tritt auf, - Ch. selten, +/- und -/+ geringe, bzw. keine Ch., jeweils durch Erhöhung der Expression des HPr-ähnlichen Proteins verbessert

Die Reaktionszeiten liegen bei diesen Simulationsexperimenten zwischen 30 und 60 ms, wobei sich bei hohen Phosphoryltransferaktivitäten vom EI und zum EIIA kürzere Zeiten ergeben. Bei geringeren Phosphoryltransferaktivitäten erhöht sich die Zeit bis zu einer einprozentigen Veränderung der Konzentration des EID. Alle anderen EI-Spezies reagieren deutlich langsamer (im Bereich von 100-500 ms) und sind daher als verbindendes Element zur Chemotaxis-Signalkette eher unwahrscheinlich. HPr dagegen reagiert schnell genug, erreicht aber nur eine deutlich geringere Antworthöhe (Tab. 4.6). Das beobachtete qualitative Verhalten der verschiedenen HPr-Mutanten wird in den errechneten Ergebnissen wiedergegeben. Die mit + gekennzeichneten Chemotaxis-positiven Stämme zeigen eine verkürzte Reaktionszeit gegenüber den schwach-, beziehungsweise nicht-Chemotaxis-aktiven Stämmen. Die Unterscheidung zwischen diesen Stämmen kann allerdings nicht wiedergefunden werden, ebenso wie eine quantitative Beschreibung der experimentellen Ergebnisse.

Insgesamt zeigen die Simulationsstudien also, dass das unphosphorylierte EI-Dimer EID im Gegensatz zu den anderen PTS-Komponenten sehr gut das verbindende Element von der PTS- zur Chemotaxis-Signalkette darstellen kann und die biologische Modellvorstellung untermauert.

# Kapitel 5

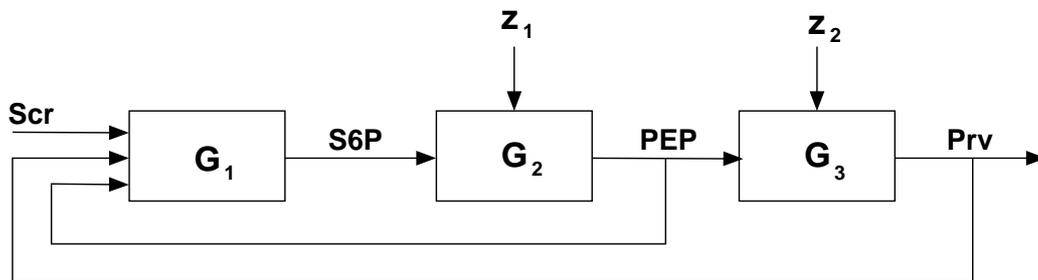
## Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein mathematisches Modell zur Beschreibung der Signalverarbeitung über das bakterielle Sucrose Phosphotransferasesystem (PTS) entwickelt und experimentell verifiziert. Es wurden hierfür sowohl biologische, als auch ingenieurwissenschaftliche Methoden verwendet. Dies ist im neu entstehenden Forschungsgebiet 'Systembiologie' notwendig (Kap. 5.1).

Für zukünftige Arbeiten stehen eine Vielzahl an Möglichkeiten ausgehend von den validierten Bausteinen für das PTS und die Glykolyse zur Verfügung, die auch noch weiter überprüft werden können. Einige Projekte, die im Rahmen von Folgearbeiten und -anträgen bearbeitet werden, sollen kurz dargestellt werden.

Notley-McRobb et. al. stellten eine deutliche Zunahme des cAMP-Spiegels bei Glucosekonzentrationen unterhalb  $0.3 \text{ mM}$  fest [116]. Erste Simulationsstudien mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell zeigten, dass im erwähnten Konzentrationsbereich bereits eine Zunahme des Adenylatzyklase-aktivierenden EIIA<sup>Crr</sup>-P auftreten kann. In weitergehenden Simulationsstudien und vor allem detaillierten experimentellen Untersuchungen soll die Signalverarbeitung innerhalb der Katabolitenrepression hier genauer charakterisiert werden.

Innerhalb der Katabolitenrepression ergibt sich durch die Verhinderung des Abbaus eines Substrats bei Anwesenheit eines zweiten, "höherwertigen" Substrats eine Hierarchie der Zuckerverwertung (Klasse A und B-Substrate). Gerade für die "niederwertigeren"  $\beta$ -Glucoside (Klasse B), die ebenfalls über ein PTS aufgenommen werden (*bgl*-Operon), wurden in den letzten Jahren viele molekularbiologische Details aufgeklärt [44]. Durch Entwurf eines entsprechenden *bgl*-Moduls



**Abbildung 5.1:** Blockdiagramm des PTS-Glykolyse-Modells. Die Funktionen  $G_1$ ,  $G_2$  und  $G_3$  beschreiben hierbei PTS, Glykolyse und Pyruvatkinase. Die Größen  $z_1$  und  $z_2$  stehen für die Abflüsse in den weiteren Stoffwechsel und in die Biosynthese.

und Verschaltung mit dem bereits vorhandenen PTS-Baustein, können die Prinzipien dieser hierarchischen Regelung besser verstanden werden. Als weitere Klasse B-Substrate kommen hier auch Mannitol und Glucitol in Frage.

Die Verschaltung von biologischen funktionellen Einheiten spielt auch eine wichtige Rolle, wenn man die Wechselwirkung mehrerer globaler Regulationssysteme untersuchen will. Hierbei soll neben der Regulation des Kohlenstoff-Metabolismus, in der das PTS eine zentrale signalverarbeitende Position inne hat, die Sauerstoff-(Fnr, ArcA/B) und Stickstoff-abhängige (NtrB/C) Regulation betrachtet werden. Des Weiteren kommen auch noch FlhD/C und das RelA/SpoT-System in Betracht. Auch hierbei muss das bestehende mathematische Modell um zusätzliche Module erweitert und diese dann verschaltet werden. Diese Modellierungsaufgaben werden durch ausführliche experimentelle Untersuchungen mit verschiedenen Anregungen aller betrachteter Regulationssysteme ergänzt.

Um bei der mathematischen Modellbildung effizient mit der biologischen Komplexität umgehen zu können, scheint eine Reduktion der bisher recht ausführlichen Modelle, die für eine funktionelle Einheit praktisch alle Metabolite und deren Verknüpfungen berücksichtigen, notwendig. Ziel ist es, das oft einfache beobachtete Verhalten (Phänotyp) aus dem biochemischen Reaktions- und Regulationsnetzwerk abzuleiten. Dies entspricht in der Regelungstechnik der Beschreibung des Übertragungsverhaltens eines Systems. In einem ersten Schritt soll für das in dieser Arbeit entwickelte und validierte Modell des PTS und der Glykolyse das Gesamtübertragungsverhalten bestimmt werden. Eine Beschreibung biologischer Systeme in der regelungstechnischen Blockdiagramm-Darstellung, wie sie in Abb. 5.1 für das PTS-Glykolyse-Modell vorgeschlagen ist, kann hierzu wichtig sein, um die Regelstruktur des Systems erfassen zu können.

Dieser PTS-spezifische Ausblick stellt mit den gerade erläuterten systembiolo-

gischen Ansätzen bereits wesentliche Aspekte und Fragestellungen der Systembiologie dar. Dieses noch recht junge Forschungsgebiet soll abschließend kurz umrissen werden.

## 5.1 Systembiologie (Systems Biology)

Die molekularbiologische Forschung der letzten Jahrzehnte war geprägt von qualitativen und beschreibenden Untersuchungen. Dabei wurden meist individuelle Komponenten, wie Gene oder Proteine und individuelle Wechselwirkung untersucht. Die Forschung war dabei vor allem auf das Verständnis molekularbiologischer Details ausgerichtet. Was aber bisher stark vernachlässigt wurde, ist die quantitative Analyse des ganzheitlichen Verhaltens zellulärer Teilsysteme, das sich aufgrund des Zusammenwirkens einer größeren Anzahl miteinander vernetzter molekularer Komponenten (Gene, Proteine, etc.) ergibt. Betrachtungen des ganzheitlichen Verhaltens sind aber notwendig, um die Wirkungsmechanismen etwas komplexer strukturierter Einheiten der Regulation und Signaltransduktion, denen man in zellulären Systemen in vielfältigen Formen begegnet, überhaupt verstehen zu können [40].

Rein gedanklich ist dieses Verhalten aufgrund des Zusammenwirkens einer größeren Anzahl vernetzter Komponenten nicht mehr nachvollziehbar. Hier braucht man das Hilfsmittel der mathematischen Modellierung. Dies erlaubt es, das heute verfügbare biologische Wissen mit einer systemwissenschaftlichen Denkweise zu verbinden [40]. Die hierfür erforderliche interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen verschiedenen Forschungsrichtungen wie Biologie, Systemwissenschaft und Informatik, hat in den letzten Jahren zu einer drastischen Veränderung der Biologie geführt [74]. Es entstand das neue Forschungsgebiet der Systembiologie (Systems Biology). Das biologische System soll mit Hilfe systemwissenschaftlicher Untersuchungen besser verstanden werden [64]. Systembiologie stellt eine ganzheitliche Biologie dar, wie sie von Biologen seit langem angestrebt ist, allerdings aufgrund von Hemmnissen, wie fehlender quantitativer Daten, nur in geringerem Umfang realisiert werden konnte.

Die neuen Konzepte in der Systembiologie umfassen einen globalen und ganzheitlichen Ansatz in der Forschung und eine Verbindung von biologischem Wissen und systemwissenschaftlicher Betrachtung. Es werden die Interaktionen aller für eine funktionelle Einheit relevanter Elemente betrachtet. Dies erfordert aber eine enge Verzahnung mit dem biologischen Experiment. Nur so können die erstellten mathematischen Modelle auf ihre Gültigkeit und ihren prädiktiven Charakter untersucht werden.

Es haben sich so zwei sich ergänzende Herangehensweisen in der Systembiologie herauskristallisiert. In der ersten werden experimentelle Informationen von allen Ebenen des betrachteten biologischen Systems (DNA-, RNA-, Protein-, Metabolom-Ebene, ...) integriert. Hierbei werden sowohl metabolische, als auch regulatorische Netzwerke betrachtet. Dies wird dadurch möglich, dass in den letzten Jahren eine Reihe von gänzlich neuen und hocheffizienten Analysemethoden entwickelt wurden, was eine weitreichende Erfassung des Zellzustandes ermöglicht, bzw. in Zukunft ermöglichen wird. Ein wirkliches Verständnis des biologischen Systems wird allerdings nur durch die Anwendung systemwissenschaftlicher Theorien und Verfahren erreicht werden. In dieser zweiten Herangehensweise wird ein besonderes Augenmerk auf wichtige Regelkreisstrukturen, wie zum Beispiel feedback-Kontrolle gelegt. Diese Vorgehensweise wird in der klassischen Biologie ebenfalls zum Teil verfolgt [80, 81, 82, 83], kann aber durch die Möglichkeiten der Systemwissenschaften ergänzt werden. Eine entscheidende Aufgabe bei dieser Herangehensweise ist Konzentration auf zellspezifische Indikatoren, wie der cAMP-Konzentration oder dem PEP:Prv-Verhältnis, bei der Modellierung. Dies wird die Modellbildung deutlich vereinfachen, indem vor allem die Anzahl der notwendigen Zustände und Parameter verringert wird.

Weitere entscheidende systembiologische Fragestellungen umfassen die Strukturierung komplexer Netzwerke in kleinere Einheiten und deren Modellierung, sowie die Modellreduktion. Komplexe biologische Strukturen zeigen oft ein einfaches phänotypisches Verhalten. Die molekularbiologischen Strukturen, mit denen bestimmte Grundformen der Signalübertragung realisiert werden, die immer wieder zur Anwendung kommen, müssen charakterisiert werden. Zu klären bleibt auch, wie eine Funktionseinheit Robustheit ihres Verhaltens gegenüber Störeinflüssen realisiert, beziehungsweise wann diese nicht mehr zustande kommt und die Funktion des Systems sich drastisch ändert oder zusammenbricht (Fragilität).

Diese exemplarischen systembiologischen Aufgabenfelder zeigen, dass die Biologie heute wieder vermehrt Fragen relevant werden, wie sie auch für andere Systeme gestellt werden und die daher als einer allgemeinen Systemtheorie zugehörig gelten können. Hier berühren sich so verschiedene Anwendungsfelder, wie Naturwissenschaften, Ingenieur-Wissenschaften, Soziologie, Psychologie, Sprachwissenschaft, Philosophie und Kunst. So wurde etwa in der Sprachwissenschaft innerhalb der entstehenden philosophischen Strömung des Strukturalismus Sprache als ein komplexes System von Zeichen begriffen, das einer bestimmten Struktur folgt und das man analysieren kann. Wegen seiner Vorliebe für formale Konstruktionen ergab sich für den Strukturalismus eine Nähe zur Logik und Kybernetik [173]. Der postmoderne Philosoph Derrida spricht sogar von einer eindeutigen Bedeutung von einem komplexen und sich verändernden Spiel von Zeichenstruk-

turen und damit von dynamischem Verhalten von Textbedeutungen. Er nimmt dies zum Anlass, um die sogenannte Vernunftbestimmtheit unserer Sprache und Welt zu widerlegen (Dekonstruktion) und geht damit im systembiologischen Sprachgebrauch vom linearen zum vernetzten Denken über [173]. Die Biologen Maturana und Valera unterscheiden verschiedene Lebensformen in ihrer Struktur, erkennen aber bezüglich ihrer Organisation sehr viele Gemeinsamkeiten, die an wesentlichen Merkmalen festgemacht werden. Das unabhängige dynamische Verhalten wird dabei als wesentliches Charakteristikum des Systems verstanden (Autopoiese) [104]. Der Soziologe Luhmann wendet unter anderem das Konzept der Autopoiese auf soziale Phänomene an und formuliert eine allgemeine Systemtheorie für soziale Systeme [94, 121].

Systemtheoretisches Denken wird also sowohl in die Biologie getragen, als auch inspiriert durch Erkenntnisse in dieser Leitwissenschaft in verschiedenste Bereiche der Forschung und des gesellschaftlichen Denkens. Das Leben und viele damit zusammenhängende Prozesse werden mehr und mehr als eine Systemerscheinung verstanden [34]. Systemtheorie entwickelt sich dadurch zur wissenschaftlichen Basis einer veränderten Weltanschauung [79].

# Anhang A

## Glykolyse- und cAMP-Modell

In den folgenden Tabellen werden Kürzel für reaktionskinetische Ansätze [147] verwendet:

MM - Michaelis-Menten-Kinetik

MM+I - Michaelis-Menten-Kinetik mit nichtkompetitiver Inhibition

MM+A - Michaelis-Menten-Kinetik mit essentieller Aktivierung

rMM - reversible Michaelis-Menten-Kinetik

MWC - Monod-Wyman-Changeux-Modell (Symmetrie) mit  $n = 4$

Die maximale Reaktionsraten  $r_{max}$  sind in  $[\mu\text{mol}/gTS\ h]$  angegeben, die Konstanten für Bindungsaffinitäten in  $[\mu\text{mol}/gTS]$  und  $n$ ,  $L$  und  $V$  in  $[-]$ .

Enzym	Kinetik	$r = \dots$	Parameter	Beschreibung
ScrB	rMM	$\frac{r_{max} \left( \frac{[S6P]}{K_{S1}} - V \frac{[Fru]}{K_{S2}} \right)}{1 + \frac{[S6P]}{K_{S1}} + \frac{[Fru]}{K_{S2}}}$	$r_{max} = 40720$ $K_{S1} = 0.42$ $K_{S2} = 7.5$ $V = 1$	Max. Reaktionsrate für S6P für Fru Verhältnis
ScrK	MM+I	$\frac{r_{max} [Fru]}{\left( 1 + \frac{[F6P]}{K_I} \right) (K_S + [Fru])}$	$r_{max} = 21000$ $K_S = 20.7$ $K_I = 14.9$	Max. Reaktionsrate für Fru für F6P
PgiA	rMM	$\frac{r_{max} \left( \frac{[G6P]}{K_{S1}} - V \frac{[F6P]}{K_{S2}} \right)}{1 + \frac{[G6P]}{K_{S1}} + \frac{[F6P]}{K_{S2}}}$	$r_{max} = 3000$ $K_{S1} = 0.49$ $K_{S2} = 50$ $V = 0.04$	Max. Reaktionsrate für G6P für F6P Verhältnis
PfkA	MWC	$\frac{r_{max} [F6P] \left( 1 + \frac{[F6P]}{K_S} \right)^{n-1}}{K_S \left( \left( 1 + \frac{[F6P]}{K_S} \right)^n + L \frac{\left( 1 + \frac{[PEP]}{K_I} \right)^n}{\left( 1 + \frac{[ADP]}{K_A} \right)^n} \right)}$	$r_{max} = 6200$ $K_S = 0.03$ $K_A = 0.06$ $K_I = 1.79$ $n = 4$ $L = 4e + 6$	Max. Reaktionsrate für F6P für ADP für PEP Tetramer Konformation

**Tabelle A.1:** Zusammenstellung der verwendeten reaktionskinetischen Ansätze für die Stoffwechselwege Sucrose 6-Phosphat-Abbau und zentraler Kohlenhydratabbau

Tabelle A.2: (2. Teil)

FbaA	rMM	$\frac{r_{max} \left( \frac{[FBP]}{K_{S1}} - V \frac{[T3P]}{K_{S2}} \right)}{1 + \frac{[FBP]}{K_{S1}} + \frac{[T3P]}{K_{S2}}}$	$r_{max} = 9000$ $K_{S1} = 0.32$ $K_{S2} = 0.22$ $V = 1$	Max. Reaktionsrate für FBP für T3P Verhältnis
GapA	rMM	$\frac{r_{max} \left( \frac{[T3P]}{K_{S1}} - V \frac{[3PG]}{K_{S2}} \right)}{1 + \frac{[T3P]}{K_{S1}} + \frac{[3PG]}{K_{S2}}}$	$r_{max} = 13880$ $K_{S1} = 0.13$ $K_{S2} = 4.5$ $V = 1$	Max. Reaktionsrate für T3P für 3PG Verhältnis
PgmI	MM	$\frac{r_{max} [3PG]}{K_S + [3PG]}$	$r_{max} = 8400$ $K_S = 0.24$	Max. Reaktionsrate für 3PG
PykF	MM+A	$\frac{r_{max} [PEP][FBP]}{(K_S + [PEP])(K_A + [FBP])}$	$r_{max} = 6000$ $K_S = 0.22$ $K_A = 0.35$	Max. Reaktionsrate für PEP für FBP

Parameter	
$r_{bild}^{max}$	65.467 [ $\mu\text{mol}/gTS\text{ h}$ ]
$K_{ATP}$	4.5 [ $\mu\text{mol}/gTS$ ]
$K_{EIIAP}$	0.00655 [ $\mu\text{mol}/gTS$ ]
$K_{ab}$	16060.05 [ $\text{h}^{-1}$ ]

**Tabelle A.3:** Parameter des cAMP-Modells

Der Stoffwechsel der intrazellulären Konzentration des second messenger und indirekten PTS-Ausgangssignals cAMP wird mit einer Bildungs- und einer Abbaureaktion in einem einfachen Modell beschrieben. Das extrazellulär vorliegende cAMP wird nicht betrachtet. Die Bildungsreaktion wird dabei mit einer Kinetik der essentiellen Aktivierung beschrieben. Mit dem (konstant angenommenen) Substrat ATP und dem Aktivator EIIAP ergibt sich:

$$r_{bild} = r_{bild}^{max} \frac{[ATP][EIIAP]}{(K_{ATP} + [ATP])(K_{EIIAP} + [EIIAP])} \quad (\text{A.1})$$

Für die Abbaureaktion wurde eine Ansatz erster Ordnung verwendet, der sowohl Ausschleußung als auch den möglichen Abbau zusammenfasst:

$$r_{ab} = K_{ab}[cAMP] \quad (\text{A.2})$$

Die Bilanzgleichung für cAMP ergibt sich damit zu:

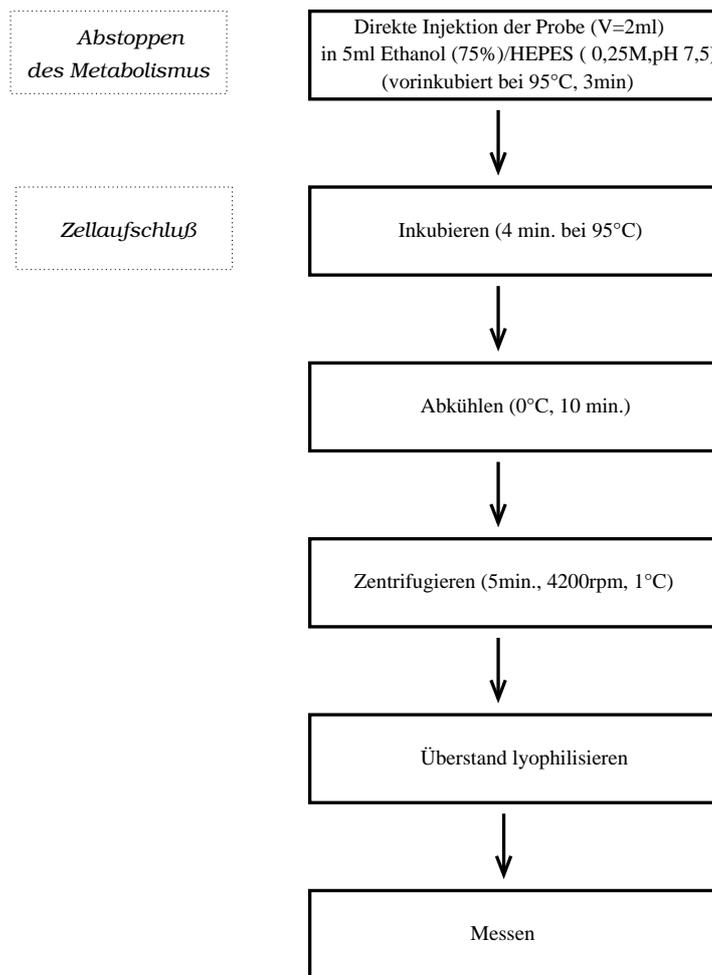
$$\frac{d[cAMP]}{dt} = r_{bild} - r_{ab} - \mu[cAMP] \quad (\text{A.3})$$

Die angepassten Parameter des Modells sind in Tab. A.3 aufgelistet.

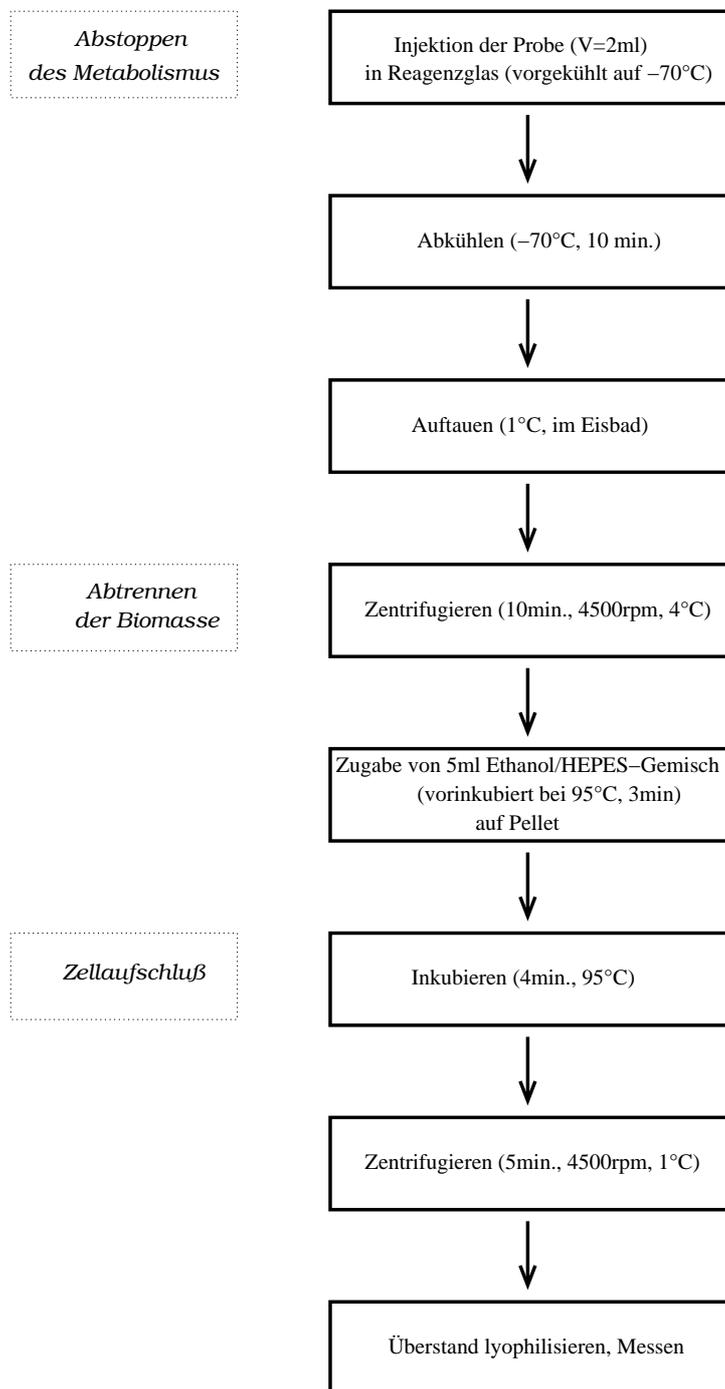
## **Anhang B**

# **Übersichtsschaubilder: Methoden zur Metabolit-Analytik**

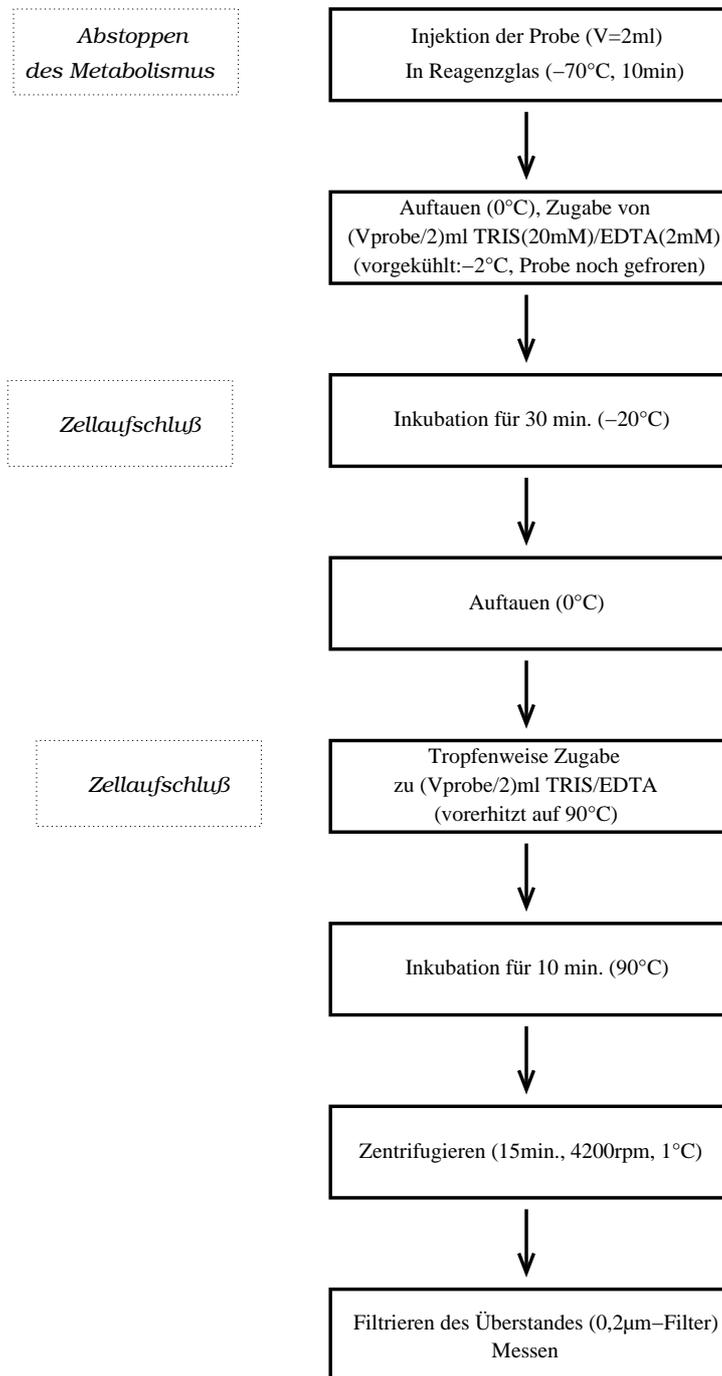
Die Schaubilder sind ergänzend zur Beschreibung der jeweilige Methode in Kap. 4.2.1, ab Seite 91.



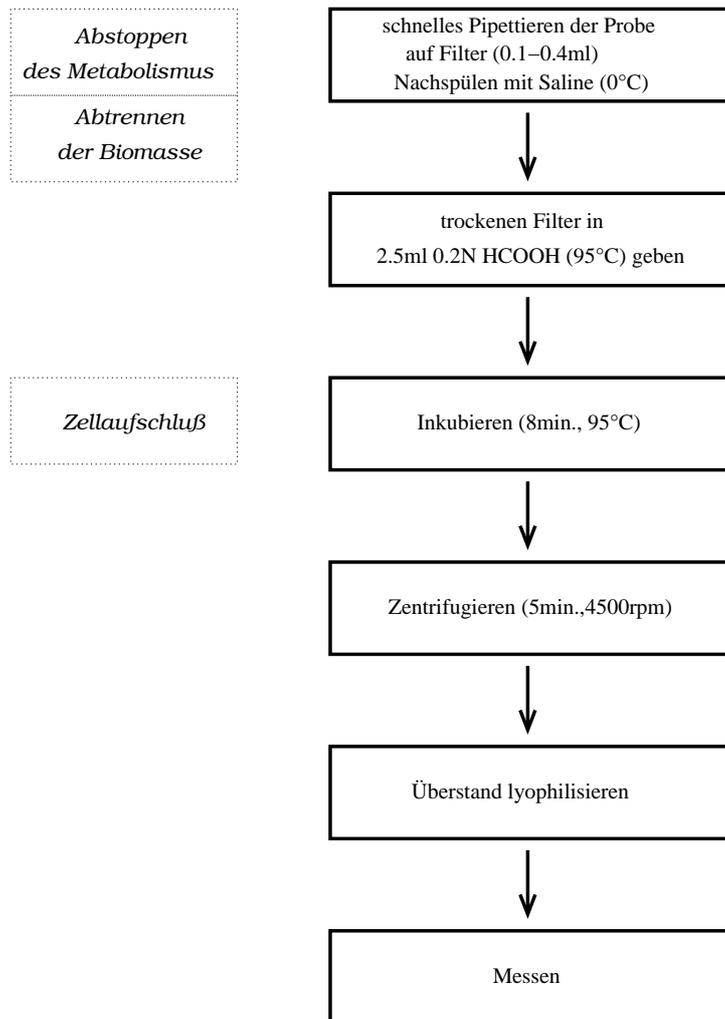
**Abbildung B.1:** Methode 1: Direkte Injektion der Probe in kochendes Ethanol/HEPES-Gemisch, zur Bestimmung von Gesamtkonzentrationen



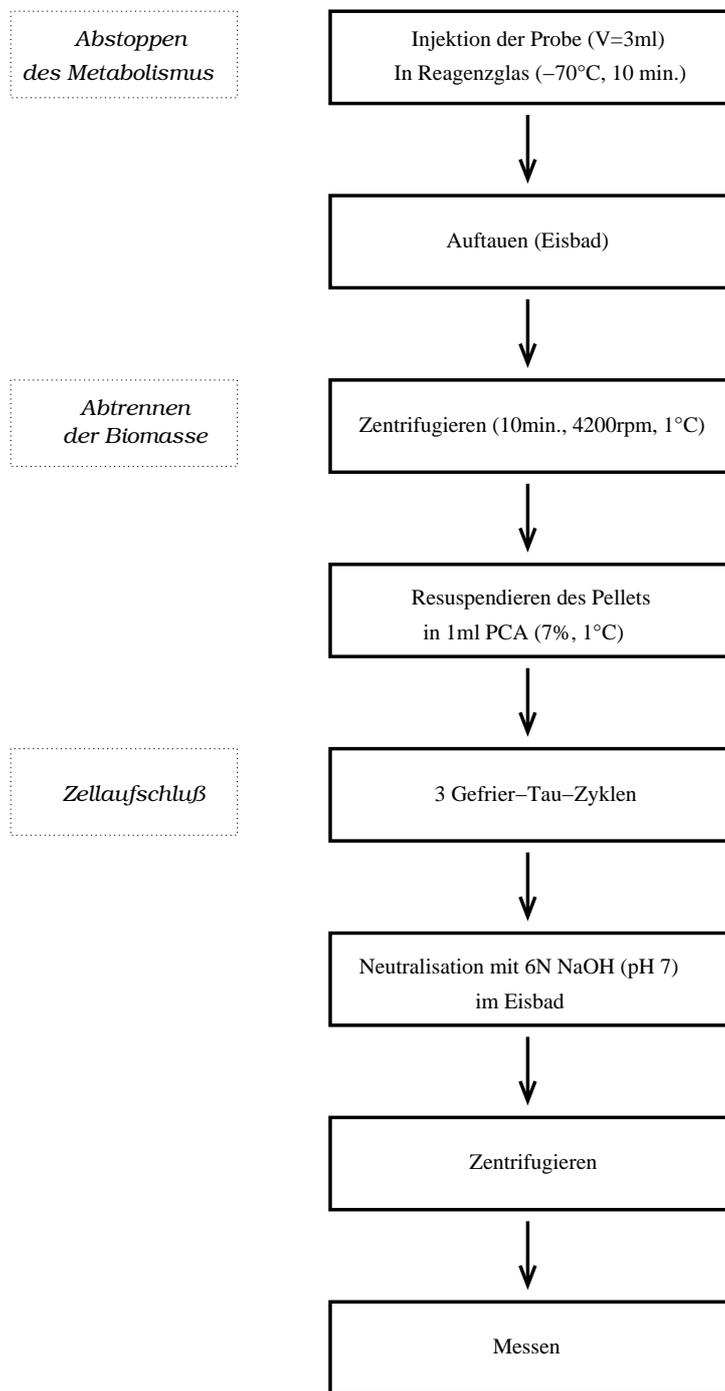
**Abbildung B.2:** Methode 2: Quenching auf Trockeneis, Aufschluß mit kochendem Ethanol/HEPES-Gemisch, zur Bestimmung intra- und extrazellulärer Konzentrationen (speziell cAMP)



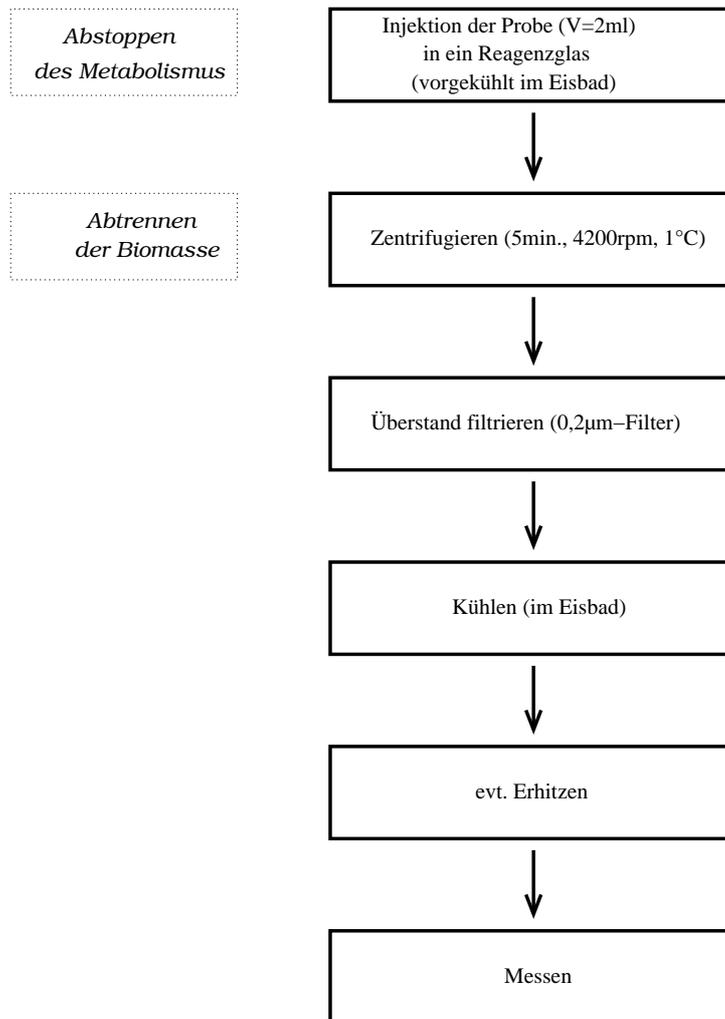
**Abbildung B.3:** Methode 3: Quenching in Trockeneis, Aufschluss mit TRIS/EDTA, zur Bestimmung von Gesamtkonzentrationen



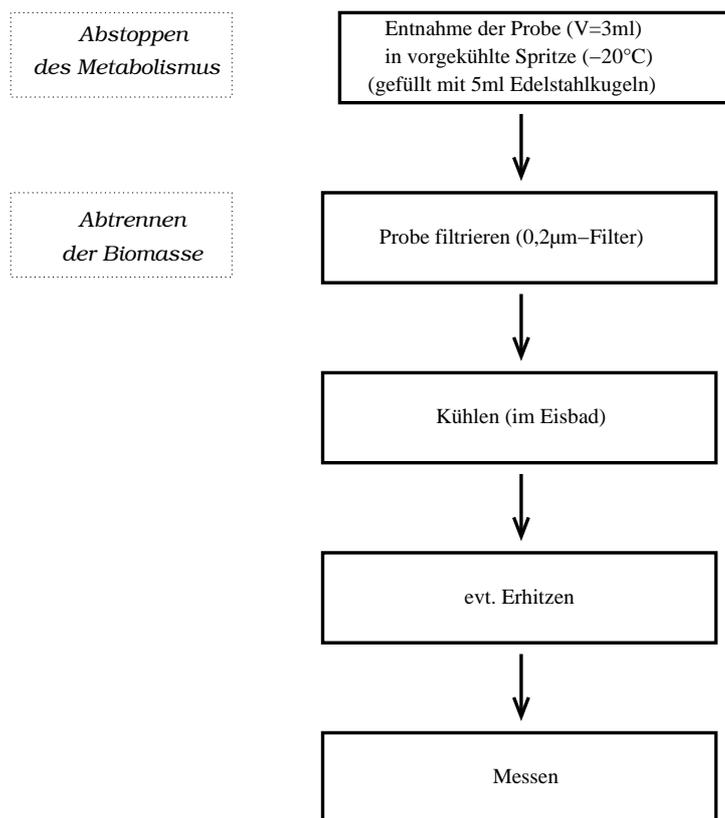
**Abbildung B.4:** Methode 4: Filtrieren, Aufschluss mit Ameisensäure, zur Bestimmung intra- und extrazellulärer Konzentrationen



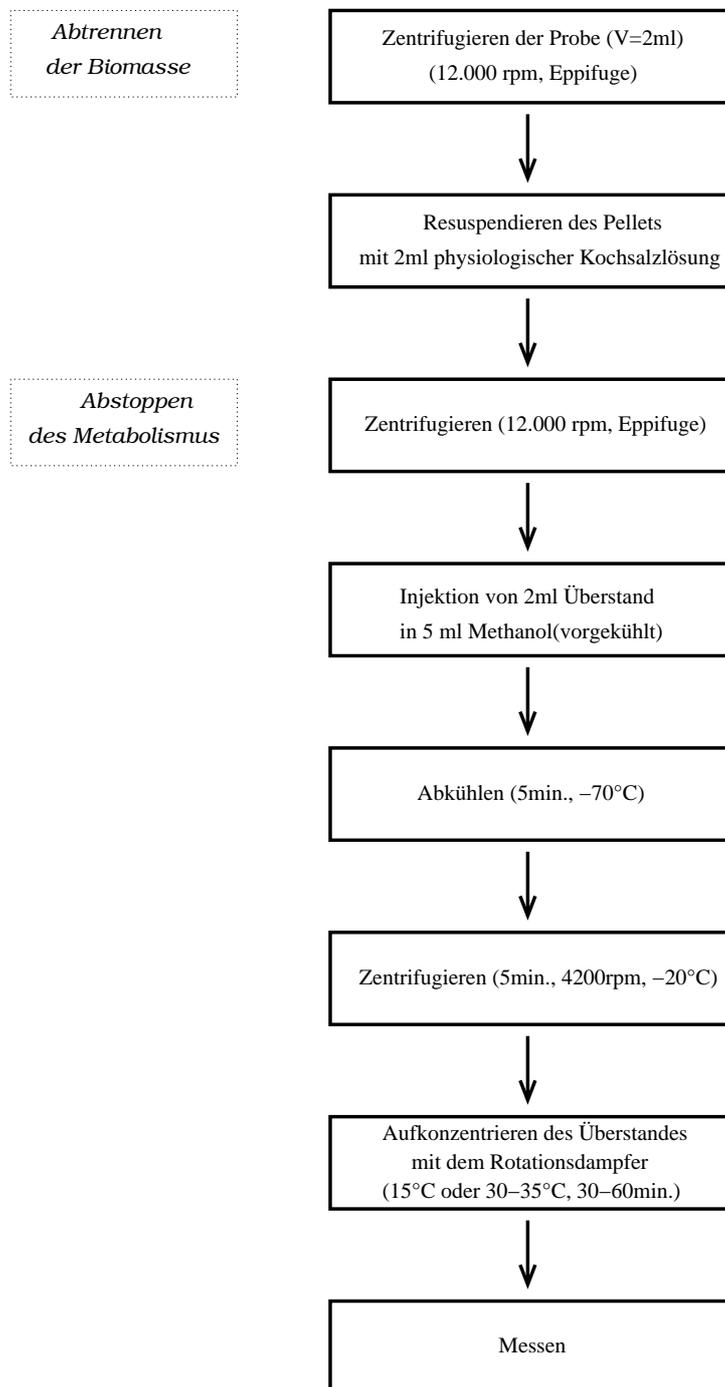
**Abbildung B.5:** Methode 5: Quenching im Reagenzglas in Trockeneis, Aufschluss mit Perchlorsäure, zur Bestimmung intra- und extrazellulärer Konzentrationen



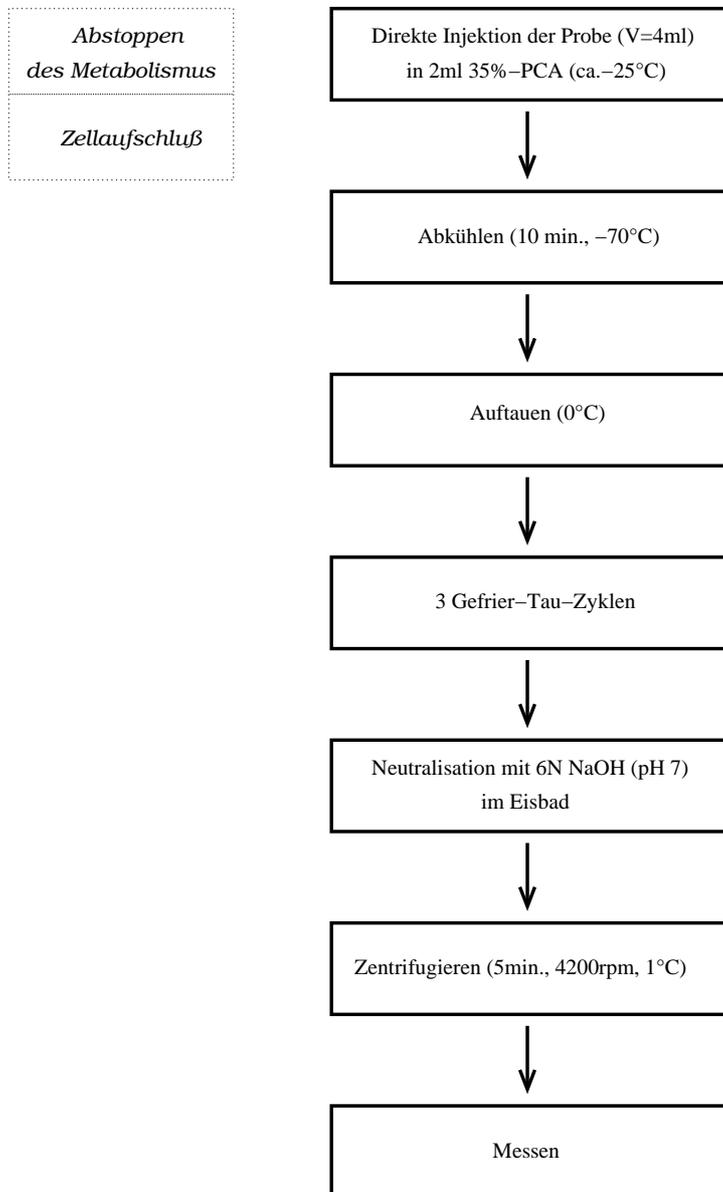
**Abbildung B.6:** Methode 6: Quenching im Eisbad, Zentrifugieren, zur Bestimmung extrazellulärer Konzentrationen



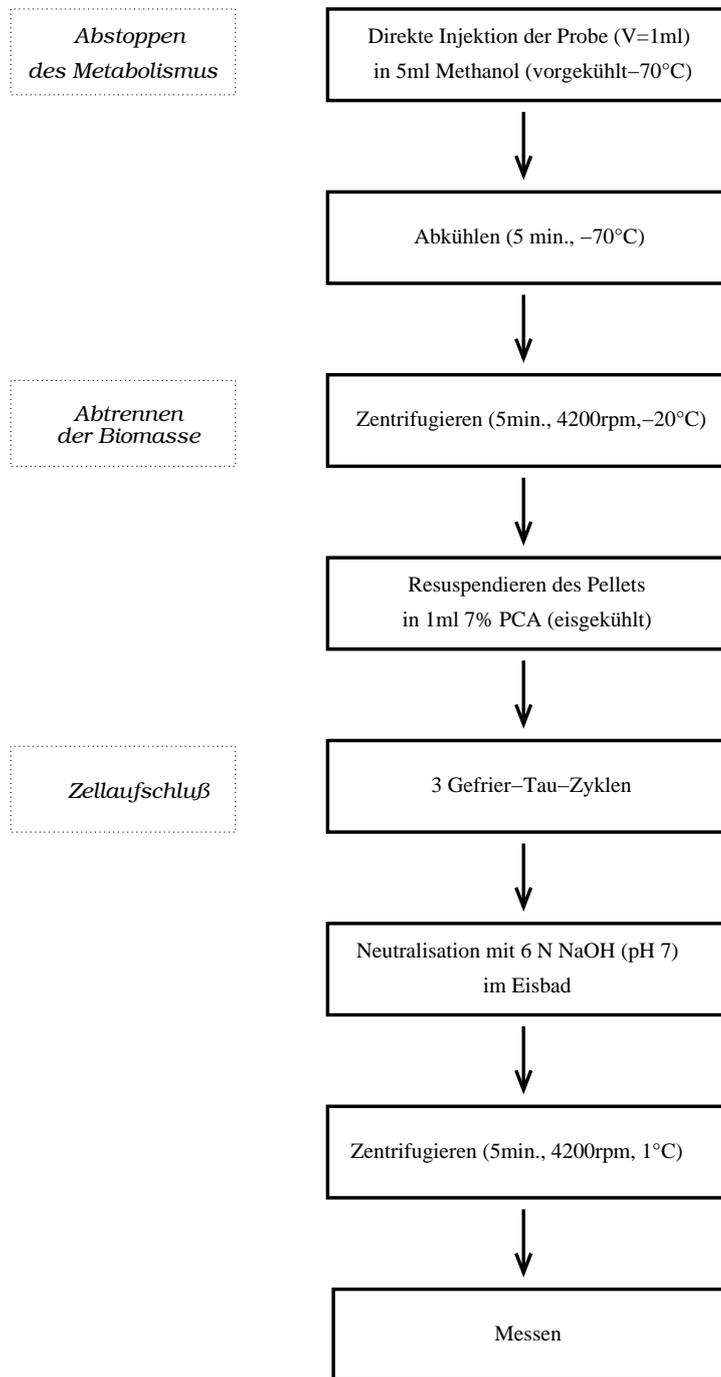
**Abbildung B.7:** Methode 7: Direktes Filtrieren, Quenching mit Edelstahlkugeln, zur Bestimmung extrazellulärer Konzentrationen



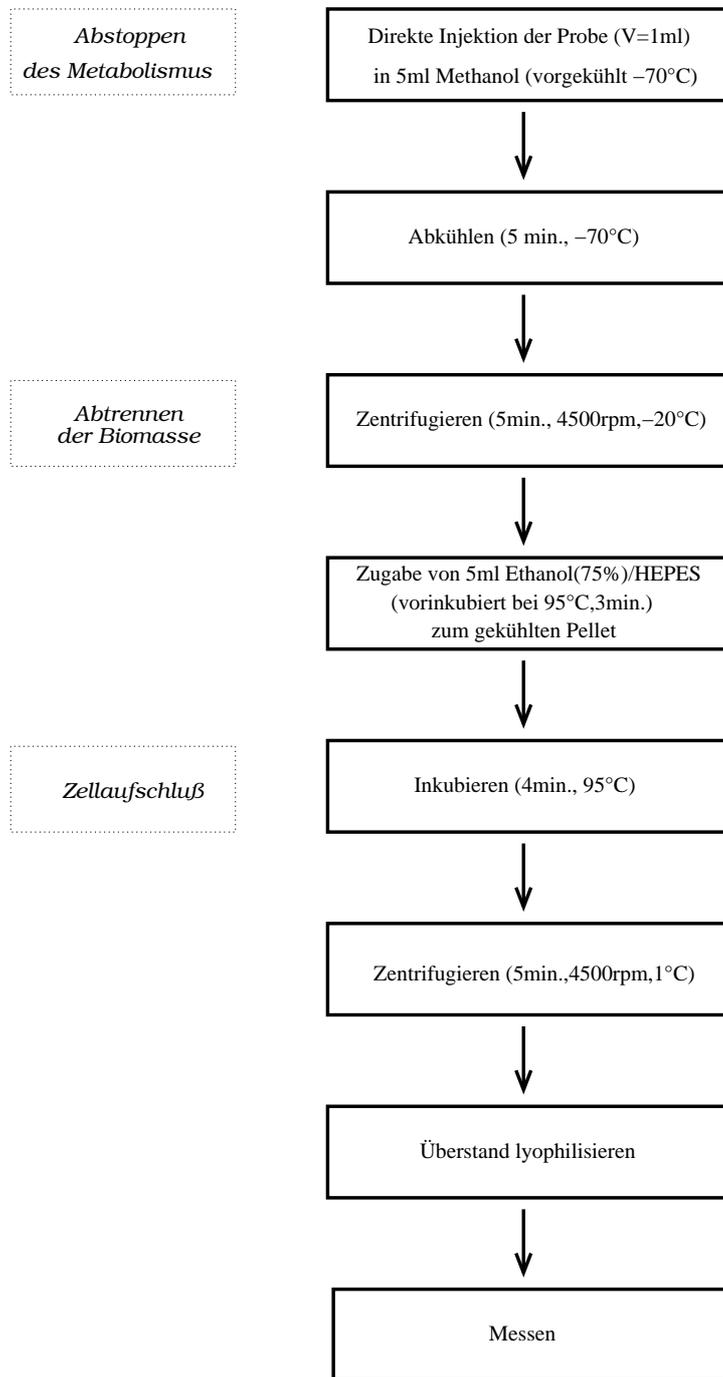
**Abbildung B.8:** Methode 8: Quenching in Methanol, zum Nachweis von Metaboliten im Überstand



**Abbildung B.9:** Methode 9: Direkte Injektion in konzentrierte Perchlorsäure, zur Bestimmung von Gesamtkonzentrationen



**Abbildung B.10:** Methode 10: Quenching in Methanol, Aufschluß mit Perchlorsäure, zur Bestimmung intra- und extrazellulärer Konzentrationen



**Abbildung B.11:** Methode 11: Quenching in Methanol, Aufschluß mit kochendem Ethanol/HEPES-Gemisch, zur Bestimmung intra- und extrazellulärer Konzentrationen

# Literaturverzeichnis

- [1] *Manual of methods for general bacteriology*. American Society of Microbiology, Washington D.C., 1981.
- [2] *DSM Catalogue of Strains 1993*. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, fifth edition, 1993.
- [3] J. Adler and W. Epstein. Phosphotransferase-system enzymes as chemoreceptors for certain sugars in *Escherichia coli* chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71:2895–99, 1974.
- [4] M. Akesson. *A Probing Strategy for Substrate Feeding in Escherichia coli Cultivation*. PhD thesis, University of Lund, 1998.
- [5] F. Allgoewer and A. Ilchmann. Process control applications of adaptive lambda-tracking. In *Proc. of the American Control Conference, Albuquerque*, pages 734–7, 1997.
- [6] P. Aulkemeyer, R. Ebner, G. Heilenmann, K. Jahreis, S. Wrieden, and J.W. Lengeler. Molecular analysis of two fructokinases involved in sucrose metabolism of enteric bacteria. *Mol. Microbiol.*, 5:2913–22, 1991.
- [7] J. Babul, D. Clifton, M. Kretschmer, and D.G. Fraenkel. Glucose metabolism in *Escherichia coli* and the effect of increased amount of Aldolase. *Biochem.*, 32:4685–92, 1993.
- [8] J. Bacher. *Clusteranalyse - Anwendungsorientierte Einführung*. R. Oldenbourg Verlag, München, Wien, 1996.
- [9] J. Bailey. Mathematical modelling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. *Biotech. Prog.*, 1998.
- [10] H.U. Bergmeyer. *Methoden der enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie Weinheim/Bergstr., 1974.

- [11] M.K. Berlyn. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 10: the traditional map. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62:814–984, 1998.
- [12] M. Bhattacharya, L. Fuhrman, A. Ingram, K. Nickerson, and T. Conway. Single-run separation and detection of multiple metabolic intermediates by anion-exchange high-performance liquid chromatography and application to cell pool extracts prepared from *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.*, 232:98–106, 1995.
- [13] D. Bray, R. Bourret, and M. Simon. Computer simulation of the phosphorylation cascade controlling bacterial chemotaxis. *Mol. Biol. Cell*, 4:469–82, 1993.
- [14] H. Bremer and P.P. Dennis. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, chapter Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. American Society for Microbiology, Washington D.C., 1987.
- [15] A. Buhr. The glucose transporter of *Escherichia coli*. *Biol. Chem.*, 269:23437–443, 1994.
- [16] A. Buhr and B. Erni. Membrane topology of the glucose transporter of *Escherichia coli*. *Biol. Chem.*, 268:11599–603, 1993.
- [17] D.L. Burns and H.K. Schachman. Assembly of the catalytic trimers of aspartate transcarbamoylase from folded monomers. *Biol. Chem.*, 257:8638–47, 1982.
- [18] F. Chauvin, L. Brand, and S. Roseman. Characterization of the *Escherichia coli* enzyme I monomer/dimer equilibrium by fluorescence anisotropy. *Biol. Chem.*, 269:20263–69, 1994.
- [19] F. Chauvin, L. Brand, and S. Roseman. Characterization of the *Escherichia coli* enzyme I monomer/dimer transition kinetics by fluorescence anisotropy. *Biol. Chem.*, 269:20270–74, 1994.
- [20] F. Chauvin, L. Brand, and S. Roseman. Enzyme I: the first protein and potential regulator of the bacterial phosphoenolpyruvate:glucosephosphotransferase system. *Microbiol.*, 146:471–479, 1996.
- [21] R. Chen, W.M.G.J. Yap, P.W. Postma, and J.E. Bailey. Comparative studies of *Escherichia coli* strains using different glucose uptake systems: Metabolism and energetics. *Biotech. Bioeng.*, 56:583–90, 1997.

- [22] T. Chen, V. Filkov, and S.S. Skiena. Identifying gene regulatory networks from experimental data. *Parallel computing*, 27:141–62, 2001.
- [23] H.K. Dannelly and S. Roseman. NAD<sup>+</sup> and NADH regulate an ATP-dependent kinase that phosphorylates enzyme I of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 89:11274–76, 1992.
- [24] H.K. Dannelly and S. Roseman. Active site phosphorylation of enzyme I of the bacterial phosphotransferase system by an ATP-dependent kinase. *Biol. Chem.*, 271:15285–91, 1996.
- [25] A. Death and T. Ferenci. Between feast and famine: endogenous inducer synthesis in the adaptation of *Escherichia coli* to growth with limiting carbohydrates. *Bac.*, 176:5101–07, 1994.
- [26] H.W. Doelle and N.W. Hollywood. Transitional steady-state investigations during aerobic-anaerobic transitin of glucose utilization by *Escherichia coli* K-12. *Biochem.*, 83:479–84, 1978.
- [27] M.M. Domach, S.K. Leung, R.E. Cahn, G.G. Cocks, and M.L. Shuler. Computer model for glucose-limited growth of a single cell of *Escherichia coli* B/r-A. *Biotech. Bioeng.*, 26:203–216, 1984.
- [28] M. Eberstadt, S. Golic Grdadolnik, G. Gemmecker, H. Kessler, A. Buhr, and B. Erni. Solution structure of the IIB domain of the glucose transporter of *Escherichia coli*. *Biochem.*, 35:11286–92, 1996.
- [29] M. Ederer. *Gliederung des zellulären Metabolismus in Funktionseinheiten mittels mathematischer Methoden*. Diplomarbeit, Universität Stuttgart, 2001.
- [30] W. Epstein, L. Rothman-Denes, and J. Hesse. Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate as mediator of catabolite repression in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72:2300–04, 1975.
- [31] B. Erni. Coupling of energy to glucose transport by the bacterial phosphotransferase system. In *Proc. of 6th Forum in Microbiol.*
- [32] B. Erni. Glucose-specific permease of the bacterial phosphotransferase system: Phosphorylation and oligomeric structure of the glucose-specific IIGLC-IIIIGLC complex of *Salmonella typhimurium*. *Biochem.*, 25:305–12, 1986.
- [33] B. Erni. Glucose transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.*, 63:13–24, 1989.

- [34] H. Faeh. *Biologie und Philosophie: Menschenbilder - Erkenntnisweisen - Weltbilder*. Metzlersche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 1984.
- [35] J.J. Falke, R.B. Bass, S.L. Butler, S.A. Chervitz, and M.A. Danielson. The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13:457–512, 1997.
- [36] T. Ferenci. Adaption to life at micromolar nutrient levels: the regulation of *Escherichia coli* glucose transport by endoinduction and cAMP. *FEMS Microbiol.*, 18:301–17, 1996.
- [37] D.G. Fraenkel. Genetics and intermediary metabolism. *Annu. Rev. Genet.*, 26:159–77, 1992.
- [38] G. Gemmecker, M. Eberstadt, A. Buhr, R. Lanz, S. Golic Grdadolnik, H. Kessler, and B. Erni. Glucose transporter of *Escherichia coli*: NMR characterization of the phosphocysteine form of the IIBGLC domain and its binding interface with the IIAGLC subunit. *Biochem.*, 36:7408–17, 1997.
- [39] B.K. Ghosh, K. Owens, R. Pietri, and A. Peterkofsky. Localization to the inner surface of the cytoplasmic membrane by immunoelectron microscopy of enzyme of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of *Escherichia coli*. *Biochem.*, 86:849–53, 1989.
- [40] E.D. Gilles. Regelung - Schlüssel zum Verständnis biologischer Systeme. *at- Automatisierungstechnik*, 1:7–17, 2002.
- [41] M. Ginkel, A. Kremling, T. Nutsch, R. Rehner, and E.D. Gilles. Modular modeling of cellular systems with ProMoT/Diva. *Bioinformatics*, 19:1169–1176, 2003.
- [42] M. Ginkel, A. Kremling, F. Tränkle, E. D. Gilles, and M. Zeitz. Application of the process modeling tool ProMoT to the modeling of metabolic networks. In *IMACS Symposium on Mathematical Modelling*, volume 2, pages 526–527, 2000.
- [43] E. Godehardt. *Graphs as structural models*, volume 4. Friedrich Vieweg Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig, Advances in System Analysis edition, 1988.
- [44] B. Goerke and B. Rak. Catabolite control of *Escherichia coli* regulatory protein BglG activity by antagonistically acting phosphorylations. *EMBO*, 18(12):3370–79, 1999.

- [45] B. Gonzales, J. Francois, and M. Renaud. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast*, 13:1347–55, 1997.
- [46] F.C. Grenier, J. Reizer, E.B. Waygood, and M.H. Saier. Evidence for covalently cross-linked dimers and trimers of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *Bac.*, 163:243–7, 1985.
- [47] B. Grünenfelder, G. Rummel, J. Vohradsky, D. Röder, H. Langen, and U. Jenal. Proteomics analysis of the bacterial cell cycle. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 98(8):4681–86, 2001.
- [48] H.-J. Gutmayer. *Regelung des Sauerstoffgehalts in Fermentationen mit Escherichia coli*. Diplomarbeit, Universität Stuttgart, 1999.
- [49] K.J. Hellingwerf, P.W. Postma, J. Tommassen, and H.V. Westerhoff. Signal transduction in bacteria: phospho-neural network(s) in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.*, 16:309–21, 1995.
- [50] B. Hogema. *Catabolite repression by non-PTS carbon sources in Escherichia coli. The role of cAMP/CRP and the phosphorylation state of enzyme IIAGlc of the phosphotransferase system*. PhD thesis, University of Amsterdam, 1998.
- [51] B. Hogema, J. Arents, R. Bader, K. Eijkemans, T. Inada, H. Aiba, and P. Postma. Inducer exclusion by glucose 6-phosphate in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 28:755–65, 1998.
- [52] B. Hogema, J. Arents, T. Inada, H. Aiba, K. van Dam, and P. Postma. Catabolite repression by glucose 6-phosphate, gluconate and lactose in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 24:857–67, 1997.
- [53] B.M. Hogema, J.C. Arents, R. Bader, K. Eijkemans, H. Yoshida, H. Takahashi, H. Aiba, and P.W. Postma. Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIAGlc. *Mol. Microbiol.*, 30:487–498, 1998.
- [54] B.M. Hogema, J.C. Arents, R. Bader, and P.W. Postma. Autoregulation of lactose uptake through the LacY permease by enzyme IIAGlc of the PTS in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.*, 31:1825–33, 1999.
- [55] H. Holms. Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.*, 19:85–116, 1996.

- [56] H. Hoving, J.S. Lolkema, and G.T. Robillard. *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: Equilibrium kinetics and mechanism of enzyme I phosphorylation. *Biochem.*, 20:87–93, 1981.
- [57] T. Inada, H. Takahashi, T. Mizuno, and H. Aiba. Down regulation of cAMP production by cAMP receptor protein in *Escherichia coli*: an assessment of the contribution of transcriptional and posttranscriptional control of adenylate cyclase. *Mol. Gen. Genet.*, 253:198–204, 1996.
- [58] H. Ishizuka, A. Hanamura, T. Kunimura, and H. Aiba. A lowered concentration of cAMP receptor protein caused by glucose is an important determinant for catabolite repression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 10:341–50, 1993.
- [59] E. G. Jablonski, L. Brand, and S. Roseman. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. preparation of a fluorescein derivative of the glucose-specific phosphocarrier protein IIIIGLC and its binding to the phosphocarrier protein HPr. *Biol. Chem.*, 258:9690–99, 1983.
- [60] K. Jahreis and J.W. Lengeler. Molecular analysis of two ScrR repressors and of a ScrR-FruR hybrid repressor for sucrose and D-fructose specific regulons from enteric bacteria. *Mol. Microbiol.*, 9:195–209, 1993.
- [61] W.H. Kampen. *Fermentation and biochemical engineering handbook*, chapter Nutritional requirements in fermentation processes. Noyes Publications, 1997.
- [62] B.N. Kholodenko, S. Schuster, J.M. Rohwer, M. Cascante, and H.V. Westerhoff. Composite control of cell function: metabolic pathways behaving as single control units. *FEBS*, 368:1–4, 1995.
- [63] K. Kimata, H. Takahashi, T. Inada, P. Postma, and H. Aiba. cAMP receptor protein-cAMP plays a crucial role in glucose-lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 94:12914–19, 1997.
- [64] H. Kitano. Perspectives on systems biology. *New Generation Computing*, 18(3):199–216, 2000.
- [65] W. Koning and K. van Dam. A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Anal. Biochem.*, 204:118–23, 1992.

- [66] R. und G.G. Hammes Korn. A kinetic study of protein-protein interactions. *Biochem.*, 15:1165–71, 1976.
- [67] K. Korgaonkar and S. Ranade. Evaluation of acridin orange fluorescence test in viability studies on *Escherichia coli*. *Microbiol.*, 12:185–90, 1965.
- [68] H.L. Kornberg, F.R.S., and P.J.F.Henderson, editors. *Microbial membrane transport systems*, volume 326, London, 1990. Phil.Trans. R. Soc.
- [69] G. Kraus. *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion; Das moderne Lehrbuch für Chemiker, Biochemiker, Biologen und Mediziner*. Wiley-VCH Verlag, 1997.
- [70] A. Kremling. *Strukturierung zellulärer Funktionseinheiten - ein signalorientierter Modellierungsansatz für zelluläre Systeme am Beispiel von Escherichia coli*. Dissertation, Universität Stuttgart, 2002.
- [71] A. Kremling, K. Bettenbrock, B. Laube, K. Jahreis, J.W. Lengeler, and E.D. Gilles. The organization of metabolic reaction networks. III. Application for diauxic growth on glucose and lactose. *Metabolic Eng.*, 3:362–79, 2001.
- [72] A. Kremling, K. Jahreis, E.D. Gilles, and J.W. Lengeler. Modulare Strukturierung und Modellierung von Signaltransduktionssystemen. In *Proc. Vortrags- und Diskussionstagung: Verfahrenstechnische Grundlagen und Modellierung von Bioprozessen, GVC-DECHEMA*, 1997.
- [73] A. Kremling, K. Jahreis, J.W. Lengeler, and E.D. Gilles. The organisation of metabolic reaction networks: A signal-oriented approach to cellular models. *Metabol. Eng.*, 2:190–200, 2000.
- [74] A. Kremling, T. Sauter, E. Bullinger, M. Ederer, F. Allgöwer, and E.D. Gilles. Biosystems engineering: Applying methods from systems theory to biological systems. In *Proceedings of the 2nd International Conference on Systems Biology, 4.-7.11.2001, Pasadena*, 2001.
- [75] J. Kreth. *Untersuchungen zum Einfluss des Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat Verhältnisses auf den Kohlenstoff-Katabolismus von Enterobakterien*. Dissertation, Universität Osnabrück, 2002.
- [76] J. Kreth, E.D. Gilles, and J.W. Lengeler. Analysis of the importance of the PEP to pyruvate ratio in the control of carbon catabolism in enteric bacteria. In *Proceedings of the 4th intern. Congress on Biochem. Engineering, Stuttgart*, pages 261–81, 2000.

- [77] W. Kundig, S. Gosh, and S. Roseman. Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phospho-transferase system. *PNAS*, 52:1067–74, 1964.
- [78] V.J. Lang, C. Leystra-Lantz, and R.A. Cook. Characterization of the specific pyruvate transport system in *Escherichia coli K-12*. *Bac.*, 169:380–85, 1987.
- [79] E. Laszlo. *Systemtheorie als Weltanschauung: eine ganzheitliche Vision für unsere Zeit*. Diederichs, München, 1998.
- [80] J. Lengeler. Metabolic networks: a signal-oriented approach to cellular models. *Biol. Chem.*, 381:911–920, 2000.
- [81] J.W. Lengeler. Carbohydrate transport in bacteria under environmental conditions, a black box? *Antonie van Leeuwenhoek*, 63:275–88, 1993.
- [82] J.W. Lengeler. *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli*, chapter The phosphoenolpyruvate-dependent carbohydrate phosphotransferase system (PTS) and control of carbon source utilisation. R.G. Landes Co., 1995.
- [83] J.W. Lengeler. Die biologische Zelle als komplexes Informationssystem. *Biologen in unserer Zeit*, 426:65–7, 1996.
- [84] J.W. Lengeler, E.D. Gilles, K. Jahreis, and A. Kremling. Signal transduction systems and their coupling to regulatory networks. In *Proceedings of the 4th intern. Congress on Biochem. Engineering, Stuttgart, Germany*, 2000.
- [85] J.W. Lengeler, K. Jahreis, and U.F. Wehmeier. Enzymes II of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems: their structure and function in carbohydrate transport. *Biochem. Biophys. Acta*, 1188:1–28, 1994.
- [86] J.W. Lengeler and K. Jahreis. *Handbook of Biological Physics*, volume 2, chapter Phosphotransferase Systems or PTSs as Carbohydrate Transport and as Signal Transduction Systems. Elsevier Science B.V., 1996.
- [87] J.W. Lengeler, H.G. Schlegel, and G. Drews, editors. *Biology of the Prokaryotes*. Thieme Verlag, Stuttgart, Blackwell Science Inc., Oxford, 1999.
- [88] J.C. Liao, S.-Y. Hou, and Y.-P. Chao. Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism. *Biotech. Bioeng.*, 52:129–140, 1990.

- [89] C. LiCalsi, T.S. Crocenzi, E. Freire, and S. Roseman. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system - structural and thermodynamic domains of enzyme i of *Salmonella typhimurium*. *Biol. Chem.*, 266:19519–27, 1991.
- [90] J.K. Liu, M.W. Lu, L.T. Yang, and C.S. Lin. Expression of polyphosphate kinase inhibits the glucose uptake in *Escherichia coli*. In *Proceeding of the National Science Council*, volume 20, pages 110–16, 1996.
- [91] D. Lohr. *Untersuchungen zum Wachstum und zur Nikkomycinbildung des Bakteriums Streptomyces tendae Tü 901/8c im Hinblick auf eine mathematische Modellbildung*. PhD thesis, Universität Stuttgart, 1989.
- [92] J.S. Lolkema, D.S. Dijkstra, and G.T. Robillard. Mechanics of solute translocation catalyzed by Enzyme II<sub>mtl</sub> of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 31:5514–21, 1992.
- [93] O. Lowry, J. Carter, J. Ward, and L. Glaser. The effect of carbon and nitrogen sources on the level of metabolic intermediates in *Escherichia coli*. *Biol. Chem.*, 246:6511–21, 1971.
- [94] N. Luhmann. *Soziale Systeme. Grundriß einer allgemeinen Theorie*. Frankfurt a.M., 1993.
- [95] A. Lundin and A. Thore. Comparison of methods for extraction of bacterial adenine nucleotides determined by firefly assay. *Microbiol.*, 30:713–21, 1975.
- [96] Luria. *The bacteria Vol.1*, pages 1–34. Acad. Press, New York, 1960.
- [97] R. Lux, K. Jahreis, K. Bettenbrock, J. Parkinson, and J. Lengeler. Coupling the phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein-dependent chemotaxis signaling pathways of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 92:11583–11587, 1995.
- [98] R. Lux, V. Munasinghe, F. Castellano, J. Lengeler, J. Corrie, and S. Khan. Elucidation of a PTS-carbohydrate chemotactic signal pathway in *Escherichia coli* using a time-resolved behavioral assay. *Mol. Biol. Cell*, 10:1133–1146, 1999.
- [99] C. Majer. *Erweiterung einer Simulationsumgebung für verfahrenstechnische Prozesse zur Parameterschätzung, Versuchsplanung und Trajektorienoptimierung*. PhD thesis, Universität Stuttgart, 1996.

- [100] Q. Mao, T. Schunk, B. Gerber, and B. Erni. A string of enzymes, purification and characterization of a fusion protein comprising the four subunits of the glucose phosphotransferase system of *Escherichia coli*. *Biol. Chem.*, 270:18295–300, 1995.
- [101] A.G. Marr. Growth rate of *Escherichia coli*. *Microbiol.*, 55:316–33, 1991.
- [102] A. Matin and M.K. Matin. Cellular levels, excretion, and synthesis rates of cyclic AMP in *Escherichia coli* grown in continuous culture. *Bac.*, 149:801–7, 1982.
- [103] R.L. Mattoo and E.B. Waygood. Determination of the levels of HPr and enzyme I of the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Biochem. Cell Biol.*, 61:29–37, 1983.
- [104] H.R. Maturana and F.J. Valera. *Der Baum der Erkenntnis*. Goldmann Verlag, 1991.
- [105] M. Meins, B. Zanolari, J.P. Rosenbusch, and B. Erni. Glucose permease of *Escherichia coli*. purification of the IIGLC subunit and functional characterization of its oligomeric forms. *Biol. Chem.*, 263:12986–93, 1988.
- [106] G. Meissner. *Untersuchungen zum Sorptionsverhalten von Schwermetallen an Klärschlämmen unter Einfluß der chelatisierenden Komplexbildner EDTA und NTA*. PhD thesis, Universität Marburg, 1992.
- [107] O. Misset, M. Blaauw, P. W. Postma, and G. T. Robillard. Bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. mechanism of the transmembrane sugar translocation and phosphorylation. *Biochem.*, 22:6163–70, 1983.
- [108] O. Misset and G.T. Robillard. *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: Mechanism of phosphoryl-group transfer from phosphoenolpyruvate to HPr. *Biochem.*, 21:3136–42, 1982.
- [109] W.J. Mitchel, D.W. Saffen, and S. Roseman. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system; *in vivo* regulation of lactose transport in *Escherichia coli* by IIGLC, a protein of the phosphoenolpyruvate: Glycose phosphotransferase system. *Biol. Chem.*, 262:16254–60, 1987.
- [110] M. Morohashi and H. Kitano. Identifying gene regulatory networks from time series expression data by *in silico* sampling and screening. In *Proceedings of the 5th European Conference on Artificial Life, Lausanne, Switzerland*, pages 477–86. Springer, 1999.

- [111] V. Moses and P. Sharp. Intermediary metabolite levels in *Escherichia coli*. *General Microbiol.*, 71:181–90, 1972.
- [112] Meadow N.D., D.K. Fox, and S. Roseman. The bacterial phosphoenolpyruvate: glycolate phosphotransferase system. *Annu. Rev. Biochem.*, 59:497–542, 1990.
- [113] F.C. Neidhardt, editor. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. ASM Press, 1996.
- [114] F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, and M. Schaechter. *Physiology of the bacterial cell: a molecular approach*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1990.
- [115] J. Nielsen and J. Villadsen. *Bioreaction Engineering Principles*. Plenum Press, New York and London, 1994.
- [116] L. Notley-McRobb, A. Death, and T. Ferenci. The relationship between external glucose concentration and cAMP level inside *Escherichia coli*: implications for models of phosphotransferase-mediated regulation of adenylate cyclase. *Microbiol.*, 143:1909–18, 1997.
- [117] L. Notley-McRobb and T. Ferenci. Between feast and famine: Endogenous inducer synthesis in the adaptation of *Escherichia coli* to growth with limiting carbohydrates. *Bac.*, 176:5101–07, 1994.
- [118] M. Oh and J. C. Liao. Gene expression profiling by DNA microarrays and metabolic fluxes in *Escherichia coli*. *Biotech. Prog.*, 16:278–86, 2000.
- [119] J.S. Parkinson. Signal transduction schemes of bacteria. *Cell*, 73:857–71, 1993.
- [120] J. Plumbridge. Regulation of gene expression in the PTS in *Escherichia coli*: the role and interactions of Mlc. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5:187–93, 2002.
- [121] B. Porr. Die Systemtheorie Niklas Luhmanns aus der Sicht der Naturwissenschaften und ihre Anwendung in der Kommunikationswissenschaft. Master's thesis, Ruhr-Universität Bochum, 1993.
- [122] P. Postma, J.W. Lengeler, and G.R. Jacobsen. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, chapter Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase Systems. ASM Press, Massachusetts, 1996.

- [123] N. Prasad. Simulation studies on chemotaxis and phosphotransferase system (PTS) of *Escherichia coli*. Master's thesis, Universität Stuttgart, 2001.
- [124] C.S. Raman, R. Jemmerson, B.T. Nall, and M.J. Allen. Diffusion-limited rates for monoclonal antibody binding to cytochrome c. *Biochem.*, 31:10370–79, 1992.
- [125] P. Reddy, N. Meadows, S. Roseman, and A. Peterkofsky. Reconstitution of regulatory properties of adenylate cyclase in *Escherichia coli* extracts. *PNAS*, 82:8300–4, 1985.
- [126] J.E. Reich and E.E. Sel'kov. *Energy metabolism of the cell: a theoretical treatise*. Academic Press, London, 1981.
- [127] A. Rettinger. Parameteroptimierung mittels Evolutionsstrategie. Master's thesis, Universität Stuttgart, 1995.
- [128] D. Riesenberg, V. Schulz, W.A. Knorre, H.-D. Pohl, D. Korz, E.A. Sanders, A. Roß, and W.-D. Deckwer. High cell density of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *Biotech.*, 20:17–28, 1991.
- [129] G.T. Robillard and W.N. Konings. Physical mechanism for regulation of phosphoenolpyruvate-dependent glucose transport activity in *Escherichia coli*. *Biochem.*, 20:5025–32, 1981.
- [130] G.T. Robillard and J.S. Lolkema. Enzymes II of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar transport system: a review of their structure and mechanism of sugar transport. *Biochem. Biophys. Acta*, 947:493–519, 1988.
- [131] J.M. Rohwer. *Interaction of functional units in metabolism. Control and regulation of the bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system*. PhD thesis, University of Amsterdam, 1997.
- [132] J.M. Rohwer, N.D. Meadows, S. Roseman, H.V. Westerhoff, and P.W. Postma. Understanding glucose transport by the bacterial phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system on the basis of kinetic measurements *in vitro*. *Biochem.*, 45:34909–21, 2000.
- [133] J.M. Rohwer, S. Schuster, and H.V. Westerhoff. How to recognize monofunctional units in a metabolic system. *J. Theor. Biol.*, 179:213–28, 1996.
- [134] G. Ruijter and J. Visser. Determination of intermediary metabolites in *Aspergillus niger*. *Microbiol.*, 25:295–302, 1996.

- [135] M. Saez and R. Lagunas. Determination of intermediary metabolites in yeast. critical examination of the effect of sampling conditions and recommendations for obtaining true level. *Mol. Cell. Biochem.*, 13:73–78, 1976.
- [136] M.H. Saier and A.M. Chin. *The Bacteria, Vol. III: Bacterial energetics*, chapter Energetics of the bacterial Phosphotransferase System in Sugar Transport and the Regulation of Carbon Metabolism. Academic, New York, 1990.
- [137] M.H. Saier and J. Reizer. The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. *Mol. Microbiol.*, 13:755–64, 1994.
- [138] U. Sauer, D.R. Lasko, J. Fiaux, M. Hochuli, R. Glaser, T. Szyperski, K. Wuethrich, and J.E. Bailey. Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of *Escherichia coli* central carbon metabolism. *Bac.*, 181:6679–88, 1999.
- [139] T. Sauter. Reaktionskinetische Untersuchungen zum Glucosetransport in *Escherichia coli*. Master's thesis, Institut fuer Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, 1997.
- [140] M. Schaechter. *Encyclopedia of Microbiology, Volume 2 D-L*, chapter *Escherichia coli*. General Biology. Academic Press, San Diego, New York, 1992.
- [141] C.H. Schilling, S. Schuster, B.O. Palsson, and R. Heinrich. Metabolic pathway analysis: basic concepts and scientific applications in the post-genomic era. *Biotech.*, 15:296–303, 1999.
- [142] K. Schmid, R. Ebner, J. Altenbuchner, R. Schmitt, and J.W. Lengeler. Plasmid-mediated sucrose metabolism in *Escherichia coli* K12: mapping of the scr genes of pUR400. *Mol. Microbiol.*, 2:1–8, 1988.
- [143] K. Schmid, M. Schupfner, and R. Schmitt. Plasmid-mediated uptake and metabolism of sucrose by *Escherichia coli* K-12. *Bac.*, 151:68–76, 1982.
- [144] B.J. Scholte, A.R.J. Schuitema, and P.W. Postma. Isolation of IIIGlc of the phosphoenolpyruvate-dependent glucose phosphotransferase system of *Salmonella typhimurium*. *Bac.*, 148:257–64, 1981.
- [145] G. Schwarzenbach and H. Flaschka. *Die komplexometrische Titration*. Enke, Stuttgart, 1965.

- [146] U. Schäfer. *Automatisierte Probenahme zur Messung intrazellulärer Metabolitdynamiken*. PhD thesis, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, 1999.
- [147] I.H. Segel. *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme system*. Wiley, New York, 1975.
- [148] S.S. Shen-Orr, R. Milo, S. Mangan, and U. Alon. Network motifs in the transcriptional regulation network of *Escherichia coli*. *Nature Genetics*, 31:64–68, 2002.
- [149] J. Shu and M.L. Shuler. A mathematical model for the growth of a single cell of *E. coli* on a glucose/glutamine/ammonium medium. *Biotech. Bioeng.*, 33:1117–26, 1989.
- [150] F. Southwick, H. Carr, G. Carden, R. D’Alisa, and H. Rosenkranz. Effects of acridin orange on the growth of *Escherichia coli*. *Bac.*, 110:439–41, 1972.
- [151] H.C. Ip Stephen, M.L. Johnson, and G.K. Ackers. Kinetics of deoxyhemoglobin subunit dissociation determined by haptoglobin binding: Estimation of the equilibrium constant from forward and reverse rates. *Biochem.*, 15:654–60, 1976.
- [152] H. Takahashi, T. Inada, P. Postma, and H. Aiba. CRP down-regulates adenylate cyclase activity by reducing the level of phosphorylated IIAGlc, the glucose-specific phosphotransferase protein, in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 259:317–26, 1998.
- [153] U. Theobald. Untersuchungen zur Dynamik des Crabtree-Effektes. Technical report, Fortschritt-Berichte VDI Reihe 17 Nr. 129, VDI-Verlag, Düsseldorf, 1995.
- [154] J. Thompson and D. Torchia. Use of <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy and <sup>14</sup>C fluorography in studies of glycolysis and regulation of pyruvate kinase in *Streptococcus lactis*. *J. Bac.*, 158:791–800, 1984.
- [155] F. Tränkle. *Rechnergestützte Modellierung verfahrenstechnischer Prozesse für die Simulationsumgebung DIVA*. Fortschritt-Berichte VDI Reihe 20 Nr. 309, Dissertation, Universität Stuttgart, 2000.
- [156] B.G. Turner, D. Ramkrishna, and N.B. Jansen. Cybernetic modeling of bacterial cultures at low growth rates: Mixed substrate systems. *Biotech. Bioeng.*, 32:46–54, 1988.

- [157] J.J. Vallino and G. Stephanopoulos. Carbon flux distributions at the glucose 6-phosphate branch point in *Corynebacterium glutamicum* during lysine overproduction. *Biotech. Prog.*, 10:327–34, 1994.
- [158] J.J. Vallino and G. Stephanopoulos. Carbon flux distributions at the pyruvate branch point in *Corynebacterium glutamicum* during lysine overproduction. *Biotech. Prog.*, 10:320–26, 1994.
- [159] J. van der Vlag, R. van der Hof, K. van der Dam, and P.W. Postma. Control of glucose metabolism by the enzymes of the glucose phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium*. *Biochem.*, 230:170–82, 1995.
- [160] U. Waeber, A. Buhr, T. Schunk, and B. Erni. The glucose transporter of *Escherichia coli*. Purification and characterization by Ni<sup>+</sup> chelate affinity chromatography of the IIBC GLC subunit. *FEBS*, 324:109–12, 1993.
- [161] J. Wang. *A Systematic Modeling Approach for Cellular Systems and its Application on Transport and Catabolism of Four Carbohydrates in Escherichia coli*. PhD thesis, Universität Stuttgart, 2001.
- [162] J. Wang, E.D. Gilles, J.W. Lengeler, and K. Jahreis. Modeling of inducer exclusion and catabolite repression based on a PTS-dependent sucrose and non-PTS-dependent glycerol transport systems in *Escherichia coli* K-12 and its experimental verification. *J. Biotech.*, 92:133–58, 2001.
- [163] E.B. Waygood. Enzyme I of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system has two sites of phosphorylation per dimer. *Biochem.*, 25:4085–90, 1986.
- [164] E.B. Waygood, N.D. Meadow, and S. Roseman. Modified assay procedures for the phosphotransferase system in enteric bacteria. *Anal. Biochem.*, pages 293–304, 1979.
- [165] E.B. Waygood and T. Steeves. Enzyme I of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of *Escherichia coli*: Purification to homogeneity and some properties. *Biochem.*, 58:40–48, 1980.
- [166] N. Weigel, A. Kukuruzinska, A. Nakazawa, E.B. waygood, and S. Roseman. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system: Phosphoryl transfer reactions catalyzed by enzyme I of *Salmonella typhimurium*. *Biol. Chem.*, 257:14477–91, 1982.
- [167] W. Wiechert. Modeling and simulation: tools for metabolic engineering. *Journal of Biotechnology*, 94:37–63, 2002.

- [168] H. Winkler and T. Wilson. The role of energy coupling in the transport of  $\beta$ -galactosides by *Escherichia coli*. *Biol. Chem.*, 241:2200–11, 1966.
- [169] Y.-T. Yang, K.-Y. San, and G.N. Bennett. Redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli* deficient in the acetate production and expressing the *Bacillus subtilis* acetolactate synthase. *Metabolic Eng.*, 1:26–34, 1999.
- [170] W.M.G.J. Yap. *Enzyme IICBGLC of the phosphoenolpyruvate: glucose phosphotransferase system in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. The role of wild type and uncoupled enzyme IICBGLC in glucose metabolism: qualitative and quantitative aspects*. PhD thesis, University of Amsterdam, 1996.
- [171] L. You and J. Yin. Patterns of regulation from mRNA and protein time series. *Met. Eng.*, 2:210–17, 2000.
- [172] T. Zeppenfeld, C. Larisch, J.W. Lengeler, and K. Jahreis. Glucose transporter mutants of *Escherichia coli* K-12 with changes in substrate recognition of the IICBGlc and induction behavior of the *ptsG* gene. *J. Bac.*, 182:4443–52, 2000.
- [173] R. Zimmer. *Philosophie: Von der Aufklärung bis heute*. Cornelsen Scriptor, Berlin, 2001.
- [174] N. Zwaig, W. Kistler, and E. Lin. Glycerol kinase, the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*. *Bac.*, 103:753–59, 1970.

## LEBENS LAUF

Name: Thomas Sauter  
Geburtsdatum: 13. November 1971  
Geburtsort: Babenhausen/Schwaben  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung:

1978-1982 Grundschule Babenhausen  
1982-1991 Simpert-Kraemer-Gymnasium Krumbach

### Grundwehrdienst:

1991-1992 Flugabfertiger in Memmingen

### Studium:

1992-1997 Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart  
1997 Diplomarbeit am Institut für Bioverfahrenstechnik  
der Universität Stuttgart bei Prof. Reuss

### Beruf:

1998-2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Systemdynamik  
und Regelungstechnik der Universität Stuttgart  
und am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer  
technischer Systeme Magdeburg bei Prof. Gilles

2003 Promotion Dr.-Ing.

7-11/2003 Post-Doc Aufenthalt Th. Jefferson University, Philadelphia, USA

Seit 2003: Gruppenleiter am Institut für Systemdynamik und  
Regelungstechnik, Forschungstätigkeit im Bereich Systembiologie