

**Strukturierung zellulärer Funktionseinheiten
– ein signalorientierter Modellierungsansatz
für zelluläre Systeme am Beispiel von
*Escherichia coli***

Von der Fakultät Verfahrenstechnik und Technische Kybernetik der Universität
Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der Ingenieurwissenschaften
(Dr. Ing.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Dipl.-Ing. Andreas Kremling

aus Lahr/Schwarzwald

Hauptberichter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. E. D. Gilles

Mitberichter: Prof. Dr. U. Reichl

Tag der mündlichen Prüfung: 30. November 2001

Forschungsberichte aus dem Max-Planck-Institut
für Dynamik komplexer technischer Systeme

Band 5

Andreas Kremling

**Strukturierung zellulärer Funktionseinheiten
- ein signalorientierter Modellierungsansatz
für zelluläre Systeme am Beispiel
von *Escherichia coli***

D 93 (Diss. Universität Stuttgart)

Shaker Verlag
Aachen 2002

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Kremling, Andreas:

Strukturierung zellulärer Funktionseinheiten - ein signalorientierter
Modellierungsansatz für zelluläre Systeme am Beispiel von
Escherichia coli / Andreas Kremling.

Aachen : Shaker, 2002

(Forschungsberichte aus dem Max-Planck-Institut für
Dynamik komplexer technischer Systeme ; Bd. 5)

Zugl.: Stuttgart, Univ., Diss., 2001

ISBN 3-8265-9888-1

Copyright Shaker Verlag 2002

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen
oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungs-
anlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8265-9888-1

ISSN 1439-4804

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

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. U. Reichl danke ich für die Übernahme des Mitberichtes. Besonderer Dank ergeht an alle Kollegen aus Stuttgart und Magdeburg für die stete Diskussionsbereitschaft sowie das angenehme Arbeitsklima. Für die Vermittlung detaillierten biologischen Wissens danke ich recht herzlich Prof. Dr. J. W. Lengeler und Dr. K. Jahreis; bei der Implementierung der Modellbausteine in das Rechnerwerkzeug konnte ich von vielen Anregungen von Dr. C. May profitieren.

Magdeburg, im Dezember 2001

Andreas Kremling

Why Make Models?
Organizing Disparate Information into a Coherent Whole.

Why Make Models?
To Think (and Calculate) Logically about What
Components and Interactions Are Important in a
Complex System.

Why Make Models?
To Discover New Strategies.

Why Make Models?
To Make Important Corrections in the Conventional
Wisdom.

Why Make Models?
To Understand the Essential, Qualitative Features.

J. E. Bailey, 1998

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung und Übersicht	1
2	Modellierungskonzept	4
2.1	Modellierung zellulärer Systeme	6
3	Definition elementarer Modellbausteine	11
3.1	Stoffspeicher	11
3.1.1	Ein Ansatz für die spezifische Wachstumsrate μ	15
3.2	Stoffwandler für enzymkatalysierte Reaktionen	17
3.3	Gesteuerte Polymerisationsprozesse	18
3.4	Signalwandler – Modellbausteine der Signaltransduktion	19
3.4.1	Modellbaustein Koordinator	20
3.4.2	Steuereinheit zur Ansteuerung von Stoffwandlern	22
3.4.3	Steuereinheit zur Ansteuerung des Modellbausteins Polymerisator	27
3.4.4	Synthese von Alarmonen durch einen enzymatischen Schritt	40
4	Definition aggregierter Modellbausteine	42
4.1	Modellbausteine zur Beschreibung der Genexpression	44
4.1.1	Modellbaustein Expressor	45
4.2	Stoffwechselweg	48

4.2.1	Aufbau eines Stoffwechselwegs	48
4.3	Stoffwechselblock	50
4.3.1	Eine Methode zur mathematischen Beschreibung hierarchisch aufgebauter Funktionseinheiten	53
5	Umsetzung des Modellierungskonzeptes in ein Modellierungswerkzeug	58
5.1	Die Modellbeschreibungssprache EULER	58
5.2	Implementierung der Modellbausteine in CELLMOD	59
5.2.1	Stoffspeicher	59
5.2.2	Stoffwandler	63
5.2.3	Signalwandler	64
5.3	Die graphische Bedienoberfläche von CELLMOD	65
6	Modell der Kataboliten-Repression	67
6.1	Grundmodell	68
6.1.1	Stoffwechselweg Glucose Transport/spezifischer Abbau . .	68
6.1.2	Stoffwechselweg zentraler Kohlenhydratabbau/Abflüsse Monomersynthese	69
6.1.3	Stoffwechselblock <i>crp</i> Modulon	70
6.2	Verschaltung der Modellbausteine	77
6.2.1	Parametrisierung der Modellbausteine	79
6.2.2	Simulationsstudien	79
6.3	Modellerweiterung: Phosphorylierung intrazellulärer Glucose . . .	83
6.4	Modellerweiterung: Komplexierung <i>LacY</i> mit <i>EIIA</i>	86
6.5	Modellerweiterung: Regulation der Synthese von <i>EIICB</i>	89
6.5.1	Aktivierung der Synthese durch <i>cAMP.Crp</i>	89
6.5.2	Induktion von <i>EIICB</i> durch Glucose	91
6.6	Zusammenfassung	96

7	Simulationsstudien genetisch veränderter Organismen – die KIMATA-Stämme	97
7.1	Die L8UV5-Mutation – der Referenzstamm	98
7.1.1	Zugabe des Induktors IPTG ins Medium	100
7.2	Die <i>crp</i> Mutante	101
7.3	Die <i>crp</i> Mutante mit dem Plasmid pth111	101
7.4	Weitere Stammkonstruktionen	103
7.4.1	Expression von <i>LacY</i>	103
7.4.2	Die <i>crp</i> Mutante mit dem Plasmid pha7	104
7.5	Zusammenfassung	104
8	Schlußbemerkung	106
9	Zusammenfassung	108
A	Modellreduktionsverfahren für Reaktionssysteme: Quasistationarität – Schnelles Gleichgewicht	112
A.1	Beispielsystem	113
A.2	Modellreduktion	114
B	Das Verfahren der stationären Stoffflußanalyse	117
B.1	Theoretische Grundlagen	117
B.2	Experimentelle Ergebnisse	121
C	Zusammenstellung der Modellparameter	123
C.1	Parameter des Modells in Kapitel 7	123
C.2	Parameter des Modells in Kapitel 8	127

Nomenklatur

1. Formelzeichen

Formelzeichen	Bezeichnung	Einheit
A,B,C,M	Metabolit, Stoffspeicher	
n	Molenzahl, Anzahl	[mol], [-]
C	Synthesezeit der DNA	[h]
D	Zeit nach Synthese bis zur Zellteilung	[h]
μ	spezifische Wachstumsrate	[1/h]
x	Position eines Genes auf der Genkarte	[-]
r	Reaktionsrate	[mol/g TM h]
k	Geschwindigkeitskonstante	[1/h]
c	Konzentration (intra-, extrazellulär)	[mol/g TM], [mol/l]
K	Gleichgewichtskonstante	[-], [mol/g TM]
J, J_a	Molenstrom	[mol/h]
P	Quellterm	[mol/h]
m	Biomasse	[g/l]
Y	Ausbeutekoeffizient	[g TM/mol], [g TM/g]
l	Länge eines Gens	[bp]
v	Geschwindigkeit der Polymerase	[bp/h]
d	Abstand zweier Polymerasen auf einem Genabschnitt	[bp]
ψ	Anteil mit Protein belegter Kontrollsequenzen an der Gesamtanzahl DNA	[-]
Γ	stöchiometrische Matrix	
γ	stöchiometrischer Koeffizient	
α, β	Kooperativitätsfaktoren	[-]
q	Zu-/Ablaufrate, Gasgeschwindigkeit	[l/h]
Mg	Molmasse	[g/mol]
Mv	Molvolumen	[mol/l]

2. Abkürzungen

- Die Bezeichnung der Gene erfolgt im Drei-Buchstaben-Kode. Ein Protein/Enzym welches bspw. durch das Gen *lacZ* kodiert wird, trägt dann die Bezeichnung *LacZ*.
- Abkürzungen für Metabolite sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Abk.	Name	Abk.	Name
Glc	Glucose	Gal	Galactose
Lac	Lactose	Allo	Allolactose
Mtl	Mannitol	Gly	Glycerin
Ara	Arabinose		
Glc1P	Glucose-1-phosphat	Glc6P	Glucose-6-phosphat
Fru6P	Fructose-6-phosphat	FBP	Fructose-1,6-bisphosphat
TrioseP	Triosephosphat	3PG	3-Phosphoglycerat
PEP	Phosphoenolpyruvat	Prv	Pyruvat
Gly3P	Glycerin-3-phosphat		
Cit	Citrat	ICit	Isocitrat
α KG	α Ketoglutarat	SCoA	SuccinatCoA
Fum	Fumarat	Mal	Malat
OA	Oxalacetat	R5P	Ribose-5-phosphat
E4P	Erythrose-4-phosphat		
Ile	Isoleucin	Ala	Alanin
Glu	Glutamat	Asp	Asparagin
Trp	Tryptophan	Thr	Threonin
cAMP	Zyklisches 3',5' Adenosin-monophosphat	Cya	Adenylatcyclase
Crp	cAMP receptor protein		
EI	Enzym I des PTS	EII	Enzym II des PTS
HPr	Hitzestabiles Protein		
TCA	Zitronensäurezyklus	PPW	Pentosephosphatweg

Kapitel 1

Einführung und Übersicht

Die Herstellung von biotechnologischen Produkten hat in den letzten Jahren einen starken Aufschwung genommen. Dies betrifft vor allem neue Wirkstoffe in der Pharmazie, deren Herstellung ohne den Einsatz von Mikroorganismen kaum mehr denkbar erscheint. Hat man sich noch vor einigen Jahren auf die Optimierung der Reaktorsysteme konzentriert, um eine höhere Produktivität zu erreichen, so tritt heute mehr und mehr das biologische System in den Vordergrund. Dies liegt vor allem an den jetzt verfügbaren Möglichkeiten der DNA Rekombinationstechnik, die es erlaubt, das Genom eines Organismus so zu verändern, dass bestimmte Stoffe gebildet werden. So spricht man heute von einem Übergang der klassischen in die molekulare Biotechnologie [18].

Zelluläre Systeme sind durch komplexe Reaktionsnetzwerke gekennzeichnet. Das bedeutet, dass eine große Anzahl von Elementen miteinander in Wechselwirkung stehen und damit die Analyse des Verhaltens nur schwer durchführbar ist. Betrachtet man die Herstellung von Sekundärmetaboliten, zu denen bspw. Antibiotika zählen, so ist heute nicht ganz verstanden, warum Zellen diese Stoffe überhaupt herstellen. Die biologische Phase ist daher oft als ungeordnete Ansammlung von Metaboliten betrachtet worden, als “bags full of enzymes” [40]. Aus diesem Grund hat man sich in biologischen Untersuchungen fast immer auf einzelne Aspekte im Stoffwechsel konzentriert und sich weniger für das Gesamtverhalten interessiert. Heute zeigen Ergebnisse molekularbiologischer Untersuchungen jedoch, dass Organismen als informationsverarbeitende Systeme zu sehen sind, die durch sensitive und leistungsstarke Regulationsmechanismen schnell und flexibel auf neue Umweltsituationen reagieren können [39, 53]. Dies kann aber nur erfolgen, wenn Prozesse, die in einer Zelle gleichzeitig ablaufen, miteinander koordiniert werden. Aktuelle Untersuchungen beschäftigen sich daher mit “übergeordneten” Regulationsprinzipien, die die Koordination der Zellantwort auf mehrere Reize betreffen. Diese Untersuchungen sind in der Biologie allerdings auf qualitative Aspekte konzentriert und von beschreibender Natur. Um das Zusammenwirken

von Regulationsvorgängen mit Stoffwechselvorgängen besser verstehen zu können und um das Potenzial der Mikroorganismen technisch nutzen zu können, sind quantitative Analysen unumgänglich. Da sich durch die Vielzahl der miteinander verknüpften Elemente und die hohe Anzahl von Rückkopplungsschleifen Probleme bei der Untersuchung des ganzheitlichen Verhaltens ergeben, kann der Einsatz von systemtheoretischen Methoden einen wichtigen Beitrag zum verbesserten Verständnis liefern. Damit läßt sich die Problemstellung der vorliegenden Arbeit folgendermassen umreißen:

- i. das biologische Wissen über zelluläre Systeme ist so zu strukturieren, dass es mit Hilfe von Methoden der Wissensrepräsentation in geeigneter Weise dargestellt werden kann;
- ii. das biologische Wissen ist einer quantitativen Analyse zugänglich zu machen, die es erlaubt, mathematische Modelle systematisch zu erstellen.

Zur Lösung dieser Aufgabenstellung wird in der vorliegenden Arbeit eine Modellierungssystematik vorgeschlagen, die auf der Definition von Modellbausteinen basiert. Diese können ausgewählt, parametrisiert und zu einem Gesamtmodell verschaltet werden.

Gliederung der Arbeit

Im folgenden Kapitel wird in das Modellierungskonzept eingeführt, anschließend erfolgt die Definition der elementaren Modellbausteine Stoffspeicher, Signalwandler und Stoffwandler (Kapitel 4). Das Modellierungskonzept erlaubt die Erstellung von höher aggregierten Modellstrukturen durch Verschaltung von elementaren Modellbausteinen. Schwerpunktmäßig wird in Kapitel 5 der Prozess der Genexpression als Beispiel für einen aggregierten Modellbaustein behandelt. Mit den definierten Modellbausteinen lassen sich dann auch Stoffwechselwege und -blöcke zusammensetzen. Einen zweiten Schwerpunkt dieses Kapitels stellt die Signaltransduktion in einem Stoffwechselblock dar. Bei der Initiation der Transkription spielen Wechselwirkungen zwischen Regulatorproteinen und DNA Bindestellen eine wesentliche Rolle. Durch das Ausnutzen des hierarchischen Aufbaus des Stoffwechselblocks, bei dem den beteiligten Proteinen unterschiedliche Ebenen zugewiesen werden, gelangt man zu reduzierten Modellen. Kapitel 6 beschreibt die Umsetzung des Modellierungskonzeptes in das rechnergestützte Werkzeug CELLMOD. Dies basiert auf der Modellbeschreibungssprache EULER und ermöglicht eine textuelle und eine graphische Repräsentation der Modelle. Implementiert sind elementare und aggregierte Modellbausteine.

Um die Tragfähigkeit der definierten Modellbausteine zu überprüfen, wird das Wachstum von *Escherichia coli* auf den Zuckern Glucose und Lactose in Kapitel 7 modelliert und simuliert. Das Modell umfaßt die spezifischen Aufnahme- und Abbauewege der Zucker und einen Modellbaustein für die zentralen Kohlenhydratabbauewege. Ausgehend von einem Grundmodell werden anschließend mehrere Hypothesen untersucht, die sich auf aktuelle biologische Untersuchungen im Bereich der Kataboliten Repression beziehen. Die Modellvalidierung erfolgt in Kapitel 8. Da primär die korrekte Beschreibung der intrazellulären Regulationsmechanismen interessiert, ist das Modell herangezogen worden, um das Verhalten von genetisch veränderten *Escherichia coli* Stämmen zu simulieren. Eine japanische Arbeitsgruppe hat Meßdaten veröffentlicht [29], die von veränderten Organismen stammen. Die Mutanten haben Veränderungen in den Signaltransduktionswegen, die wesentlich für das Wachstum auf den ausgewählten Zuckern sind und sich daher besonders für eine semi-quantitative Modellvalidierung eignen.

Für das Verständnis der Ableitung von Reaktionsgeschwindigkeiten enzymkatalysierter Reaktionen sind die beiden Verfahren der Modellreduktion Quasistationarität und "schnelles" Gleichgewicht von großer Bedeutung. Der grundlegende Unterschied zwischen den beiden Verfahren ist für ein einfaches Beispiel in Anhang A dargestellt. Um ganzheitliche Modelle zu erstellen, sind Teile des Stoffwechsels vereinfacht zu beschreiben. Grundlage dieser Vereinfachung ist in dieser Arbeit das Verfahren der stationären Stoffflußanalyse, welches zusammen mit experimentellen Ergebnissen in knapper Form in Anhang B vorgestellt wird. In Anhang C finden sich die Modellparameter für die dynamischen Modelle von Kapitel 7 und 8.

Kapitel 2

Modellierungskonzept

Bei verfahrenstechnischen Prozessen hat man sich schon lange Gedanken über einen systematischen Zugang zu Prozessmodellen gemacht. Eine am Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik der Universität Stuttgart entwickelte Modellierungssystematik [44] wurde im Rahmen der Netzwerktheorie [17] auf Fragen der Auslegung und Führung integrierter Prozesse erweitert. Dabei wird zur Lösung dieser Aufgaben ein Prozess oder eine ganze Produktionsanlage wie in Abbildung 2.1 gezeigt, in einzelne Prozessmodule zerlegt. Die Verschaltung der einzelnen Anlagenteile erfolgt bspw. auf der Apparateebene. Das im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Modellierungskonzept konzentriert sich auf Ebenen, die der Apparateebene unterlagert sind. Dazu wird eine Apparateeinheit in kleinere Einheiten zerlegt. Bei diesen Einheiten handelt es sich um thermodynamische Phasen, die als Komponenten der Phasenebene zu interpretieren sind. Der Strukturierungsprozess auf der Phasenebene entspricht damit einer Verschaltung von Phasen zu Phasenaggregaten bis hin zu den Apparateeinheiten. Die dieser Ebene zugeordneten Verknüpfungselemente, die in der Lage sind Phasen miteinander zu vernetzen, sind Phasengrenzen der verschiedensten Form sowie Ventile, Pumpen und Membranen. Die Fokussierung erfolgt hier auf den im Fermenter ablaufenden Fermentationsprozeß. Im folgenden soll die Strukturierung der Biophase in diesem Fermenter behandelt werden. Abbildung 2.1 gibt einen Überblick über die in einer Zelle ablaufenden Reaktionen für die Aufnahme von Kohlenhydraten [53]. Sie faßt Reaktionsschritte und -produkte nach ihrer Funktion im Stoffwechsel zusammen. Der Transport umfaßt dabei den oder die eigentlichen Transportschritte über die Zellmembran einschließlich des für die Kohlenhydrate spezifischen Abbaus bis zu den zentralen Kohlenhydratabbauwegen, die im Block “Katabole Abbaureaktionen” zusammengefaßt werden. Einzelne Zwischenprodukte (Precursor) sind die Ausgangsmetabolite zur Synthese der Monomere. Diese sind wiederum die Ausgangsstoffe zur Bildung der Makromoleküle wie Proteine, DNA und RNA, die den Hauptbestandteil der Zellmasse ausmachen.

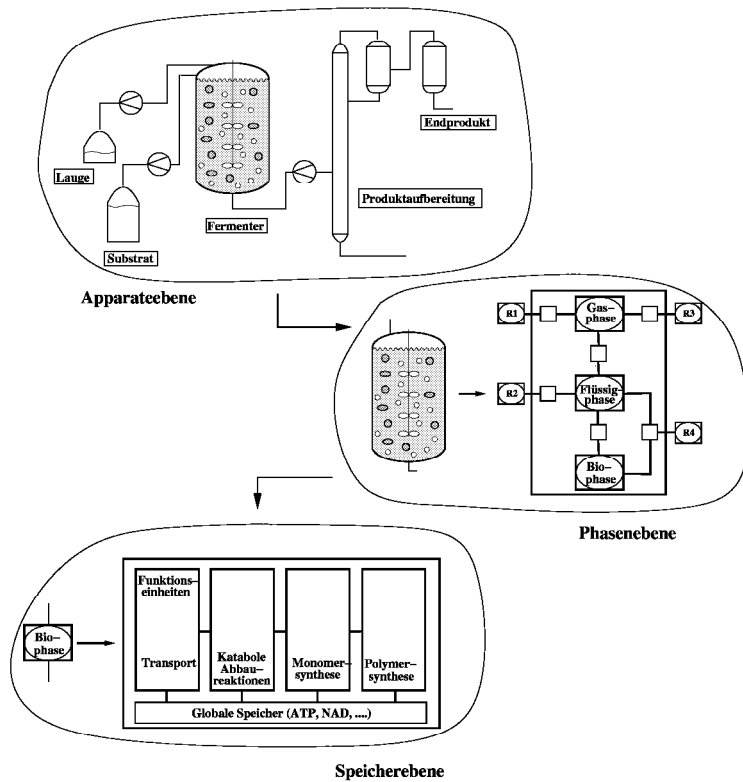


Figure 2.1: Die verschiedenen Ebenen bei der Strukturierung eines bioverfahrenstechnischen Prozesses.

Die Anwendung der Netzwerktheorie auf zelluläre Systeme ist eng mit der Forschungsrichtung Biosystemtechnik, einem neuen Forschungsgebiet, verbunden. Es beschäftigt sich mit Fragestellungen, die in einer interdisziplinären Kooperation zwischen Biologen und Systemwissenschaftlern/ Ingenieuren bearbeitet werden. Die Fragestellungen zielen zum einen auf das bessere Verständnis des Zusammenspiels zwischen Regulationsvorgängen und Stoffwechselvorgängen ab. Dies betrifft Untersuchungen über die Entdeckung von Regulationsmechanismen, über die Wirkungsweise von Regulatorproteinen und die Aufklärung von Strategien der Zellen zur Anpassung an veränderte Umweltbedingungen. Weitere Fragestellungen beschäftigen sich mit der Umsetzung des Wissens in Hinblick auf eine technische Nutzung.

2.1 Modellierung zellulärer Systeme

Die Modellierung von bioverfahrenstechnischen Prozessen, aber auch von Stoffwechselvorgängen hat eine lange Tradition. Die dabei entwickelten mathematischen Modelle lassen sich grob in strukturierte und unstrukturierte Ansätze gliedern. Unstrukturierte Ansätze beschreiben die Vorgänge in der Zelle nur mit einer einzigen Gleichung für die gesamte Biomasse und finden dank ihrer einfachen Struktur Anwendung bei Aufgaben der Prozesssteuerung und -regelung. Strukturierte Modelle unterteilen die Biophase in mehrere Bestandteile. Folgende Modelltypen für strukturierte Ansätze werden unterschieden:

- Kompartimentmodelle teilen die Zelle in aktive und nicht aktive Bestandteile auf. Aktive Anteile sind die Komponenten, die zur Synthese von neuer Zellmasse beitragen. Modelle, die die Synthese von Makromolekülen beschreiben, können ebenfalls zu den Kompartimentmodellen gerechnet werden [20, 3, 54].
- metabolisch strukturierte Modelle für einzelne Stoffwechselsequenzen, bei denen die Metabolite über reaktionskinetische Ansätze miteinander verknüpft sind [16, 74, 63].
- genetisch strukturierte Modelle, welche die Expression von Genen durch Wechselwirkungen zwischen Regulatorproteinen mit der DNA beschreiben [31, 36]. Hierzu zählen auch Modelle für die Expression von Fremdproteinen [3] und das Design von Expressionssystemen [8]. Bei letzteren werden unterschiedliche Promotor-Operator-Systeme in Bezug auf eine Maximierung des gewünschten Produktes untersucht.
- Zellmodelle, die das Verhalten von Bakterienzellen durch eine große Anzahl von Zustandsgrößen für Zwischenprodukte, Monomere und Polymere

beschreiben (“Cornell-Modell” und seine Erweiterungen [12, 35]). Neben diesen Größen umfaßt das Modell auch morphologische Eigenschaften wie Zellvolumen und Zellform.

- „Kybernetische“ Modelle konzentrieren sich auf die Beschreibung von Schlüsselstellen im Stoffwechsel und verwenden Gleichungen für die Bildungsraten der entsprechenden Schlüsselenzyme [78, 79]. Die Bildung und Aktivität dieser Schlüsselenzyme wird von “kybernetischen” Variablen beeinflusst, die über eine Optimierung der Wachstumsrate berechnet werden. Substrate, die zu einer hohen Wachstumsrate beitragen können, werden dann bevorzugt verstoffwechselt. Erweiterungen dieser Methode beziehen immer mehr detailliertes biologisches Wissen mit ein [62].

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass bei diesen Modellen entweder nur ein kleiner Teil des Stoffwechsels isoliert betrachtet wird oder wie beim “Cornell-Modell” die Anzahl von Zustandsgrößen so groß wird, dass das ganze System sehr unübersichtlich ist und Modellveränderungen nur schwer durchzuführen sind.

Die vorgelegte Arbeit verfolgt einen neuen Ansatz, der sich stark am molekularen Aufbau der Zelle orientiert. In der molekularen Biologie steht die Aufklärung von intrazellulären Regulations- und Adaptionvorgängen schon lange im Mittelpunkt des Interesses. Es hat sich gezeigt, dass Organismen sehr flexibel auf Umweltänderungen reagieren, indem eine ganze Reihe von Stoffwechselwegen zu- oder abgeschaltet wird. Dies hat zur Entdeckung von Multigensystemen geführt [53], bei denen viele Stoffwechselwege im wesentlichen über ein gemeinsames Regulatorprotein reguliert werden. Die Regulation führt beispielsweise bei der Aufnahme und beim Stoffwechsel von Kohlenhydraten zu einem zweiphasigem Wachstum, wenn zwei Kohlenstoffquellen vorgelegt werden. Erst nach vollständigem Verbrauch der bevorzugten Kohlenstoffquelle wird das zweite Substrat aufgenommen. Man kann daher davon ausgehen, dass das Wachstumsverhalten der Organismen in hohem Maße durch die zellinterne Verarbeitung von Reizen beschrieben werden kann. Hat man sich bisher auf die Beschreibung von metabolischen Netzwerken konzentriert, so sollen in dieser Arbeit schwerpunktmäßig Modelle zur Stoffwechselregulation erstellt werden. Dabei werden zelluläre Strukturen für die Modellierung ausgenutzt, indem eine entsprechende Abbildung auf mathematische Modellstrukturen erfolgt. Auf der Ebene der Regulation sind Operons, Regulons und Modulons [53] Beispiele für zelluläre Strukturen, die in den entsprechenden Kapiteln diskutiert werden.

Grundlage der Abbildung von zellulären Strukturen auf mathematische Modellstrukturen ist die Definition von Modellbausteinen. Die Vorgehensweise zur Lösung von Modellierungsaufgaben ist bereits aus der Verfahrenstechnik bekannt [44] und führte zur Entwicklung von leistungsfähigen Rechnerwerkzeugen [76]. Die Vorgehensweise soll im einzelnen beschrieben werden.

(1.) Definition eines vollständigen Satzes von disjunkten Modellbausteinen.

Um eine hohe Transparenz des Modellierungsvorganges zu erreichen, sind die Modellbausteine so zu definieren, dass sie direkt zellulären Einheiten zugeordnet werden können. Sie werden anhand von zwei Koordinaten, den strukturellen und den verhaltensbeschreibenden Eigenschaften, charakterisiert. Strukturelle Eigenschaften sind der Typ und die Anzahl von Ein- und Ausgangsgrößen des Bausteins. Verhaltensbeschreibende Eigenschaften werden durch mathematische Gleichungen repräsentiert, die dem Modellbaustein zugeordnet werden. Ausgehend von elementaren Modellbausteinen, die für die Modellierungsaufgabe die benötigte Korngröße besitzen, können höher strukturierte Modelle durch Verschalten von elementaren Modellbausteine erhalten werden. Höher strukturierte Modellbausteine werden im folgenden als *biomolekulare Funktionseinheiten* bezeichnet. Die Korngröße richtet sich dabei nach der Anwendung des Modells. Soll das Modell zur Prozessführung eingesetzt werden, ist eine geringe Granularität ausreichend. Wird das Modell zum verbesserten Verständnis zellulärer Vorgänge verwendet, ist in der Regel eine detaillierte Beschreibung notwendigig.

Betrachtet wird im folgenden die Ebene der elementaren Modellbausteine. Ordnet man hier die Modellbausteine hinsichtlich ihrer strukturellen Komplexität auf einer Achse an, so findet sich der einzelne elementare Modellbaustein in der Nähe des Achsenursprungs. Betrachtet man miteinander verschaltete elementare Modellbausteine mit einer hohen Anzahl von Verknüpfungen, so liegen diese

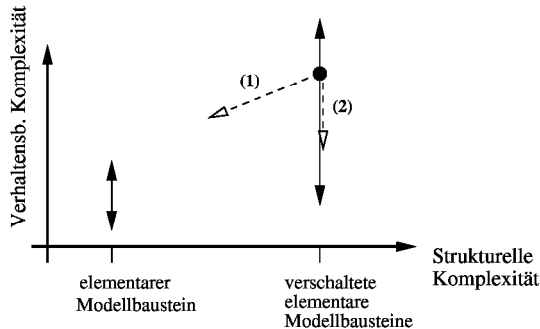


Figure 2.2: Strukturelle und verhaltensbeschreibende Koordinaten zur Beschreibung der Modellbausteine.

rechts davon entfernt. In der Regel bestehen für eine fest vorgegebene Modellstruktur mehrere Möglichkeiten der Verhaltensbeschreibung. Diese reichen bspw.

für eine Reaktion von einem Ansatz erster Ordnung bis zu einer komplizierten Kinetik, wenn Enzyme bei der Stoffumsetzung beteiligt sind. Die Komplexität auf Seiten der Verhaltensbeschreibung nimmt daher einen breiten Raum ein. Damit ist es möglich, Teile des Stoffwechsels, die nicht interessieren oder für die nur unzureichende Informationen vorliegen mit reduzierten Modellen zu beschreiben. Abbildung 2.2 veranschaulicht die beiden Koordinaten: Ein Punkt in der Ebene entspricht der gesamten Komplexität des betrachteten Systems. Um zu einer vereinfachten Beschreibung des Modellbausteins zu kommen, kann eine Reduktion in beide Richtungen erfolgen (in der Abbildung der mit (1) gekennzeichnete Pfeil). Erfolgt eine Reduktion nur über den Typ der Gleichung, bspw. eine Linearisierung eines nichtlinearen Modells, so verändert sich nur die verhaltensbeschreibende Koordinate (in der Abbildung der mit (2) gekennzeichnete Pfeil). Eine quantitative Beschreibung der Verhaltenskoordinate könnte in diesem Fall über Nichtlinearitätsmaße erfolgen [1].

(2.) Auswahl der Modellbausteine.

Der gesamte Modellierungsvorgang setzt sich aus der Auswahl, der Parametrierung und der Verschaltung der Modellbausteine zusammen. Wie unten gezeigt wird, ergeben sich eine ganze Reihe von Unterklassen eines Modellbausteintyps. Dies legt es nahe, die Modellbausteine nach bestimmten Kriterien in einer Modellbausteinbibliothek abzulegen. Kann rechnergestützt über eine Bedienoberfläche die Auswahl und die Verschaltung der Modellbausteine erfolgen, so kann der Modellierungsvorgang wesentlich erleichtert werden. Langfristig kann dann daran gedacht werden, über ein Werkzeug die Gleichungen zu erstellen, Simulationen auszuführen und die Ergebnisse zu veranschaulichen.

Zusammenfassend lassen sich die Eigenschaften des Modellierungskonzeptes folgendermaßen charakterisieren:

- (i.) Transparenz: Die (mathematischen) Modellbausteine sind direkt zellulären Modellbausteinen zugeordnet.
- (ii.) Modularität: Die Modellbausteine sind über definierte Ein- und Ausgänge miteinander zu verschalten.
- (iii.) Flexibler Komplexitätsgrad: der Grad der Komplexität mit der eine einzelne Funktionseinheit beschrieben wird, hängt vom verfügbaren Wissen und der Zielsetzung der Modellierung ab.
- (iv.) Ganzheitlichkeit: Der gesamte Stoffwechsel des Organismus ist so zu strukturieren, dass er mit einer begrenzten Anzahl von Funktionseinheiten beschrieben werden kann. Die Funktionseinheiten werden in der Regel eine

gewisse Abgeschlossenheit gegenüber ihrer Umgebung besitzen. Sind die relevanten Eingangssignale bekannt, so kann eine vollständige Analyse einer für sich allein betrachteten Einheit durchgeführt werden.

Diese Vorgehensweise erlaubt – im Gegensatz zur heute vorherrschenden stoffflußorientierten Betrachtungsweise – eine system- und signalorientierte Betrachtungsweise, die sich am molekularbiologischen Aufbau der Organismen orientiert. Die enge Verbindung von biologischem Wissen mit systemtheoretischen Methoden der Ingenieurwissenschaften soll damit langfristig Rechnerexperimente ähnlich wie mit realen Kulturen ermöglichen und auch eine technische Nutzung des biologischen Potenzials im Sinne einer Prozessbionik [52] erlauben.

Kapitel 3

Definition elementarer Modellbausteine

Die elementaren Modellbausteine stellen die Ausgangsbasis für die Erstellung der Modelle dar. Innerhalb der Definition der Bausteine werden auch Symbole vereinbart, die die Modellbausteine repräsentieren. Dies hat sich aus folgenden Gründen als vorteilhaft erwiesen:

- i. die Symbolik erhöht die Transparenz und erleichtert damit die Kommunikation zwischen Biologen und Systemwissenschaftlern: der Biologe muß sich nicht mit den zugeordneten mathematischen Gleichungen beschäftigen, sondern stellt sein Wissen anhand der strukturellen Verknüpfungen der Bausteine zur Verfügung.
- ii. die Symbolik für die Stoffumwandlungs- und Signaltransduktionsprozesse ist so gewählt, dass die systemtheoretischen Ein- und Ausgangsgrößen deutlich werden.

Abbildung 3.1 gibt eine Übersicht der elementaren Modellbausteine.

3.1 Stoffspeicher

Die Stoffspeicher dienen der Speicherung intrazellulärer Metabolite, die durch enzymatische Reaktionen oder durch Polymerisation monomerer Zellbausteine (Nukleotide, Aminosäuren) gebildet werden. Es erweist sich als zweckmäßig, zwischen Stoffspeichern ohne und mit genetischer Information zu unterscheiden (Abbildung 3.2). Die erste Klasse repräsentiert Metabolite, die als Zwischenprodukte durch enzymatische Umsetzung gebildet und verbraucht werden. Die zweite

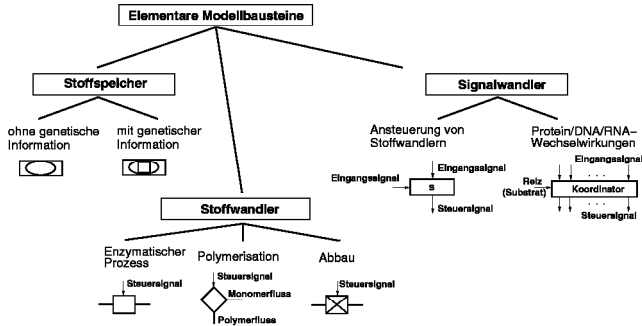


Figure 3.1: Übersicht über die elementaren Modellbausteine.

Klasse entsteht durch Polymerisationsreaktionen, für die letztlich die DNA den Bauplan liefert. Zu nennen sind hier neben der DNA selbst, die RNA und die Proteine. Die Verknüpfung der Speicher und Stoffwandler erfolgt über Potenzial-Strom-Kopplungen [17] und wird über definierte Anschlüsse realisiert.



Figure 3.2: Symbolische Darstellung der Stoffspeicher ohne (links) und mit genetischer Information (rechts).

Das Verhalten eines Stoffspeichers entspricht dem eines Integrators, wobei vorausgesetzt wird, dass die Zelle ideal durchmischt ist und keine räumlichen Abhängigkeiten berücksichtigt werden müssen. Betrachtet man die Molzahl n_{Mij} des in Abbildung 3.3 gezeigten Metaboliten M_{ij} in der Funktionseinheit F_1 (Masse m_i) auf der Speicherebene als extensive Speichervariable, so gilt

$$\frac{dn_{Mij}}{dt} = J[n_{Mij}]^1. \quad (3.1)$$

$J[n_{Mij}]$ ist der dem Stoffspeicher zufließende oder abfließende Molenstrom des Metaboliten M_{ij} . Grenzt man nun die zu modellierende Funktionseinheit, der der betrachtete Stoffspeicher angehört, gegen ihre zelluläre Umgebung ab (in der Abbildung gestrichelt als Bilanzraum gekennzeichnet), so lässt sich der Strom

¹Notation nach E.D. Gilles, Skriptum zur Vorlesung "Dynamik technischer Systeme II".

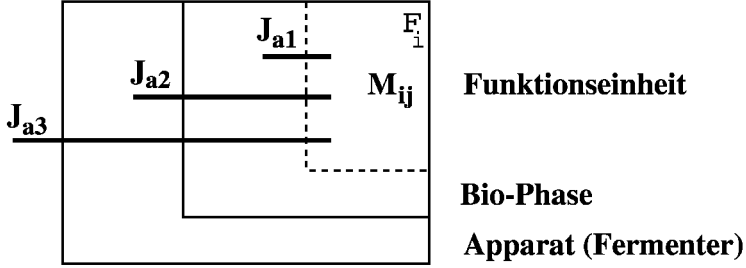


Figure 3.3: Die verschiedenen Ebenen bei der Strukturierung eines bioverfahrenstechnischen Prozesses und die zugehörigen Austauschströme in der schematischen Darstellung. Der Metabolit M_{ij} gehört zur Funktionseinheit F_1 .

$J[n_{Mij}]$ in zwei Anteile aufspalten:

$$J[n_{Mij}] = P[n_{Mij}] + J_a[n_{Mij}]. \quad (3.2)$$

$P[n_{Mij}]$ kann als Quellterm interpretiert werden, der im Innern der Funktionseinheit durch reaktive Wechselwirkungen mit anderen Speichergößen entsteht oder vergeht, während $J_a[n_{Mij}]$ den Austauschstrom mit der Umgebung der Funktionseinheit beinhaltet.

Für den praktischen Gebrauch wird eine Gleichung für die auf die Biomasse im Fermenter bezogene Fraktion $c_{ij} = \frac{n_{Mij}}{m}$ verwendet, wobei m die Biomasse im Fermenter ist. Der Massenanteil c_{ij} wird hier, wie in der Bioprozesstechnik üblich, als intrazelluläre Konzentration bezeichnet. Zur Herleitung einer Differentialgleichung für die intrazelluläre Konzentration c_{ij} wird angenommen, dass die Biomasse nur im Fermenter produziert wird. Außerdem ist es zweckmäßig, den Austauschstrom $J_a[n_{Mij}]$ in mehrere Anteile gemäß Abbildung 3.3 aufzuspalten. J_{a3} bezeichnet den Austauschstrom der den Fermenter verläßt, J_{a2} den Austauschstrom der Biophase mit den anderen Phasen im Fermenter und J_{a1} den Austauschstrom der Funktionseinheit, zu der der Metabolit gehört. Gleichung 3.2 ergibt sich damit zu

$$\frac{dn_{Mij}}{dt} = P[n_{Mij}] + J_{a1}[n_{Mij}] + J_{a2}[n_{Mij}] + J_{a3}[n_{Mij}]. \quad (3.3)$$

Geht man nun zurück auf die Phasenebene, so können für die Komponenten der Phasen ebenfalls Gleichungen angeschrieben werden. Hier wird die Biomasse m als Zustandsgröße für die Summe aller Metabolite j über alle Funktionseinheiten i eingeführt. Mit den Molmassen Mg_{ij} gilt für die Biomasse m im Fermenter

$$m = \sum_i \sum_j n_{Mij} Mg_{ij} = m \sum_i \sum_j c_{ij} Mg_{ij}. \quad (3.4)$$

Für die zeitliche Änderung der Biomasse m im Fermenter kann zunächst analog oben folgende Gleichung angeschrieben werden

$$\frac{dm}{dt} = P[m] + J_{a3}[m]. \quad (3.5)$$

In dieser Gleichung taucht nur der Austauschstrom J_{a3} mit den anderen Anlageeinheiten auf. Für die Molzahl einer Komponente in der Flüssigphase (F) und in der Gasphase (G) gilt

$$\frac{dn_F}{dt} = P[n_F] + J_{a3}[n_F], \quad (3.6)$$

$$\frac{dn_G}{dt} = P[n_G] + J_{a3}[n_G]. \quad (3.7)$$

Schreibt man die Gleichungen, die die Biophase betreffen nochmals mit einer zusätzlichen Gleichung für die Masse m_i einer Funktionseinheit an, so wird deutlich, dass die Austauschströme in den einzelnen Aggregationsstufen voneinander abhängen.

$$\begin{aligned} \frac{dn_{Mij}}{dt} &= P[n_{Mij}] + J_{a1}[n_{Mij}] + J_{a2}[n_{Mij}] + J_{a3}[n_{Mij}] \\ \frac{dm_i}{dt} &= P[m_i] + J_{a2}[m_i] + J_{a3}[m_i] \\ \frac{dm}{dt} &= P[m] + J_{a3}[m]. \end{aligned}$$

Mit $c_{ij} = \frac{n_{Mij}}{m}$ gilt folgender Zusammenhang für den Austauschstrom J_{a3}

$$J_{a3}[n_{Mij}] = c_{ij} J_{a3}[m], \quad (3.8)$$

wenn die Biomasse ausschließlich im Fermenter erzeugt wird und nicht von außen zugeführt wird. Für die zeitliche Änderung von c_{ij} ergibt sich

$$\frac{dn_{Mij}}{dt} = \frac{d(c_{ij} m)}{dt} = \frac{dc_{ij}}{dt} m + c_{ij} \frac{dm}{dt} \quad (3.9)$$

und mit Gleichung (3.5)

$$\begin{aligned} \frac{dc_{ij}}{dt} &= \frac{1}{m} \left(P[n_{Mij}] + J_{a1}[n_{Mij}] + J_{a2}[n_{Mij}] + J_{a3}[n_{Mij}] - \right. \\ &\quad \left. c_{ij} (P[m] + J_{a3}[m]) \right). \end{aligned} \quad (3.10)$$

Mit Gleichung (3.8) folgt

$$\frac{dc_{ij}}{dt} = \frac{1}{m} (P[n_{Mij}] + J_{a1}[n_{Mij}] + J_{a2}[n_{Mij}] - c_{ij} P[m]). \quad (3.11)$$

Für die Bilanzgleichung des Metaboliten M_{ij} werden neben den beiden Quelltermen $P[n_{Mij}]$ und $P[m]$ die Austauschströme $J_{a_1}[n_{Mij}]$ und $J_{a_2}[n_{Mij}]$ benötigt. Wie leicht einzusehen ist, hat der Abfluß von Biomasse aus dem Fermenter J_{a_3} keinen Einfluß auf die intrazelluläre Konzentration des Metaboliten.

3.1.1 Ein Ansatz für die spezifische Wachstumsrate μ

In diesem Unterkapitel soll ein Zusammenhang zwischen der Änderung der Biomasse m im Fermenter und den Austauschströmen abgeleitet werden. Dies führt auf eine Beziehung für die spezifische Wachstumsrate μ . In der Literatur wird eine Reihe von Ansätzen für die spezifische Wachstumsrate vorgestellt. Es lassen sich zwei Hauptklassen unterscheiden: In der ersten Klasse wird die spezifische Wachstumsrate in Abhängigkeit von Medienkomponenten angegeben; die zweite Klasse gibt die spezifische Wachstumsrate in Abhängigkeit von intrazellulären Größen an. In Tabelle 3.1 sind verschiedene Ansätze zusammengestellt. Nielsen und Villadsen geben die Wachstumsrate in Abhängigkeit von ausschließlich intrazellulären Raten an. Dieser Ansatz ist aber nur für eine bestimmte Auswahl von intrazellulären Raten und Metaboliten gerechtfertigt. Die Metabolite müssen die Hauptbestandteile der Biomasse ausmachen. Daher ist dieser Ansatz nur für Kompartimentmodelle geeignet.

Tabelle 3.1: Übersicht über einige in der Literatur vorgestellte Ansätze für die spezifische Wachstumsrate μ .

Autor	Gleichung
Extraz. Größen	
Monod [50]	$\mu = \mu_{max} \frac{c_s}{K_s + c_s}$
Tessier in [58]	$\mu = \mu_{max} (1 - e^{-c_s/K_s})$
Tsao [77]	$\mu = \left(1 + \sum^i \frac{k_i c_{n,s}}{K_{n,s} + c_{n,s}}\right) \prod^j \frac{\mu_{max}^j c_{s,i}}{K_{s,i} + c_{s,i}}$
Intraz. Größen	
Lee [38]	$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{c_{pro}}{c_{pro,max}}\right)^m \left(1 - \frac{N_p}{N_{p,max}}\right)^n \frac{c_s}{K_s + c_s}$
Nielsen [55]	$\mu = \sum^i \sum^j \gamma_{ij} r_j$
Marr [45]	$\mu = k_1 r_{Protein} + k_2 r_{Ribosomen}$

Im folgenden soll aus der oben vorgestellten Aggregation der einzelnen Komponenten zur gesamten Biomasse ein neuer Ansatz vorgestellt werden. Der Quell-

term $P[m]$ – die Zunahme der Biomasse im Fermenter durch das Wachstum der Zellpopulation – wird mit der spezifischen Wachstumsrate μ beschrieben

$$P[m] = \mu m. \quad (3.12)$$

Der Zusammenhang zwischen dem Quellterm $P[m]$ und dem Austauschstrom $J_{a_2}[n_{Mij}]$ kann folgendermaßen ermittelt werden: Die zeitliche Ableitung von Gleichung (3.4) ergibt

$$\begin{aligned} \frac{dm}{dt} &= \sum_i \sum_j \left(\frac{dc_{ij}}{dt} m + c_{ij} \frac{dm}{dt} \right) Mg_{ij} \\ &= m \sum_i \sum_j \frac{dc_{ij}}{dt} Mg_{ij} + \frac{dm}{dt} \sum_i \sum_j c_{ij} Mg_{ij}. \end{aligned} \quad (3.13)$$

Mit $\sum_i \sum_j c_{ij} Mg_{ij} = 1$ folgt

$$\sum_i \sum_j \frac{dc_{ij}}{dt} Mg_{ij} = 0. \quad (3.14)$$

Mit den Gleichungen (3.14) und (3.11) ergibt sich

$$\begin{aligned} \sum_i \sum_j \frac{dc_{ij}}{dt} Mg_{ij} &= \frac{1}{m} \sum_i \sum_j (P[n_{Mij}] + J_{a_1}[n_{Mij}] \\ &\quad + J_{a_2}[n_{Mij}] - c_{ij} P[m]) Mg_{ij} = 0. \end{aligned} \quad (3.15)$$

Da in der Biophase für die Summe aller Quellterme $\sum_j P[n_{Mij}] = 0$ und die Summe der Austauschströme über alle Metabolite und alle Funktionseinheiten $\sum_i \sum_j J_{a_1}[n_{Mij}] = 0$ gilt, ergibt sich mit dem Ansatz für den Quellterm $P[m]$ aus Gleichung (3.12) folgende Gleichung für die spezifische Wachstumsrate μ

$$\mu = \frac{1}{m} \sum_i \sum_j J_{a_2}[n_{Mij}] Mg_{ij}. \quad (3.16)$$

Anschaulich gesprochen ändert sich die Biomasse nur aufgrund der Austauschströme der Biophase. Die angegebene Gleichung besitzt allerdings kaum praktische Relevanz, da nicht alle Austauschströme messtechnisch erfasst werden können. Da in den zu erstellenden Modellen nur eine geringe Anzahl von Austauschströmen berücksichtigt werden kann, soll folgender Ansatz zur Berechnung der spezifischen Wachstumsrate verwendet werden

$$\mu = \sum_k^k Y_k j[n_{Mk}], \quad (3.17)$$

wobei Y_k als Ausbeutekoeffizient mit der Einheit [gTM/mol] zu interpretieren ist und $j[n_{Mk}]$ der auf die Biomasse m bezogene Stoffstrom der Komponente k in die oder aus der Biophase (je nach Vorzeichen) ist.

3.2 Stoffwandler für enzymkatalysierte Reaktionen

Die Vernetzung von Stoffspeichern erfolgt über gesteuerte Stoffwandler. Dem Potenzial-Stromvektor-Konzept entsprechend stellen die Speichergrößen n_{Mij} Eingangssignale und die Austauschströme $J_{a1}[n_{Mij}]$, $J_{a2}[n_{Mij}]$ bzw. die Quellterme $P[n_{Mij}]$ Ausgangssignale dar. Aufgrund der Überlegung, dass eine ganze Reihe von Steuereingriffen auf den Stoffwandler einwirken, bspw. die Konzentrationen von Enzymen und von Effektoren, scheint es hier zweckmässig, diese Eingriffe in einem Signalwandlerbaustein zu verrechnen. Der Ausgang dieses unten beschriebenen Bausteins ist dann die Reaktionsgeschwindigkeit r , die als Eingangsgröße für den Stoffwandler dient. Abbildung 3.4 zeigt das Blockschaltbild eines gesteuerten Stoffwandlers, der die Stoffspeicher zweier Metabolite M_1 und M_2 über die Reaktion



miteinander verknüpft. Mit der Reaktionsgeschwindigkeit² r und der stöchiometrischen Umsatzzahl γ_{M1} gilt dann für den Stoffstrom $P[n_{M1}]$

$$P[n_{M1}] = \gamma_{M1} r m. \quad (3.19)$$

Die Berechnung der Stoffströme aus Stöchiometrie und Reaktionsgeschwindigkeit stellt die Verhaltensbeschreibung des Bausteins dar.

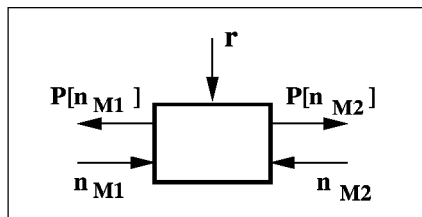


Figure 3.4: Enzymgesteuerter Stoffwandler.

Betrachtet man nun eine Funktionseinheit, welche durch ein Reaktionsnetzwerk mit dem Ratenvektor r und dem Vektor x intrazellulärer Metabolite repräsentiert wird, so lassen sich mit der stöchiometrischen Matrix Γ die Reaktionsgleichungen schreiben als

$$\Gamma x = 0. \quad (3.20)$$

²Aus praktischen Gründen wird für die Reaktionsrate r die Einheit $[\mu\text{mol}/\text{gTM h}]$ bzw. $[\mu\text{mol}/\text{gTM h}]$ gewählt.

Der Vektor der Quellterme für alle Metabolite $P[n]$ berechnet sich dann zu

$$P[n] = \Gamma^T r \, m. \quad (3.21)$$

Die Vektoren der Austauschströme $J_{a_1}[n_M]$ und $J_{a_2}[n_M]$ ergeben sich ebenfalls durch Reaktionsnetzwerke mit den Matrizen Γ_1 , Γ_2 und den Ratenvektoren r_1 und r_2 .

$$J_{a_1}[n_M] = \Gamma_1^T r_1 \, m, \quad (3.22)$$

$$J_{a_2}[n_M] = \Gamma_2^T r_2 \, m. \quad (3.23)$$

3.3 Gesteuerte Polymerisationsprozesse

Zur Beschreibung von Polymerisationsprozessen wird eine zweite Art eines strukturellen Modellbausteins vom Typ “gesteuerter Stoffwandler” definiert. Auch dieser, als Polymerisator bezeichnete Baustein besitzt Potenzial- und Steuereingänge sowie Stromausgänge. Polymerisationsprozesse treten bei der Bildung von Makromolekülen auf. Zwei Prozesse lassen sich unterscheiden. Beim ersten erfolgt die Synthese durch einen enzymatischen Prozess. Bei der Glycogen Synthese werden bspw. Zuckermoleküle durch das Enzym Glycogen Synthase aneinander gereiht. Glycogen dient der Zelle als Reservestoff, der bei Bedarf wieder in die einzelnen Zuckermoleküle zerlegt werden kann. Die zweite Prozessklasse unterscheidet sich von der ersten dadurch, daß unterschiedliche Monomere in einer bestimmten Reihenfolge aneinandergereicht werden. Der Bauplan für diese Polymere ist auf den Makromolekülen DNA und RNA kodiert. Damit der Polymerisationsprozess starten kann, sind Wechselwirkungen zwischen diesen Nukleinsäuren und regulatorisch wirkenden Proteinen notwendig. Regulatorisch wirkende Proteine beeinflussen auch die Elongation und Termination und stellen damit die Steuereingänge für den Polymerisationsprozess dar. Die Steuersignale werden durch Modellbausteine vom Typ Signalwandler beschrieben (siehe unten).

Die Synthese von DNA, RNA und Proteinen (Replikation, Transkription und Translation) lassen sich mit folgenden stöchiometrische Beziehungen beschreiben:

$$\text{Replikation:} \quad |p| \, dNu \xrightarrow{r_{Re}} DNA \quad (3.24)$$

$$\text{Transkription:} \quad |l| \, Nu \xrightarrow{r_{Tr}} RNA \quad (3.25)$$

$$\text{Translation:} \quad |m| \, Am \xrightarrow{r_{Ti}} Protein, \quad (3.26)$$

wobei p , l und m stöchiometrische Koeffizienten darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit werden die benötigten Monomere als Poolgrößen für Nukleotide und Aminosäuren aufgefasst und nicht einzeln aufgeschlüsselt.

Abbildung 3.5 zeigt das Symbol für den Polymerisator. Steuergrösse ist die Reaktionsgeschwindigkeit r , die im Steuerelement berechnet wird.

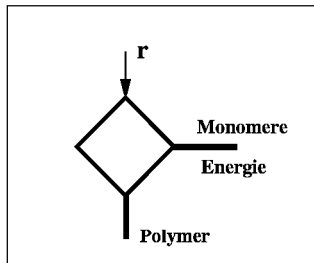


Figure 3.5: Modellbaustein gesteuerter Polymerisator.

3.4 Signalwandler – Modellbausteine der Signaltransduktion

Die Flexibilität zellulärer Systeme beruht auf ihrer Fähigkeit, äußere Reize zu verarbeiten. Dies äußert sich bspw. in der Zu- oder Abschaltung von ganzen Stoffwechselwegen, wenn ein verändertes Nährstoffangebot vorliegt. Das Bindeglied zwischen den Reizen und der Antwort des Organismus sind Signaltransduktionssysteme, die im Rahmen des Modellierungskonzeptes durch Signalwandlerbausteine beschrieben werden. Der formale Aufbau eines solchen Systems und die Bezeichnung der einzelnen Komponenten kann der Kommunikationstechnik entnommen werden. Wie Abbildung 3.6 zeigt, wird der Reiz über Sensoren erfasst. Ein Sender wandelt den Reiz in ein Signal um, welches von einem Empfänger an einen Regulator weitergegeben wird. In zellulären Systemen sind die einzelnen Komponenten meistens durch Proteine realisiert, die in unterschiedlichen Konformationen vorliegen können. Die Konformationen repräsentieren dann einen gewissen Aktivitätsgrad des Proteins. Ein Protein kann daher mehrere der oben genannten Funktionen wahrnehmen.

Im vorliegenden Kapitel sollen zunächst Wechselwirkungen zwischen Proteinen und DNA Bindestellen beschrieben werden. Dies erfolgt über den Modellbaustein Koordinator.

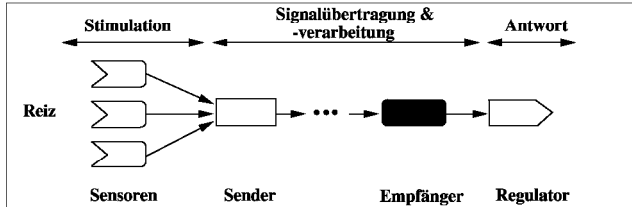


Figure 3.6: Schema der zellulären Signalübertragung und Verarbeitung.

3.4.1 Modellbaustein Koordinator

Charakteristisches Kennzeichen von vielen Prozessen der Signaltransduktion ist die Existenz mehrerer Konformationen eines Proteins. Der aktivierte Zustand wird durch Übertragung einer Phosphatgruppe oder einer anderen Gruppe sowie durch Wechselwirkungen mit einem Alarmon erreicht. Haben die Proteine regulatorische Funktion, so treten auch Wechselwirkungen mit Nukleinsäuren auf, die die Replikation, Transkription und Translation positiv oder negativ beeinflussen.

Der Signalwandlerbaustein vom Typ Koordinator beschreibt die Wechselwirkungen zwischen Proteinen untereinander, zwischen Proteinen und Effektoren sowie zwischen Proteinen und Nukleinsäuren. Eingangsgrößen in den Koordinatorbaustein sind also Protein-, Nukleinsäure- und Effektorkonzentrationen. Ausgangsgrößen sind die Konzentrationen der einzelnen Konformationen. Abbildung 3.7 zeigt zwei Beispiele für Modellbausteine vom Typ Koordinator. Wie der linke Teil der Abbildung zeigt, besitzt der Modellbaustein als Eingänge die Effektor-

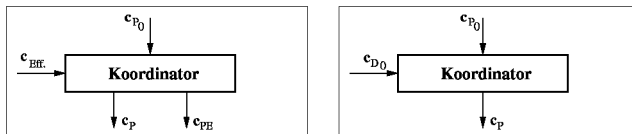


Figure 3.7: Signalwandlerbaustein Koordinator zur Beschreibung der Komplexbildung zwischen Proteinen, Effektoren und Nukleinsäuren.

konzentration c_{Eff} und die Gesamtproteinkonzentration c_{P0} und als Ausgänge die Konzentrationen der beiden Konformationen c_P und c_{PE} . Im rechten Teil der Abbildung sind die Eingangsgrößen die Gesamtproteinkonzentration c_{P0} und die DNA Konzentration c_{D0} . Als Ausgangsgröße dient das noch frei verfügbare Protein c_P . Dieser Typ findet zur Beschreibung der Initiation von Polymerisationsprozessen Verwendung.

Den Koordinatorbausteinen sind mathematische Gleichungen zur Verhaltensbeschreibung zuzuordnen. Dies soll am Beispiel der Initiation der Transkription gezeigt werden. Die Transkription bei *E. coli* beginnt mit der promotorspezifischen Bindung der RNA-Polymerase P^* . Sie ist ein großes Enzym, bestehend aus den Untereinheiten $\alpha\beta\beta'$ (Coreenzym). Zum Erkennen des Promotors ist die Anbindung des σ -Faktors notwendig. Diese Untereinheit ist für das Finden des Promotors zuständig und dissoziiert nach der Transkriptionsinitiation wieder ab. Hat das Holoenzym an den Promotor gebunden, so bildet sich zunächst der "geschlossene" Komplex. Nach einer reversiblen Konformationsänderung kommt es zu einer Öffnung einer ca. 15 Basenpaare langen Region der Promotor DNA ("offener" Komplex PD). Mit dem Anbinden des ersten Nukleotids verlässt die Polymerase den Promotor und bewegt sich entlang der DNA, der Übergang zur Elongation hat stattgefunden. Die Bildungsrate des offenen Komplexes kann als Maß für die Frequenz der Initiation interpretiert werden. Die Interaktionen der Polymerase sollen durch folgende Reaktionsgleichungen beschrieben werden.



wobei P die durch den σ -Faktor aktivierte RNA-Polymerase und D die Gesamtheit aller Promotoren darstellt (die Bindestelle für ein einzelnes Gen wird zur Unterscheidung unten mit D^i bezeichnet). Die Grösse K kann als eine über alle Promotoren gemittelte Affinität betrachtet werden. Da die Wechselwirkungen im Vergleich zu den folgenden Syntheseschritten (Freiwerden des Promotors, Bewegung der Polymerase auf der DNA) rasch erfolgen, kann angenommen werden, dass sich die Reaktionen im "schnellen" Gleichgewicht befinden [84] (Gleichgewichtskonstanten $K_b = \frac{c_P c_\sigma}{c_{PD}}$ und $K = \frac{c_P c_D}{c_{PD}}$). Der Koordinatorbaustein soll mit Bausteinen vom Typ Expressor (Kapitel 4.1), die die Synthese einzelner Proteine beschreiben, verschaltet werden. Daher ist es zweckmässig, die Menge an freien Polymerasemolekülen c_P als Ausgangsgrösse zu verwenden. Zur Berechnung von c_P sind algebraische Gleichungen für die Gesamtmenen an σ -Faktoren, RNA-Polymerasen und Promotoren aufzustellen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass im stationären Fall nicht nur ein einziges RNA-Polymerase Molekül bei der Transkription beteiligt ist. Durch die Grösse n_P , die die durchschnittliche Anzahl aktiver Polymerasen auf der gesamten DNA repräsentiert, wird dies in den Gleichungen berücksichtigt. Wie unten gezeigt, lässt sich für das einzelne Gen diese Grösse aus dem Reaktionsmechanismus berechnen. Es ergeben sich somit folgende algebraische Erhaltungsgleichungen für die Gesamtmenge an σ -Faktoren $c_{\sigma 0}$, RNA-Polymerase c_{P0} und die Gesamtmenge aller Promotorbindestellen c_{D0}

$$c_{\sigma 0} = c_\sigma + c_P + c_{PD} \quad (3.28)$$

$$c_{P0} = c_P^* + c_P + n_P c_{PD} \quad (3.29)$$

$$c_{D0} = c_D + c_{PD}. \quad (3.30)$$

Lösung des Gleichungssystems 3.28 - 3.30

Tabelle 3.2 stellt die berechneten Größen aus dem Gleichungssystem 3.30 zusammen. Unter Verwendung der Bindungsparameter für den σ Faktor und für die DNA Wechselwirkung erhält man das Ergebnis, dass ca. 3657 Polymerase Moleküle frei in der Zelle sind. Dies stimmt gut mit dem in [6] gegebenen Wert überein.

Tabelle 3.2: Zusammenstellung der Eingangs- und Ausgangsgrößen sowie der Parameter zur Berechnung der Verteilung der RNA-Polymerase auf die Promotoren mit dem Modellbaustein vom Typ Koordinator.

Eingangsgrößen und Parameter	
Gesamt RNA-Polymerase c_{P0}	$0.0285 [\mu \text{ mol/g TM}] \equiv 4800 [-]$ [6]
Gesamtanzahl Promotoren c_{D0}	$0.00237 [\mu \text{ mol/g TM}] \equiv 400 [-]$ Abschätzung
Anzahl σ -Faktoren	411 [-] [37]
Bindungskonstante K_b	$1.22 \cdot 10^{-6} [\mu \text{ mol/g TM}]$
Bindungskonstante K	$2.44 \cdot 10^{-5} [\mu \text{ mol/g TM}]$ [37]
n_P	3 Abschätzung
Berechnete Größen	
freie Polymerasen P	3657 [-]

3.4.2 Steuereinheit zur Ansteuerung von Stoffwandlern

Wie oben ausgeführt werden die Stoffwandler mit Steuerelementen verbunden, die die Syntheserate übergeben. Im folgenden sollen nun die Steuerelemente zur Ansteuerung enzymkatalysierter Stoffwandler betrachtet werden. Zu Beginn erfolgt eine kurz Darstellung der Grundlagen der Enzymkinetik.

Enzyme und enzymkatalysierte Reaktionen

Einem Steuerelement mit vorgegebenen strukturellen Eigenschaften lassen sich i.a. unterschiedliche Ansätze für die Reaktionsgeschwindigkeit als verhaltensbeschreibende Modellbausteine zuordnen. Damit diese beim Modellierungsvorgang

für eine Auswahl zur Verfügung stehen, werden sie in einer Modellbibliothek abgelegt. Im folgenden sollen die wichtigsten Eigenschaften von Enzymen und beispielhaft unterschiedliche Verhaltensmuster kurz vorgestellt werden. Anschließend wird der Aufbau der Modellbibliothek vorgestellt.

Enzyme sind aus Aminosäuren aufgebaut. Die Reihenfolge der Anbindung wird als Primärstruktur bezeichnet. Durchschnittlich bestehen Proteine aus 300 bis 450 Aminosäuren, das entspricht einer Genlänge von $l = 900 - 1350 \text{ bp}$ (Basenpaaren). Der Wert besitzt aber eine große Streuung. Durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Peptidbindungen kann es, ähnlich wie bei der DNA, zur Bildung einer Helix-Struktur kommen. Diese wird als Sekundärstruktur bezeichnet. Ein weiterer Typ der Sekundärstruktur ist das β -Faltblatt, wobei ebenfalls Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Peptiden bestehen.

Für die Funktion eines Enzyms ist die räumliche Anordnung der Helices und Faltblattstrukturen von großer Bedeutung. Diese können kugelförmige, ellipsoide oder ähnlich geformte Strukturen herausbilden, die als Domänen oder Untereinheiten bezeichnet werden und aus ca. 50-150 Aminosäuren bestehen [30]. Domänen können katalytische oder allosterische Zentren besitzen. In den katalytischen Zentren findet die Stoffumwandlung statt, während in allosterischen Zentren Effektoren binden, die die Reaktion beschleunigen (Aktivatoren) oder hemmen (Inhibitoren). Enzyme zeichnen sich in der Regel durch eine hohe Spezifität gegenüber den Substraten aus; ihre Reaktionsrate ist abhängig von Temperatur, pH-Wert, Metallionen- und Salzkonzentration. Freie Enzyme können in unterschiedlichen Konformationen vorliegen, die unterschiedliche Affinitäten zum Substrat besitzen. Durch die Bindung von Substratmolekülen kann es ebenfalls zu Änderungen der Enzymkonformation kommen, so dass die Anbindung weiterer Moleküle erschwert oder erleichtert wird. Abbildung 3.8 stellt drei Modellvorstellungen der Stoffumsetzung schematisch einander gegenüber. Die Enzyme sollen zwei katalytische Zentren für die Stoffumsetzung besitzen. Für die Fälle werden die Reaktionsraten zusammengestellt und der Verlauf der Kennlinien $r = f(S)$ kurz diskutiert.

Mechanismus A

Mechanismus A zeigt die wohl einfachste Modellvorstellung einer enzymatischen Stoffumsetzung. Substrat S bindet reversibel an das Enzym. Ist das Enzym mit einem (Komplex ES) oder mit zwei Substraten besetzt (Komplex ESS), wird im folgenden Reaktionsschritt das Produkt P gebildet und vom Enzym freigelassen. Der reversible Schritt der Substratanbindung verläuft im Gegensatz zur Stoffumwandlung sehr rasch, so dass ein Gleichgewichtszustand dieser Reaktionen angenommen werden kann. Unter dieser Annahme und unter der Berücksichtigung, dass für das erste Substratmolekül zwei Bindungsplätze zur Verfügung stehen,

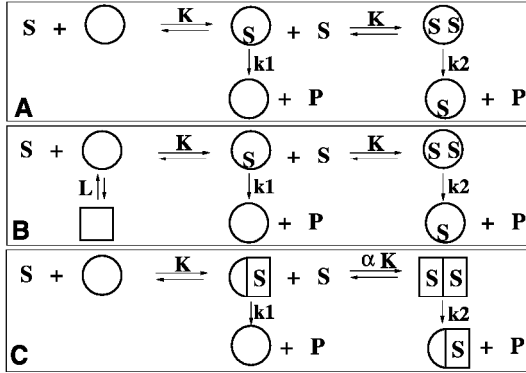


Figure 3.8: Modellvorstellungen für die Umsetzung eines einzigen Substrates durch ein Enzym. Die Unterschiede in den Mechanismen **A**, **B** und **C** werden im Text besprochen.

für das zweite nur der verbleibende freie Platz, ergibt sich die Reaktionsrate r mit der Gesamtenzymmenge c_{E0} und $k1 = k2 = k$ zu

$$r = 2 \frac{k c_S c_{E0}}{K + c_S} \quad (3.31)$$

Ein Sonderfall ergibt sich, wenn $k2 = 0$ ist und die Stoffumwandlung nur im einfach besetzten Enzym stattfindet. Die entsprechende Gleichung lautet mit $k1 = k$

$$r = 2 \frac{k c_S K c_{E0}}{(K + c_S)^2} \quad (3.32)$$

Mechanismus B

Reaktionsmechanismus B liegt eine Modellvorstellung zu Grunde, die von Jacques Monod entwickelt wurde [51], um experimentelle Daten zu erklären, die einen sigmoiden Verlauf zeigen und sich damit nicht mit der Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben ließen. Dabei liegt das freie Enzym in zwei Konformationen R und T vor. Das Substrat hat eine hohe Affinität zum R -Zustand und eine geringe oder gar keine Affinität zur T -Konformation. Es wird angenommen, dass sich die Konformationen im Grundzustand (freies Enzym) im Gleichgewicht befinden, wobei Konformation T in sehr hoher Konzentration vorliegt. Es muß allerdings die Substratkonzentration eine bestimmte Schwelle überschritten haben, damit eine

starke Änderung der Reaktionsrate bemerkt wird. Für den Fall, dass das Substrat nur in der R -Konformation anbindet, ergibt sich die Reaktionsrate r mit der Gesamtenzymmenge c_{E0} und $k_1 = k_2 = k$ sowie $L = \frac{T}{R}$ zu

$$r = \frac{2 k c_S (K + c_S) c_{E0}}{L K^2 + (K + c_S)^2} \quad (3.33)$$

Mechanismus C

Mechanismus C wurde alternativ zu Mechanismus B zur Beschreibung von Daten vorgestellt [4], die keinen hyperbolen Verlauf zeigen. Hier wird davon ausgegangen, dass sich das einzelne Enzymzentrum durch das Anbinden eines Substratmoleküls verändert. Wird die Anbindung von weiteren Substratmolekülen dabei erleichtert ($\alpha < 1$), spricht man von positiver Kooperativität. Im anderen Fall von negativer Kooperativität. Die Reaktionsrate r ergibt sich mit der Gesamtenzymmenge c_{E0} und $k_1 = k_2 = k$ zu

$$r = \frac{2 k c_S (K + \frac{c_S}{\alpha}) c_{E0}}{K^2 + 2 K c_S + \frac{c_S^2}{\alpha}} \quad (3.34)$$

Abbildung 3.9 zeigt den Verlauf der Substratsättigungskurven für die Fälle A, Sonderfall A mit $k_2 = 0$, B und C. Die Laufvariable ist $\frac{c_S}{K}$; auf der Y-Achse ist $\frac{r}{2 k c_{E0}}$ aufgetragen. Mechanismus A zeigt einen hyperbolen Verlauf der Kurve. Der Substratwert bei der halben Maximalrate entspricht gerade K . Der Anstieg im Ursprung berechnet sich zu $\frac{1}{K}$. Die Sättigungskurve für den Sonderfall A ist durch ein Maximum gekennzeichnet. Im Gegensatz zu allen anderen diskutierten Fällen geht die Sättigungskurve mit zunehmender Substratkonzentration gegen Null. Der Verlauf der Sättigungskurven für die Fälle B und C verläuft qualitativ gleich. Im Falle B liegt der Wendepunkt für große Werte für L im Bereich > 1 ($L = 0$ entspricht Mechanismus A); im Falle C liegt der Wendepunkt für kleine Werte von α im Bereich < 1 ($\alpha = 1$ entspricht wieder Mechanismus A).

Modellbibliothek reaktionskinetischer Ansätze

In der Modellbibliothek sind die Reaktionsgleichungen abgelegt. Die Strukturierungsmerkmale der Gleichungen betreffen den molekularen Aufbau des Enzyms, die Spezifität der Liganden zu den katalytischen und allosterischen Zentren sowie die Annahmen, die zur Modellvereinfachung gemacht werden. Hier stehen zwei Methoden zur Verfügung. Entweder wird ein "schnelles Gleichgewicht" für eine oder mehrere Reaktionen im Mechanismus angenommen oder man geht davon aus, dass sich die Zwischenkomplexe quasistationär verhalten. Beide Methoden

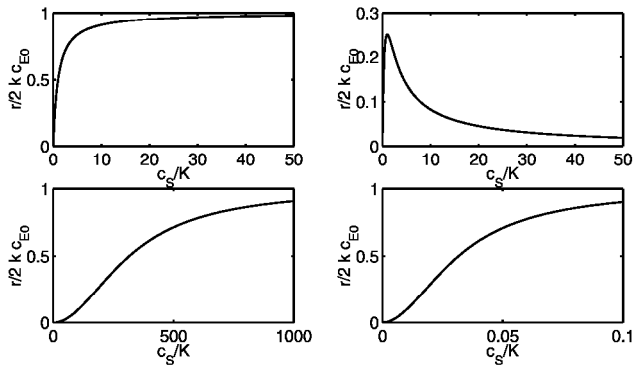


Figure 3.9: Sättigungskurven für Mechanismen A (oben links); Mechanismus A mit $k_2 = 0$ (oben rechts); Mechanismus B mit $L = 10^5$ (unten links) und Mechanismus C mit $\alpha = 10^{-3}$ (unten rechts).

verfolgen eine unterschiedliche Vorgehensweise bei der Ableitung der Geschwindigkeitsgesetze, lassen sich über die Analyse der zeitlichen Dynamik formal aber gleich behandeln (siehe Anhang A). In Tabelle 3.3 werden die Eigenschaften der oben diskutierten Modelle zusammengefasst.

Tabelle 3.4 gibt einen Teil der Modellbibliothek mit den wichtigsten Ansätzen wieder. Insgesamt umfasst die Bibliothek 54 Einträge. Abbildung 3.10 zeigt die Verschaltung des Steuerelements mit dem Stoffwandler.

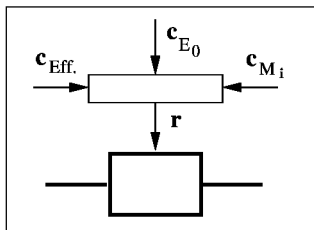


Figure 3.10: Steuerelement zur Ansteuerung des Stoffwandlers für enzymkatalysierte Reaktionen.

Tabelle 3.3: Übersicht über die Attribute zur Charakterisierung enzymkatalysierter Reaktionen. In den vorgestellten Mechanismen ist die Anbindung von Inhibitoren und Aktivatoren nicht vorgesehen. Diese können an andere Zentren (allosterische Zentren) oder aber auch an katalytische Zentren binden und beeinflussen so die Aktivität der Enzyme.

	Mech. A	Mech. B	Mech. C
<i>Molekularer Aufbau des Enzyms</i>			
Anzahl von katalytischen Zentren	2	2	2
Konformation, in der katalytische Umsetzung erfolgt	–	R	–
<i>Spezifität der Liganden</i>			
Wechselwirkung bei Anbindung der Substrate	–	–	Faktor α
Komplexe, die zur Produktbildung beitragen	ES (ESS)	R1,R2	ES, ESS
<i>Annahmen zur Modellreduktion</i>			
Stationarität der Zwischenkomplexe	–	–	–
Anbindungsschritte im schnellen Gleichgewicht	ja	ja	ja

3.4.3 Steuereinheit zur Ansteuerung des Modellbausteins Polymerisator

Der Polymerisator findet Verwendung bei der Beschreibung der Prozesse der Replikation, der Transkription und der Translation. Für die Ansteuerung der Bausteine sollen die entsprechenden Gleichungen abgeleitet werden.

Aufbau der DNA und der Prozess der Replikation

Die DNA liegt in Bakterien als ein ringförmiges, doppelsträngiges Molekül vor, welches aus den vier Desoxyribonukleotiden dATP, dTTP, dGTP und dCTP aufgebaut wird. Jeweils zwei gegenüberliegende Stränge sind über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden, wobei aber nur die Basenpaarkombinationen Adenin-Thymin und Guanin-Cytosin erlaubt sind. Das Genom von *Escherichia coli* besteht aus ca. 4.720.000 Basenpaaren [30]. Die Reihenfolge der Basenpaarkombinationen stellt die genetische Information dar. Eine bestimmte Anzahl von Basenpaaren (Gen) repräsentiert dabei den Bauplan für ein Protein. Die Gene liegen nicht alle direkt hintereinand, sondern sind durch nichtkodierende Bereiche (Kontrollsequenz³) getrennt, auf denen weitere Informationen gespeichert sind. So

³Der Begriff Kontrollsequenz meint hier den für das betreffende Gen/Operon relevanten Bereich an Bindungsstellen für Regulatorproteine und umfaßt den Promotor, den Operator und Bindestellen für

Tabelle 3.4: Beispiele für Reaktionsansätze aus der Modellbibliothek. MM: Michaelis-Menten-Typ; k : spezifische Aktivität; c_{E0} : Enzymkonzentration; c : Ligandkonzentration, dabei tiefgestellte Indizes: S, S1, S2 Substrate/Produkte; I Inhibitor; A Aktivator; α , β , K , L kinetische Parameter; a je nach Wahl der Parameter α_1 und α_2 .

Name der Kinetik	Reaktionsgleichung $r =$
Einsubstrat	
Michaelis-Menten in [4]	$\frac{k c_{E0} c_S}{K_S + c_S}$
Koshland Modell [32]	$\frac{k c_{E0} c_S (\alpha_1 K_S + \alpha_2 c_S)}{K_S^2 + 2 \alpha_1 c_S K_S + \alpha_2 c_S^2}$
Monod Modell (MWC)	$\frac{k c_{E0} c_S (1 + c_S/K_S)^{n-1}}{K_S ((1 + c_S/K_S)^n + L)}$
Einsubstrat mit Effektoren	
MM + komp. Inhib.	$\frac{k c_{E0} c_S}{K_S (1 + \frac{c_I}{K_I}) + c_S}$
MM + nichtkomp. Inhib. oder nichtess. Aktiv. a	$\frac{k c_{E0} c_S (1 + \frac{\alpha_1}{\alpha_2} \frac{c_E}{K_E})}{K_S (1 + \frac{c_E}{K_E}) + c_S (1 + \frac{c_E}{K_E} \frac{c_E}{\alpha_2})}$
MM + Substratübersch.	$\frac{k c_{E0} c_S (1 + \frac{\alpha_1}{\alpha_2} \frac{c_S}{K_S})}{K_A + c_A (1 + \frac{c_A}{K_A} \frac{c_S}{\alpha_2})}$
MM + ess. Aktiv.	$\frac{k c_{E0} c_S c_A}{(K_S + c_S) (c_A + K_A)}$
Monod Modell + allosterische Effektoren	$\frac{k c_{E0} c_S (1 + \frac{c_S}{K_S})^{n-1}}{K_S ((1 + \frac{c_S}{K_S})^n + L (1 + \frac{c_I}{K_I})^n (1 + \frac{c_A}{K_A})^n)}$
Zweisubstrat	
Reversible MM-Kinetik	$\frac{k c_{E0} (K_{S2} c_{S1} - \beta K_{S1} c_{S2})}{K_{S1} K_{S2} + K_{S2} c_{S1} + K_{S1} c_{S2}}$

erfolgt das Ablesen der Information und die Synthese von RNA (Transkription) nur, wenn das Protein RNA-Polymerase im Bereich der Kontrollsequenz angebunden hat (Abbildung 3.11). Neben der RNA-Polymerase können noch weitere regulatorisch wirkende Proteine an die Kontrollsequenz binden. Dies hat in der Regel Wechselwirkungen mit der Polymerase zur Folge und der Ablesevorgang kann gar nicht stattfinden oder wird verstärkt.

Der Zeitraum der Replikation setzt sich aus der DNA-Synthesephase (Zeit C) und der Zeit nach der Synthese bis zur Zellteilung (Zeit D) zusammen. Die genetische Information muß vollständig in doppelter Anzahl vorliegen, bevor sie auf die Tochterzellen verteilt werden kann. Man stellt bei Experimenten Verdopplungsweitere Effektoren, bspw. für *Crp*.

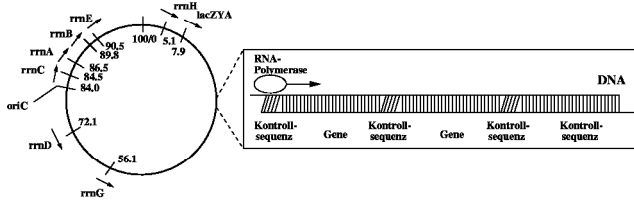


Figure 3.11: Genkarte von *E. coli*. Der Startpunkt der DNA Verdopplung (Origin, *oriC*) befindet sich bei Position 84. Die Strukturgene sind durch die Bereiche der Kontrollsequenzen voneinander getrennt, wobei jedem Strukturgen zumindest eine Kontrollsequenz vorsteht. In Ausnahmefällen finden sich Kontrollsequenzen auch mitten im Strukturgen.

zeiten von nur 20 Minuten fest und muß daher davon ausgehen, dass der Prozess der Replikation wieder beginnt, bevor die laufende Replikationsrunde vollständig abgeschlossen ist, da die minimale Zeit D auch etwa bei 20 Minuten liegt. Das bedeutet, dass sich die C und D Phasen überlagern (Abbildung 3.12). Der Prozess der Replikation beginnt immer an einer festen Stelle, dem Origin und wird über das Protein DNA-Polymerase katalysiert. Das DNA-Molekül wird in 100 Minuten eingeteilt. Somit kann der Startpunkt für ein Gen genau quantifiziert werden. Ausgehend vom Origin wird der neue Strang von zwei Seiten aus repliziert. Die Zellteilung kann erfolgen, wenn die DNA komplett in zweifacher Ausfertigung vorliegt. Wie in Abbildung 3.12 zu sehen ist, liegen Gene in der Nähe des Origins bei hohen Wachstumsraten in vielfacher Ausfertigung vor. Die *rrn* Gene, die ribosomale RNA kodieren und in der Nähe des Origins kodiert sind, liegen bei einer Wachstumsrate von $\mu = 2.08 \text{ 1/h}$ in fast 8-facher Menge vor. Folgende Beziehung wird von Cooper [10] angegeben, um die Anzahl von DNA-Kopien n_{DNA} bei einer Wachstumsrate μ in Abhängigkeit der Zeiten C und D zu ermitteln

$$n_{DNA} = \frac{1}{C\mu} \left(2^{\frac{(C+D)\mu}{\ln 2}} - 2^{\frac{D\mu}{\ln 2}} \right). \quad (3.35)$$

Berücksichtigt man die Position x eines bestimmten Genes auf der DNA so erhält man ebenfalls nach Cooper folgende Beziehung zur Ermittlung der Anzahl von Templates n_x eines bestimmten Genes

$$n_x = 2^{\frac{(D+C(1-x))\mu}{\ln 2}} \quad 0 \leq x \leq 1, \quad (3.36)$$

wobei $x = 0$ die Originstelle und $x = 1$ die Terminusstelle bedeutet. Die Zahlenwerte auf der Genkarte müssen entsprechend umgerechnet werden. Abbildung 3.13 zeigt den Verlauf der durchschnittlichen Kopienanzahl der DNA sowie

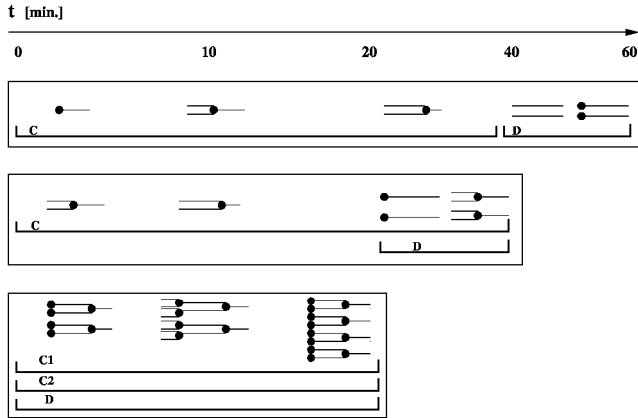


Figure 3.12: Darstellung der Anzahl von DNA Molekülen bei verschiedenen Verdopplungszeiten τ nach Cooper [10]. Zeile 1 zeigt den zeitlichen Verlauf des Replikationsprozesses für die Verdopplungszeit $\tau = 60$ Minuten. Zeilen 2 und 3 für $\tau = 40$ Minuten und $\tau = 20$ Minuten. Der schwarze Punkt markiert die Bewegung der DNA Polymerase auf der DNA. Nach der Verdopplung des DNA-Moleküls braucht die Zelle mindestens 20 Minuten (Zeit D), bis die Teilung abgeschlossen ist. Dies ist damit die kleinstmögliche Verdopplungszeit τ . Die Zeit C zur Replikation der DNA liegt zwischen 40 und 70 Minuten. Wie in Zeile 2 zu sehen ist, hat die Zelle zum Zeitpunkt $t = 0$ Minuten bereits ein Teil der DNA repliziert und fängt nach 20 Minuten wieder mit einer neuen Replikationsrunde an. Die Zeiten C und D überlappen sich also. Bei einer Verdopplungszeit von nur 20 Minuten braucht die Zelle 2 Generationen, um die DNA einmal abzulesen (Zeiten C1 und C2). Teile der DNA in der Nähe des Origins liegen hier bis zur achtfachen Anzahl vor.

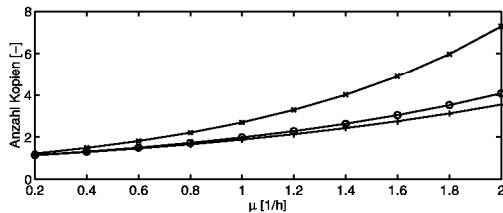
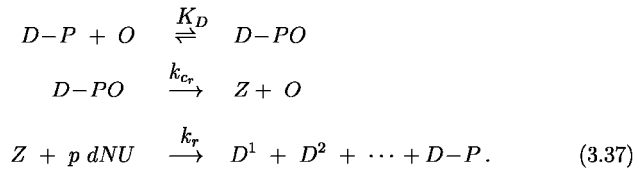


Figure 3.13: Verlauf der Kopienanzahl für DNA (o), Gen *rrnC* (x) auf der Position 84.5 und Gen *lac* (+) auf Position 7.9 in Abhängigkeit von der Wachstumsrate μ . Gene in der Nähe des Origins (Position 84) liegen in höheren Kopienzahlen vor.

zweiter Gene. Das Gen *rrnC* liegt in der Nähe des Origins; Gen *lac* etwas weiter entfernt (Abbildung 3.11).

Die Replikation soll hier nur am Rande betrachtet werden und daher nicht detailliert modelliert werden. Man kann aber davon ausgehen, dass die DNA Polymerase *DP* mit mit Origin *O* in Wechselwirkung steht (Komplexe $D-PO$, Z) und es nach folgendem Schema zur Synthese der DNA und damit der neuen Gene D^i kommt:



K_D ist die Affinität der DNA Polymerase zum Origin, k_{cr} und k_r sind Geschwindigkeitskonstanten. Abbildung 3.14 zeigt den formalen Aufbau der Signalwandlerbausteine zur Beschreibung der Syntheserate der Replikation. Für die Synthese der DNA lässt sich die Reaktionsgeschwindigkeit r_{Re} folgendermassen angeben:

$$r_{Re} = k_r \, c_Z. \tag{3.38}$$

Die Rate k_r lässt sich aus der Zeit C für die DNA Synthese (siehe oben) abschätzen. Diese hängt allerdings von Wachstumsrate μ ab. Die Steuerung der Replikation lässt sich gemäß Abbildung 3.14 mit den Bausteinen Koordinator und Steuereinheit beschreiben.

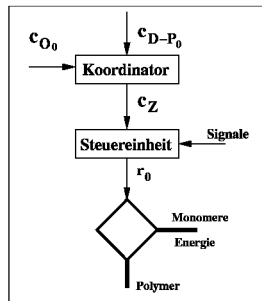


Figure 3.14: Darstellung der Modellbausteine Koordinator und Steuereinheit zur Beschreibung der Steuerung der Replikation. Neben der Größe c_Z können weitere Signale, z.B. die Abfolge der Basenpaare auf der DNA als Eingangsgrößen dienen.

Transkription

Im folgenden Unterkapitel soll die Synthese einer einzelnen mRNA mit den relevanten Schritten beschrieben werden. Anschliessend erfolgt die Definition der entsprechenden Modellbausteine. Ausgangspunkt der Überlegungen ist die Anbindung eines RNA Polymerase Moleküls P an den freien Promotor D^i . Die gebundene Polymerase bewegt sich anschließend entlang der DNA und macht dabei den Promotor wieder frei ('promoter clearance'). Mit der Bindung des ersten Nukleotids beginnt die Elongation.

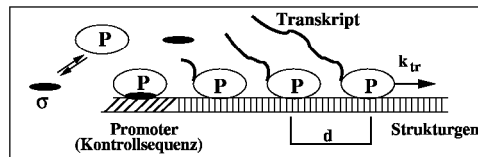
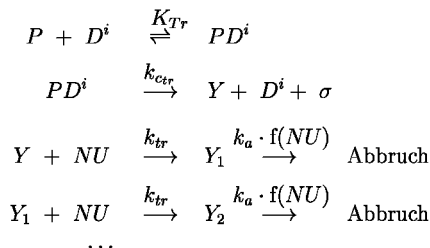


Figure 3.15: Prozess der Transkription im stationären Zustand. Die RNA-Polymerase bewegt sich mit der Geschwindigkeit k_{tr} auf der DNA entlang. Der Abstand zwischen zwei Polymerasen beträgt d Basenpaare.

In biologischen Veröffentlichungen wird darauf hingewiesen, dass sich die RNA-Polymerase mit einer konstanten Geschwindigkeit zwischen 40 und 85 Basenpaaren/Sekunde unabhängig von der Wachstumssituation bewegt [6]. Wenn man davon ausgeht, dass die Pools an Monomeren für den einzelnen Polymerisationsschritt keine Rolle spielen oder die Pools so gut reguliert sind, dass sie über einen großen Bereich der Wachstumsrate konstant sind, kann man annehmen, dass der einzelne Kettenwachstumsschritt unabhängig von der Monomerkonzentration ist. Allerdings muß man davon ausgehen, dass beim Unterschreiten einer minimalen Monomerkonzentration der Polymerisationsprozess abgebrochen wird.

Das betrachtete Gen habe die Länge von l Nukleotiden. Folgender Mechanismus wird ausgehend vom freien Polymerasemolekül P vorgeschlagen:





wobei die bei jedem Schritt frei werdende Pyrophosphatgruppe keine Berücksichtigung findet. NU steht für eines der vier Ribonukleotidphosphate ATP, CTP, GTP und UTP. Der Zerfall der Zwischenkomplexe bei einer Unterversorgung an Nukleotiden kann bspw. mit einer Kinetik vom Michaelis-Menten Typ beschrieben werden: $f(NU) = \frac{K_a}{K_a + NU}$. Für den Zerfall des fertigen RNA Moleküls wird eine Zerfallskinetik erster Ordnung mit der Konstanten k_z angenommen.

Die Interaktionen zwischen der RNA Polymerase und DNA Bindestellen ist oben mit einem Baustein vom Typ Koordinator beschrieben worden. Dieser kann hier in leicht modifizierter Form wieder Verwendung finden. Ausgangsgröße ist hier die Größe c_Y . Nimmt man wie oben an, dass sich der Komplex PD^i sehr schnell bildet und dass sich Y quasistationär verhält, so erhält man folgende Gleichungen für den Koordinator:

$$c_{PD^i} = \frac{c_P}{K_{Tr} + c_P} c_{D0^i} \quad (3.40)$$

$$c_Y = \frac{k_{ctr} c_{PD^i}}{k_{tr} + k_a f(NU)} \quad (3.41)$$

wobei davon ausgegangen wird, dass der Pool an freier RNA Polymerase durch diese Interaktion nicht beeinflusst wird. Zur Herleitung der Syntheserate für die RNA kann davon ausgegangen werden, dass sich auch für die Y_i ein stationärer Wert einstellt, da sie mit nahezu gleicher Geschwindigkeit gebildet und wieder verbraucht werden. Damit ergibt sich aus der Bilanzgleichung

$$\dot{c}_{Y_i} = k_{tr} c_{Y_{i-1}} - k_{tr} c_{Y_i} - k_a f(NU) c_{Y_i} \quad (3.42)$$

für den stationären Wert von c_{Y_i}

$$c_{Y_i} = \frac{k_{tr} c_{Y_{i-1}}}{k_{tr} + k_a f(NU)} = \frac{c_{Y_{i-1}}}{1 + k' f(NU)}, \quad (3.43)$$

mit $k' = \frac{k_a}{k_{tr}}$. Für das letzte Element Y_{i-1} ergibt sich

$$c_{Y_{i-1}} = \frac{c_Y}{(1 + k' f(NU))^{i-1}}. \quad (3.44)$$

Die Gleichung für die Syntheserate der mRNA lautet mit obigen Gleichungen:

$$r_{Tr} = k_{tr} \frac{c_Y (t - T_t)}{(1 + k' f(NU))^{i-1}}, \quad (3.45)$$

mit der Totzeit T_t , die die Zeit berücksichtigt, die das erste Polymerasemolekül braucht, um ein Molekül RNA zu synthetisieren. Sie kann über die Länge des

Strukturgen und die mittlere Geschwindigkeit der RNA-Polymerase abgeschätzt werden. Abbildung 3.16 zeigt den Koordinatorbaustein und die Steuereinheit für den Polymerisator. Eingangsgrößen in den Koordinator sind die freien Polymerasemoleküle c_P und die für das einzelne Gen relevante Promoterbindestelle c_{D^i} . Ausgangsgröße ist c_Y , welches mit der Steuereinheit verschaltet wird. Dort wird die Syntheserate r_{Tr} berechnet.

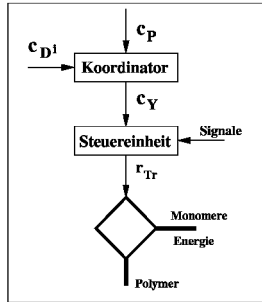


Figure 3.16: Darstellung der Modellbausteine Koordinator und Steuereinheit zur Ansteuerung des Modellbausteins Typ Polymerisator. Neben der Größe c_Y können weitere Signale, z.B. die Abfolge der Basenpaare auf der DNA als Eingangsgrößen dienen.

Aus dem vorgestellten Mechanismus kann die Anzahl der RNA Polymerasemoleküle, die sich auf der DNA befinden ausgerechnet werden. Dies soll für den Fall einer guten Nährstoffversorgung erfolgen, so dass die Abbruchterme vernachlässigt werden können. Es gilt dann:

$$c_{Y_{i-1}} = c_{Y_{i-2}} = \dots = c_Y. \quad (3.46)$$

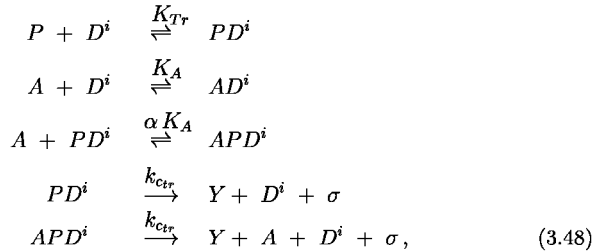
Die Polymerase “verteilt” sich auf die einzelnen Y_i so dass die Summe aller Y_i der aktiven Polymerasen $c_{P_{aktiv}}$ darstellt:

$$c_{P_{aktiv}} = l c_Y = l \frac{k_{ctr}}{k_{tr}} c_{P_{D^i}}, \quad (3.47)$$

wobei der Term $k_{ctr} c_{P_{D^i}}$ als Frequenz der Initiation interpretiert werden kann und k_{tr} die Geschwindigkeit der Polymerase auf der DNA darstellt.

Einfluss von Effektoren. Effektoren beeinflussen die Syntheserate der mRNA durch eine Veränderung der Initiationsfrequenz. Ein spezifischer Repressor konkurriert dabei mit der RNA Polymerase um den Promotor, während ein Aktivator die Affinität der Polymerase zum Promotor erhöht. Der Mechanismus kann dann

im Falle einer Aktivierung durch den Aktivator A folgendermassen erweitert werden:



K_A ist hier die Bindungsaffinität des Aktivators. Wird die frei zur Verfügung stehende Menge an A in einem weiteren Baustein bestimmt, so ergibt sich folgendes Gleichungssystem:

$$c_{PD^i} = \frac{c_P}{K_1 + c_P + \frac{K_1 c_A}{K_A} + \frac{c_P c_A}{\alpha K_A}} c_{D^i} \tag{3.49}$$

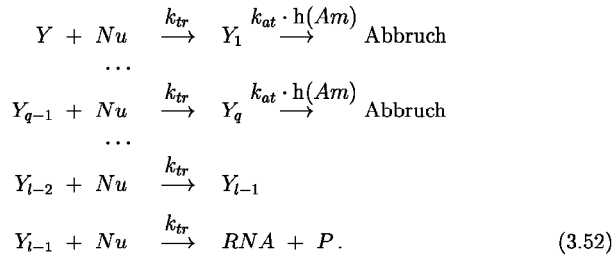
$$c_{APD^i} = \frac{c_A c_P}{\alpha K_1 K_A + \alpha K_1 c_A + \alpha K_A c_P + c_P c_A} c_{D^i} \tag{3.50}$$

$$c_Y = k_{ctr} \frac{c_{PD^i} + c_{APD^i}}{k_{tr} + k_a f(NU)}. \tag{3.51}$$

Regulation über Attenuation. Bei der Regulation über Attenuation kommt es zu einer vorzeitigen Beendigung der Transkription, d.h. die Syntheserate der RNA wird vermindert. Die biologischen Details sollen hier am Beispiel des Tryptophan Operons wiedergegeben werden. Die RNA-Polymerase bewegt sich nicht immer mit konstanter Geschwindigkeit auf der DNA, sondern pausiert an mehreren Stellen. Eine solche Pausenstelle wird bei der Transkription des *trp* Operons kurz nach Beginn erreicht. Die Pause der RNA-Polymerase hat die Bildung einer sekundären Struktur der gebildeten mRNA zur Folge, die einer Stoppstelle entspricht. In den ersten Schritten der unmittelbar begonnen Translation wird zweimal der Einbau der Aminosäure Tryptophan in die wachsende Proteinkette verlangt; die Polymerase befindet sich dabei noch in der sogenannten Leadersequenz. Liegt Tryptophan im Überschuß vor, kann diese Stelle vom Ribosom gut passiert werden. Das Ribosom folgt dicht der RNA-Polymerase, welche nun die Stoppstelle erreicht. Translation und Transkription werden beendet. Wird dagegen Tryptophan benötigt, kann das Ribosom die Stelle mit den zwei verlangten Tryptophan nur sehr schlecht passieren, da die Konzentration an Tryptophan niedrig und damit auch die Konzentration an beladener tRNA niedrig ist. Durch die Pause des Ribosoms kann sich die Stoppstelle nicht bilden, Translation und

Transkription können weitergehen. Das Signal für den Abbruch von Transkription und Translation ist die zelluläre Tryptophan Konzentration.

Für das folgende Schema wird von einer guten Nährstoffsituation ausgegangen. Die Leadersequenz umfasse q Nukleotide, die den Einbau der Aminosäure Tryptophan verlangen. Liegt Tryptophan in hoher Konzentration vor, so kommt es zum Abbruch von Transkription (und Translation).



Unter der Annahme, dass sich die Komplexe wieder quasistationär verhalten, ergibt sich für $c_{Y_{m-1}}$

$$c_{Y_{m-1}} = \frac{c_Y}{(1 + k'_{at} h(Am))^q} \tag{3.53}$$

mit $k'_{at} = \frac{k_{at}}{k_{tr}}$. Die Syntheserate für die RNA ergibt sich unter ansonsten günstigen Bedingungen zu:

$$r_{Tr} = k_{tr} \frac{c_Y(t - T_t)}{(1 + k'_{at} h(Am))^q} \tag{3.54}$$

Abbildung 3.17 zeigt mögliche Verläufe der Funktionen $f(Nu)$ und $h(Am)$ für die Transkription.

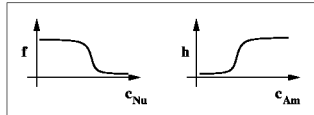
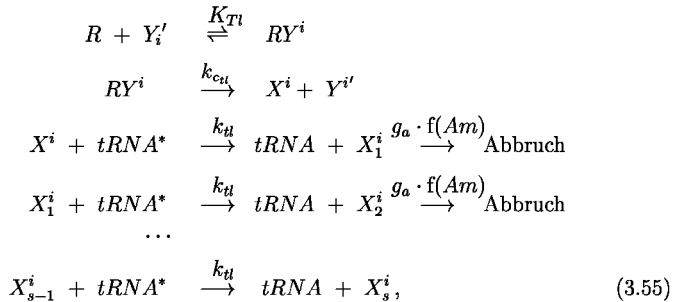


Figure 3.17: Funktionen $f(Nu)$ und $h(Am)$ in Gleichungen (3.51), (3.53) und (3.54): bei der Attenuation kommt es bei hoher Konzentration der Aminosäuren zum Abbruch.

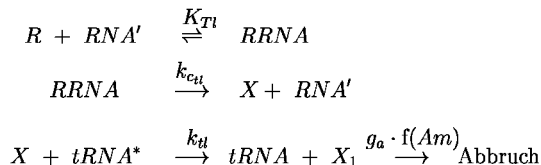
Translation

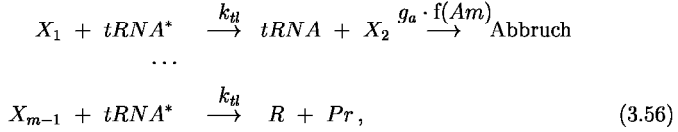
Für die Beschreibung der Translation kann analog vorgegangen werden. Der RNA Polymerase entspricht nun das Ribosom, die Bindestelle des Ribosoms, die Shine-Dalgarno Sequenz ist ein Abschnitt auf der RNA, der gleich zu Beginn von der Polymerase synthetisiert wird. Das erlaubt den Ribosomen die Proteinsynthese nach Start der Transkription: das Ribosom folgt der RNA Polymerase unmittelbar. Damit stellt praktisch jedes Y_i der Transkription oben eine Bindestelle für das Ribosom dar. Ein wesentlicher Unterschied besteht allerdings darin, dass die Translation mit der bereits fertigen RNA weiterläuft, dies also einen weiteren Verstärkungsfaktor bedeutet. Ein Abbruch der Translation kann erfolgen, wenn nicht genügend beladene tRNA zur Verfügung stehen. Die Interaktionen der freien Ribosomen mit den Y_i lässt sich mit folgendem Mechanismus beschreiben:



wobei Y_i' mit Ribosomen un belegte Bindestellen darstellen. Der Index s zeigt an, wieviele Aminosäuren anbinden können. Da die Polymerase noch beim Ablesen der genetischen Information ist - sie hat die Position i erreicht - kann s aus $s = i \cdot \frac{m}{3}$ ermittelt werden, wenn m die Anzahl der eingebauten Aminosäuren am Ende des Prozesses bezeichnet. Da 3 Nukleotide für eine Aminosäure kodieren ergibt sich $\frac{m}{3} = 1/3$. Die Grössen $tRNA^*$ und $tRNA$ repräsentieren mit Aminosäuren belegte und un belegte tRNA.

Für die Interaktionen der freien Ribosomen mit dem fertigen RNA Molekül gilt entsprechend:





wobei hier die Kette vollständig durchlaufen werden kann.

Die Gleichungen für den Koordinatorbaustein ergeben sich unter der Annahme einer schnellen Anbindung der Ribosomen zu:

$$c_{RY^i} = \frac{c_R}{K_{Tl} + c_R} c_{Y^i} \tag{3.57}$$

$$c_{RRNA} = \frac{c_R}{K_{Tl} + c_R} c_{RNA} \tag{3.58}$$

$$c_{X^i} = \frac{k_{eul} c_{RY^i}}{k_{tl} + g_a f(Am)} \tag{3.59}$$

$$c_X = \frac{k_{eul} c_{RRNA}}{k_{tl} + g_a f(Am)} \tag{3.60}$$

Analog der Vorgehensweise oben, kann davon ausgegangen werden, dass sich alle X_k mit ähnlicher Rate bilden und verbraucht werden. Es ergibt sich aus der Bilanzgleichung:

$$\dot{c}_{X_k} = k_{tl} c_{X_{k-1}} - k_{tl} c_{X_k} - g_a f(Am) c_{X_k} \tag{3.61}$$

für den stationären Wert von c_{X_k} mit $g' = \frac{g_a}{k_{tl}}$

$$c_{X_k} = \frac{c_{X_{k-1}}}{1 + g' f(Am)}. \tag{3.62}$$

Für das Element X_{m-1} ergibt sich

$$c_{X_{m-1}} = \frac{c_X}{(1 + g' f(Am))^{m-1}}. \tag{3.63}$$

Es ergibt sich für die Syntheserate r_{tl} des Proteins:

$$r_{tl} = \frac{k_{tl}}{(1 + g' f(Am))^{m-1}} c_X. \tag{3.64}$$

Abbildung 3.18 zeigt die Verschaltung der Bausteine der Translation.

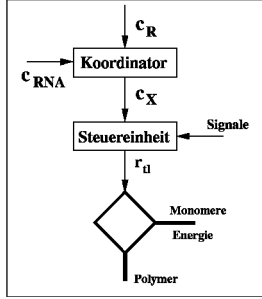


Figure 3.18: Darstellung der Modellbausteine Koordinator und Steuereinheit zur Beschreibung der Translation. Neben der Größe c_X können weitere Signale, z.B. die Abfolge der Basenpaare auf der RNA als Eingangsgrößen dienen.

Die Anzahl der aktiven Ribosomen kann aus folgenden Überlegungen für einen Porzess mit ausreichender Nährstoffversorgung hergeleitet werden: Betrachtet man das fertige RNA Molekül so verteilen sich die Ribosomen auf alle X_k und man erhält mit

$$c_{X_{m-1}} = c_{X_{m-2}} = \dots = c_X \quad (3.65)$$

für die aktiven Ribosomen $c_{R_{aktiv}}$:

$$c_{R_{aktiv}}^{RNA} = m c_X = m \frac{k_{cl}}{k_{tl}} c_{RRNA}. \quad (3.66)$$

Betrachtet man die einzelnen Y_i so hängt die Anzahl der Ribosomen vom Ort i , den die Polymerase zurückgelegt hat ab. Es ergibt sich für die Polymerase am Ort i :

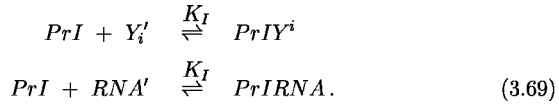
$$c_{R_{aktiv}}^i = s \cdot c_{X^i} = i \frac{m}{l} \frac{k_{cl}}{k_{tl}} c_{RY^i}. \quad (3.67)$$

Die Summe über alle i liefert dann mit den Gleichungen 3.46 und 3.57:

$$\sum_i c_{R_{aktiv}}^i = \frac{m}{l} \frac{k_{cl}}{k_{tl}} \sum_i i c_{RY^i} = m \frac{(l-1)}{2} \frac{k_{cl}}{k_{tl}} \frac{c_R}{K_{Ti} + c_R} c_Y. \quad (3.68)$$

Einfluss von Effektoren: Feedback Inhibition der Translation. Bei der Initiation der Translation kann es ebenfalls zu Wechselwirkungen mit Effektoren kommen. So unterliegt die Synthese von ribosomalem Protein einer Autoregulation [53].

Dabei konkurriert ribosomales Protein mit den Ribosomen um die Ribosomenbindungstelle auf der mRNA. Liegt ribosomales Protein im Überschuß vor, bspw. weil die Synthese von rRNA vermindert wurde und dadurch keine Ribosomen gebildet werden können, dann führt dieser Überschuß zu einer Reduktion der Synthese von ribosomalem Protein. Gleichungssystem 3.56 kann um folgende Reaktionsgleichungen erweitert werden, wobei PrI ein inhibitorisch wirkendes Protein darstellt, welches mit der Affinität K_I anbindet.



Die entsprechenden Gleichungen für c_{RY_i} und c_{RRNA} werden entsprechend erweitert

$$c_{RY_i} = \frac{c_R}{K_{Tl} + c_R + \frac{K_{Tl} c_{PrI}}{K_I} c_{Y_i}} \quad (3.70)$$

$$c_{RRNA} = \frac{c_R}{K_{Tl} + c_R + \frac{K_{Tl} c_{PrI}}{K_I} c_{RNA}}. \quad (3.71)$$

3.4.4 Synthese von Alarmonen durch einen enzymatischen Schritt

Die Synthese von Signalmolekülen erfolgt durch einen enzymatischen Schritt, wobei in der Regel das Enzym konstitutiv in der Zelle vorliegt oder so reguliert ist, dass seine Konzentration nur kleinen Schwankungen unterliegt. Durch allosterische Wechselwirkungen mit Effektoren kann das Enzym aktiviert werden und bildet dann die Signalsubstanz. Wie in Abbildung 3.19 gezeigt, besitzt der Signalwandler vom Typ SigEnz Eingänge für das Protein und den Effektor; der Ausgang ist die Konzentration des Signalmoleküls.

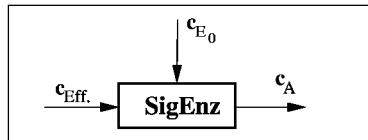


Figure 3.19: Signalwandlerbaustein vom Typ SigEnz.

Um die Dynamik der Synthese richtig zu erfassen, wird für das Signalmolekül A eine Differentialgleichung verwendet, wobei die Syntheserate r_{syn} in Abhängigkeit

von Protein- und Effektorkonzentration anzuschreiben ist und unter Umständen ein Abbauterm r_{ab} zu berücksichtigen ist.

$$\frac{d c_A}{dt} = r_{syn} - r_{ab} - \mu c_A. \quad (3.72)$$

Im Falle einer essentiellen Aktivierung des Enzyms durch den Aktivator Eff ergibt sich für r_{syn}

$$r_{syn} = k c_{E0} \frac{c_{Eff}}{K_{Eff} + c_{Eff}}, \quad (3.73)$$

wobei c_{E0} die Enzymkonzentration und c_{Eff} die Effektorkonzentration ist.

Kapitel 4

Definition aggregierter Modellbausteine

Das Modellierungskonzept bietet die Möglichkeit, elementare Modellbausteine zu höher strukturierten Einheiten zu verschalten. Diese aggregierten Modellbausteine stellen die wesentlichen Strukturierungselemente der Biophase dar und werden als Funktionseinheiten bezeichnet.

In der “Metabolic Control Theory” hat man versucht, durch rein formale Kriterien sogenannte “monofunctional units” zu definieren [27, 66]. Die Kriterien basieren auf dem Aufbau der stöchiometrischen Matrix des zu Grunde gelegten Reaktionsnetzwerkes. Eines der Kriterien besagt, dass keine Konservierungsbedingungen zwischen zwei Subsystemen bestehen dürfen. Dieses Kriterium ist für große Teile des Stoffwechsels nicht gültig, da globale Speichergrößen für Energie (ATP, ADP) und Redox (NAD, NADP) in vielen Reaktionen beteiligt sind. In dieser Arbeit sollen biologisch motivierte Kriterien herangezogen werden. Damit soll garantiert werden, dass den mathematischen Modellbausteinen auch zelluläre Bausteine entsprechen.

Die aggregierten Modellbausteine zeichnen sich durch eine gewisse Abgeschlossenheit gegenüber ihrer Umgebung aus. Um bei der Definition von Funktionseinheiten diese Abgeschlossenheit überprüfen zu können, werden folgenden Kriterien herangezogen:

- i. Alle Komponenten einer Untereinheit sind an eine gemeinsame physiologische Funktion angepaßt.

Kriterium i. zielt zum einen darauf ab, Elemente zusammenzufassen, die zur Synthese oder zum Abbau eines bestimmten Metaboliten notwendig sind. Dabei handelt sich um Stoffwechselwege zum Abbau von Nährsubstraten, zum Aufbau von

Zwischenprodukten und Sekundärmetaboliten sowie um Prozesse zur Synthese von Makromolekülen. Kriterium i. kann auch Anwendung finden, um Metabolite, die Energie- oder Redoxäquivalente darstellen, zusammenzufassen. Zum anderen kann Kriterium i. auch herangezogen werden, Modellbausteine für Signaltransduktionssysteme festzulegen. Dabei werden Signalwandlerbausteine miteinander verknüpft.

- ii. Die für die Funktion einer Untereinheit zuständigen Gene werden koordiniert exprimiert.

Kriterium ii. bezieht sich auf die Strukturierung der Gene auf der DNA. Einzelne Gene oder eine Gruppe von Genen, die auf der DNA direkt hintereinander liegen *und* die eine gemeinsame Kontrollsequenz besitzen sind Basis dieses Kriteriums. Bei Prokaryoten wird der Ausdruck Operon verwendet.

- iii. Die Elemente einer Einheit werden über ein gemeinsames Signalverarbeitungssystem koordiniert.

Kriterium iii. stellt die Prozesse der Signalübertragung als wesentliches Strukturierungsmerkmal heraus und erlaubt die Zusammenfassung von einzelnen Enzymen zu Stoffwechselfaden, als auch die Zusammenfassung von Stoffwechselfaden zu hoch strukturierten Einheiten. In der Regel genügen diese Einheiten dann auch Kriterium i., denn sie sind auf bestimmte Aufgaben im Stoffwechsel, wie bspw. den Transport, ausgerichtet. Wie unten gezeigt wird, stellt Kriterium iii. die Basis zur Definition von Multigen-Systemen dar, die bei Bakterien als "Regulon" und "Modulon" bezeichnet werden. Dazu ist es noch notwendig, eine Klassifikation der Signaltransduktionssysteme durchzuführen.

Das Strukturierungsmerkmal richtet sich nach dem Ausgang des Systems. Regulatoren sind regulatorisch wirkende Proteine, welche auf den Kontrollsequenzen der DNA eine oder mehrere physiologisch relevante Bindungsstellen besitzen. Regulatorproteine können durch Signalstoffe oder unterschiedliche σ -Faktoren in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Kontrolliert der Regulator den Abbau oder die Synthese eines einzelnen Stoffes, so besitzt er nur eine kleine Anzahl von Bindungsstellen auf der DNA. Im folgenden werden hierfür die Begriffe spezifischer Regulator und spezifisches Signaltransduktionssystem benutzt. Regulatoren, die die Synthese oder den Abbau von mehreren Stoffen regulieren, werden als globale Regulatoren, die Signaltransduktionssysteme dementsprechend als globale Signaltransduktionssysteme bezeichnet.

Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über spezifische und globale Regulatoren sowie Beispiele für beteiligte Gene/Operons und ihre Funktion im Stoffwechsel. Im folgenden sollen Funktionseinheiten unter Anwendung der oben aufgeführten Funktionseinheiten definiert werden. Analog zu den elementaren Modellbausteinen

Tabelle 4.1: Übersicht über spezifische und globale Regulatoren und ihre Signaltransduktionselemente.

Regulator	Gen/Operon	Funktion
spezifisch		
LacI	<i>lacZYA</i>	Abbau Lactose
GalR	<i>galETKM</i>	Abbau Galactose
AraC	<i>araBAD,</i> <i>araE, araFG</i>	Abbau Arabinose
TrpR	<i>trpEDCBA</i>	Synthese Tryptophan
global		
Crp	<i>lac, ara,</i> <i>gal, cya,</i> <i>ptsG, crp</i>	Kataboliten Repression
ppGpp	<i>rrn</i>	Synthese sRNA
ArcA	<i>gltA, icd,</i> <i>suc, sdh</i>	Aerobe Atmung
σ^{32}	<i>htpX, htpG</i>	Hitzeschock

sind auch hier die Ein- und Ausgänge sowie eine mathematische Beschreibung festzulegen.

4.1 Modellbausteine zur Beschreibung der Genexpression

Die Synthese eines Proteins verlangt zwei miteinander gekoppelte Polymerisationsprozesse: Transkription und Translation. Zunächst soll der Transkriptionsbaustein betrachtet werden (Abbildung 4.1), dessen Aufgabe die Bereitstellung von RNA ist. Der neue Modellbaustein läßt sich mit zwei elementaren Modellbausteinen vom Typ Signalwandler sowie mit einem Stoffwandler vom Typ Polymerisator, einem Stoffwandler vom Typ enzymatische Reaktion (RNA-Abbau) und einem Modellbaustein vom Typ Stoffspeicher mit genetischer Information aufbauen. Die mathematischen Gleichungen zur Beschreibung des Modellbausteins ergeben sich durch eine Zusammenstellung der Gleichungen der entsprechenden elementaren Modellbausteine und sind Tabelle 4.2 zusammengestellt. Analog kann der Aufbau des Translationsbausteins erfolgen. Die jeweils verwendeten elementaren strukturellen Modellbausteine sind identisch (siehe ebenfalls Tabelle 4.2).

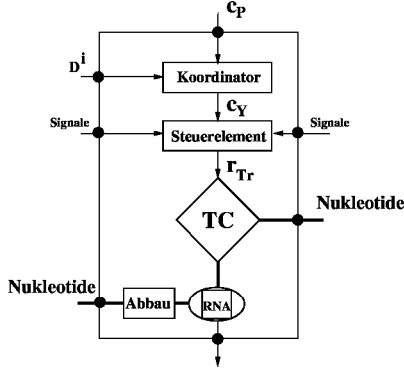


Figure 4.1: Transkriptionsbaustein. Die Anschlußstellen für diesen Modellbaustein sind durch schwarze Punkte gekennzeichnet. Die Information der DNA D^i geht an zwei Stellen in den Baustein ein: (i) Über den Koordinatorbaustein wird die Interaktion der Kontrollsequenz mit der Polymerase beschrieben. (ii) Über das Steuerelement kann die Strukturinformation berücksichtigt werden.

4.1.1 Modellbaustein Expressor

Der Baustein der Genexpression in Abbildung 4.2 zeigt die Verschaltung der Funktionseinheiten der Transkription und der Translation.

Für den Fall einer guten Nährstoffversorgung lautet die Gleichung für die Synthese von RNA

$$\frac{d c_{RNA}}{dt} = \frac{k_{ctr} c_P}{K_{Tr} + c_P} c_{D0^i} - (k_z + \mu) c_{RNA}. \quad (4.1)$$

Betrachtet man nun einen stationären Zustand der RNA Konzentration, so ergibt sich für die Syntheserate des Proteins folgender Ausdruck, wenn die entsprechenden Terme alle eingesetzt werden:

$$r_{Tr} = \frac{k_{ctr} c_P}{K_{Tr} + c_P} \frac{k_{cl} c_R}{K_{Tr} + c_R} \frac{1}{k_z} c_{D0^i} \quad (4.2)$$

Demnach ist die Rate proportional zur Anzahl der Promotorbindestellen c_{D0^i} . Die beiden ersten Faktoren stellen die Initiationsfrequenz der Transkription bzw. der Translation dar. Eine hohe Abbaurrate k_z der RNA sorgt dafür, dass weniger Bindestellen für die Ribosomen zur Verfügung stehen. Bei der Erstellung des Modells in Kapitel 6 wird die Initiation der Translation nicht betrachtet. Allerdings spielen Effektoren bei der Initiation der Transkription eine Rolle. Abbildung 4.3

Tabelle 4.2: Übersicht über den Modellbaustein zur Beschreibung der Genexpression. Die Transkriptionseffizienz η_{TC} und die Translationseffizienz η_{TL} werden in übergeordneten Signalwandlerbausteinen berechnet.

Modellbaustein	Signal- eingang	Signal- ausgang	Gleichung
Transkription			
Koordinator	$c_P, c_{D_0^i}, c_{Nu}$	c_Y	$c_{PD^i} = \frac{c_P}{K_{Tr} + c_P} c_{D_0^i}$ $c_Y = k_{ctr} \frac{c_{PD^i}}{k_{tr} + k_a f(NU)}$
Steuerelement	c_Y, c_{Nu}	r_{Tr}	$r_{Tr} = k_{tr} \frac{c_Y (t - T_i)}{(1 + k' f(NU))^{l-1}}$
Stoffwandler	r_{Tr}		$\gamma_{tr} r_{Tr}$
Stoffspeicher		c_{RNA}	$\frac{d c_{RNA}}{dt} = r_{Tr} - (k_z + \mu) c_{RNA}$
Translation			
Koordinator	c_R, c_{RNA}, c_{Am}	c_X	$c_{RRNA} = \frac{c_R}{K_{Tl} + c_R} c_{RNA}$ $c_X = k_{cu} \frac{c_{RRNA}}{k_{tl} + g_a f(Am)}$
Steuerelement	c_X, c_{Am}	r_{Tl}	$r_{Tl} = \frac{k_{tl}}{(1 + g' f(Am))^{m-1}} c_X$
Stoffwandler	r_{Tl}		$\gamma_{tl} r_{Tl}$
Stoffspeicher		c_{Pr}	$\frac{d c_{Pr}}{dt} = r_{Tl} - \mu c_{Pr}$

zeigt eine vereinfachte Symbolik für den Expressorbaustein mit den entsprechenden Gleichungen. Die Rechnungen oben zeigen, dass zur Berechnung von c_Y die Geschwindigkeiten k_{ctr} und k_{tr} benötigt werden. Da diese für die einzelnen Gene in den Anwendungsbeispielen nicht zur Verfügung stehen, wird unten c_Y nur als Funktion der Signale angegeben und der Parameter k zur Berechnung der Syntheserate der Proteine aus den Messungen und aus Literaturwerten abgeschätzt.

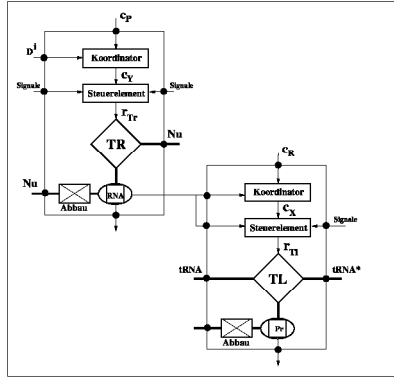


Figure 4.2: Expressionsbaustein. Die Anschlußstellen für diesen Modellbaustein sind durch schwarze Punkte gekennzeichnet. Die Verschaltung berücksichtigt, dass neben der fertigen RNA, auch die sich gerade bildenden Moleküle zur Syntheserate beitragen. Dazu ist der Ausgang des Koordinators der Transkription mit dem Koordinator der Translation verschaltet.

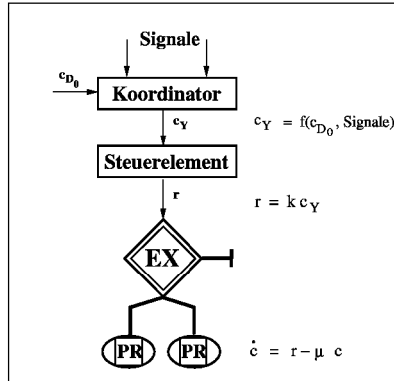


Figure 4.3: Expressionsbaustein für das Modell in Kapitel 6. Der Ausgang c_Y aus dem Koordinatorbaustein ergibt sich aus der Lösung eines algebraischen Gleichungssystems. Wie in Kapitel 3 gezeigt, werden in diesem die Signale von Effektoren miteinander verrechnet. Im Steuerelement wird die Rate der Proteinsynthese berechnet.

4.2 Stoffwechselweg

Die im folgenden vorgestellte Funktionseinheit *Stoffwechselweg* faßt einen oder mehrere Modellbausteine vom Typ Expressor, Signalwandlerbausteine sowie Metabolite zusammen. Der Stoffwechselweg zeichnet sich durch ein spezifisches Signaltransduktionssystem aus.

Diese Funktionseinheit kann in zwei Teilnetzwerke aufgeteilt werden, die hauptsächlich über Signalleitungen verbunden sind. Das Stoffwechselnetzwerk umfaßt dabei die

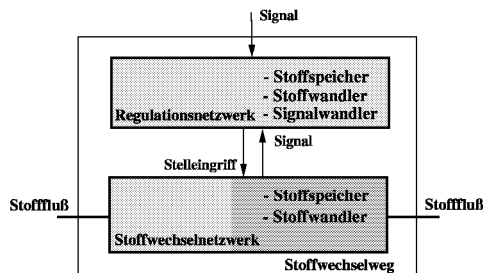


Figure 4.4: Die Funktionseinheit Stoffwechselweg mit den beiden Teilnetzwerken Stoffwechsel- und Regulationsnetzwerk. Der Stofffluß wird über den Stelleingriff (Enzymmenge und -aktivität) eingestellt. Der Stofffluß im Regulationsnetzwerk zur Synthese der Enzyme ist von untergeordneter Bedeutung.

Stoffflüsse, während das Regulationsnetzwerk die Synthese der benötigten Enzyme und die Signalübertragung beschreibt.

4.2.1 Aufbau eines Stoffwechselwegs

Betrachtet man die in Abbildung 4.5 gezeigten Abbaureaktionen für einige Kohlenstoffquellen, so stellt man fest, dass diese am Ende gemeinsame Metabolite (Glc6P, Fru6P, TrioP) besitzen. Diese sind Teil eines Stoffwechselweges, der als "zentraler Kohlenhydratabbau" bezeichnet wird. Es erscheint zunächst zweckmäßig, für jeden Zucker jeweils Stoffspeicher und Stoffwandler zusammenzufassen, die zu diesem zentralen Kohlenhydratabbauweg führen (Kriterium i.). Wie in der Abbildung zu sehen ist, führt die Anwendung dieses Kriteriums zu Überschneidungen, da Elemente zu mehreren Einheiten gehören können. Dies wird besonders bei den Abbaureaktionen für Lactose und Galactose deutlich. Das Enzym *LacZ* (β -Galactosidase) spaltet die intrazelluläre Lactose in Glucose und

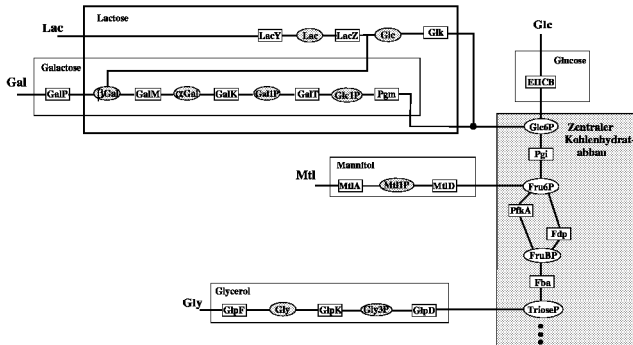


Figure 4.5: Anwendung des Kriterium i. zur Abgrenzung von Funktionseinheiten. Gezeigt sind Abbaupfade der Kohlenhydrate Glucose (Glc), Lactose (Lac), Galactose (Gal) (nicht alle Enzyme eingezeichnet) Mannitol (Mtl) und Glycerin (Gly). Auf Grund der Überschneidung der Wege für Lactose und Galactose, ist der Lactose Abbaupfad stärker hervorgehoben.

Galactose, die über ihre spezifischen Stoffwechselwege weiter abgebaut werden. Eine verbesserte Strukturierung kann durch die Anwendung der Kriterien ii. und iii. erfolgen. Bei Kriterium ii. spielt die genetische Struktur eine wesentliche Rolle, bei Kriterium iii. die Signaltransduktion. Abbildung 4.6 zeigt den Stoffwechselweg Lactose nach Anwendung der beiden Kriterien.

Im aggregierten Modellbaustein für den Lactoseabbau wird die Synthese der zwei physiologisch relevanten Enzyme *LacZ* und *LacY* beschrieben. Die entsprechenden Gene liegen direkt hintereinander auf der DNA und können mit einem einzigen Modellbaustein vom Typ Expressor beschrieben werden (Kriterium ii.). Für die Regulation des Operons ist hier nur die Initiation der Transkription von Bedeutung. Das Produkt aus dem Expressor *lacI* ist ein Protein, welches spezifisch für Lactose an der Regulation der Expression des *lacZYA* Operon beteiligt ist. Die Eingangssignale c_P und c_{Crp} repräsentieren den Einfluß der übergeordneten Regulation. Eine Methode zur Verrechnung dieser Signale mit *LacI* im Baustein Koordinator wird im nächsten Abschnitt vorgestellt.

Die Enzymmengen von *LacZ* und *LacY* sind Signaleingänge in die Stoffwandler, die durch ihre Stöchiometrie gekennzeichnet sind. Das Stoffwechselnetzwerk wird durch die Metabolite *Lac* und *Allo* vervollständigt. Die spezifische Regulation erfolgt nach dem Prinzip der Induktion. Der Metabolit Allolactose inaktiviert dabei den Repressor *LacI*, der dann den Prozess der Transkription nicht mehr blockieren kann. Die Abgeschlossenheit des Bausteins wird deutlich, da alle wesentlichen

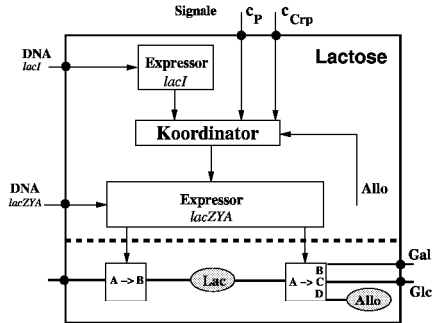


Figure 4.6: Aggregierter Modellbaustein für den Stoffwechselweg Lactose. Regulationsnetzwerk und Stoffwechselnetzwerk sind durch die gestrichelte Linie getrennt. Die Ein- und Ausgänge der Funktionseinheit sind durch schwarze Punkte gekennzeichnet.

Signale, die für die Einstellung des Stoffflusses benötigt werden – also die Konzentrationen von LacI, von den Enzymen LacY und LacZ und von Allolactose – im Baustein selbst verarbeitet werden.

4.3 Stoffwechselblock

Die Funktionseinheit Stoffwechselblock ist ein aggregierter Modellbaustein, dessen Elemente Stoffwechselwege und globale Signaltransduktionssysteme sind (Kriterium iii.). Abbildung 4.7 zeigt ein allgemeines Schema eines Stoffwechselblocks.

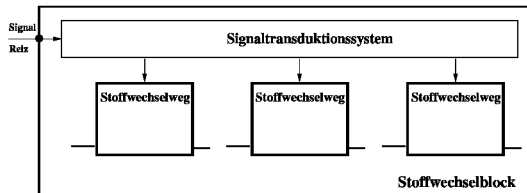


Figure 4.7: Allgemeines Schema eines Stoffwechselblocks.

Für den Stoffwechselblock *crp* Modulon wird in Kapitel 6 ein detailliertes Modell erstellt. Abbildung 4.8 zeigt die verwendeten Stoffwechselwege und Signaltrans-

duktionssysteme. Der Modellbaustein besitzt zwei Signaleingänge. Die externe

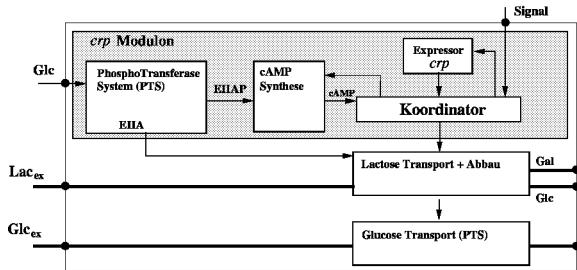


Figure 4.8: Stoffwechselblock *crp* Modulon mit Signaltransduktionssystem und Stoffwechselwegen.

Glucose ist ein Signal für das PTS; der zweite Signaleingang stellt die Wechselwirkung der RNA-Polymerase mit dem Protein Crp dar. Dieses Signal wird im Koordinatorbaustein weiterverarbeitet und dient als Eingang für die Stoffwechselwege.

Die Interaktionen bei der Initiation der Transkription der Lactose und Glucose abbauenden Enzyme sind allerdings recht kompliziert: Das Protein Crp erhöht die Affinität der Polymerasebindung an die DNA und es kommt zu einer Aktivierung des Ablesevorgangs. Es gibt aber auch Wechselwirkungen zwischen dem im Lactose Stoffwechselweg wirkenden spezifischen Regulator LacI und der Polymerase. Beide Proteine konkurrieren um sich überlappende Bindungsstellen auf der DNA Kontrollsequenz. Blockiert LacI die Anbindung der Polymerase, kann das Ablesen der Gene nicht erfolgen. Neben diesen Wechselwirkungen sind auch Interaktionen zwischen Crp und LacI beschrieben [23]. Interessanterweise zeigen diese Wechselwirkungen eine positive Kooperativität, was für ein positiv und ein negativ wirkendes Regulatorprotein zunächst nicht ganz einsichtig scheint. Die physiologische Bedeutung wird klar, wenn man sich vorstellt, dass sich die Zelle auf die Möglichkeit einer schlechteren Versorgung mit Nährstoffen einstellt. Durch den kooperativen Effekt der beiden Regulatoren Crp und LacI ist die Zelle in der Lage, noch schneller auf die Notwendigkeit der Synthese der entsprechenden Enzyme zu reagieren. Durch die positive Kooperativität sind mehr Crp Moleküle bereits auf der DNA gebunden. Fällt das Regulatorprotein LacI durch Zugabe von Lactose von der DNA ab, so führt die erhöhte Anzahl von Crp Molekülen zu einer rascheren Expression.

Die Wechselwirkungen im Stoffwechselblock *crp* Modulon lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

RNA-Polymerase – LacI	Kompetition um Bindestellen: LacI blockiert Ablesen der Gene
RNA-Polymerase – Crp	Aktivierung der Anbindung: Crp erhöht Bindungs-Affinität der Polymerase
Crp – LacI	positive Kooperativität: ermöglicht rasche Umstellung des Stoffwechsels

Für die Strukturierung der Funktionseinheiten ergibt sich nun folgendes Problem: Änderungen der Konzentration eines Proteins auf der Ebene eines einzelnen Stoffwechselwegs haben infolge der beschriebenen Wechselwirkungen Änderungen in darüber liegenden Ebenen zur Folge. Gleiches gilt für Änderungen auf der Ebene des Stoffwechselblocks, die sich auf Stoffwechselwege und auf übergeordnete Ebenen auswirken. Das bedeutet, dass alle Proteine, die miteinander in Wechselwirkungen stehen, mit einem einzigen Modellbaustein beschrieben werden müssten, der eine Unzahl von Ein- und Ausgängen aufzuweisen hätte.

Folgende Eigenschaft der Regulatorproteine kann aber für eine Strukturierung und damit zur Lösung des gestellten Problems ausgenutzt werden: Die Anzahl der Bindungsstellen für Regulatorproteine auf der Ebene des Stoffwechselwegs sind sehr viel kleiner als auf den darüber liegenden Ebenen. Dies liegt daran, dass die Stoffwechselwege, die ja spezifisch für einen einzigen Metaboliten sind, durch eine kleine Anzahl von Genen und Operons gekennzeichnet sind. Man kann davon ausgehen, dass sich diese Änderungen in einer übergeordneten Ebene nicht bemerkbar machen, da dort die Anzahl der Bindestellen um ein Vielfaches größer ist; der Effekt einer Änderung an einer einzigen Bindungsstelle wird quasi weggepuffert. Mit dem gleichen Argument haben Änderungen von Regulatorproteinen im Stoffwechselblock keine signifikanten Änderungen der Verteilung der RNA-Polymerase zur Folge. Wie in Abbildung 4.9 gezeigt, erfolgt die Signalübertragung ausgehend von der Anbindung der RNA-Polymerase damit unidirektionell in die unteren Ebenen von Stoffwechselblock und -weg und macht den hierarchischen Aufbau der Funktionseinheiten deutlich.

In der obersten Ebene in Abbildung 4.9 wird die Bildung des Initiationskomplexes *PD* aus RNA-Polymerase, σ -Faktor und DNA Promotor Bindestelle beschrieben. Dieser Koordinator ist in Kapitel 3.4.1 beschrieben. Die Ausgangsgrösse ist die freie Menge an Polymerase-Molekülen c_p . In der Ebene des Stoffwechselblocks wird die Wechselwirkung der RNA-Polymerase mit dem Protein Crp und der DNA Bindungsstelle erfaßt. Die Signalausgänge sind jetzt die freien Mengen an Polymerase und die freie Menge an Crp. In der dritten Ebene wird dann der Einfluss des Repressors LacI berücksichtigt. Die Ausgänge des dritten Koordinators stellen dann alle Informationen bereit, um ein individuelles Gen anzusteuern.

Die Vorgehensweise reduziert die komplexen Vorgänge auf eine hierarchisch aufgebaute Struktur. Der nächste Abschnitt gibt die notwendigen mathematischen

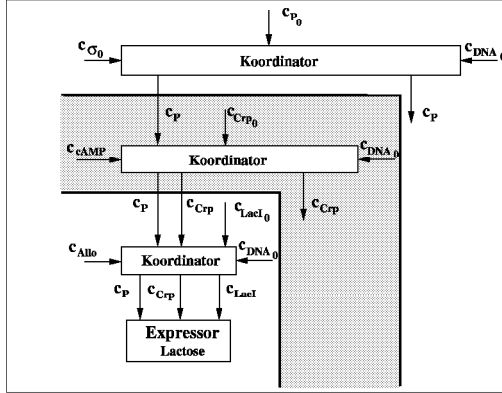


Figure 4.9: Hierarchischer Aufbau des Stoffwechselblocks für das *crp* Modulon.

Gleichungen für die Modellbausteine an.

4.3.1 Eine Methode zur mathematischen Beschreibung hierarchisch aufgebauter Funktionseinheiten

In der Literatur ist bisher nur ein Verfahren zur Beschreibung der Zellantwort in einem Multigen-System beschrieben worden [36]. Dieses Verfahren ist in einer Reihe von Veröffentlichungen zur Anwendung gekommen [85, 11] und soll hier kurz diskutiert werden. Für die Berechnung der Transkriptionseffizienz wird folgender Ansatz gemacht: Sie ist proportional zu der Belegung $\psi_1 = \frac{c_{PD}}{c_{D0}}$ der RNA-Polymerase. Der Einfluß eines Proteins, welches das Ablesen verhindert (Belegungsrate ψ_2) ergibt sich durch den Faktor $1 - \psi_2$ (Anteil der freien Plätze). Der Einfluß eines Aktivators mit der Belegungsrate ψ_3 und dem Aktivierungsfaktor α geht mit $(1 + \alpha \psi_3)$ in die Rechnung ein. Die Syntheserate ist damit proportional zu

$$r \sim \psi_1 (1 - \psi_2) (1 + \alpha \psi_3). \quad (4.3)$$

Bei dieser Vorgehensweise werden die Anteile an belegten Plätzen ψ_i berechnet, in dem die einzelnen Bindungsstellen als unabhängig voneinander betrachtet werden und es zu keinerlei Wechselwirkungen kommt; entscheidend ist nur der mit Protein belegte Anteil einer bestimmten Bindungsstelle. Multipliziert man aber bspw. die ersten beiden Faktoren in obiger Gleichung aus, so erhält man unter anderem den Summanden $\psi_1 \psi_2$; das bedeutet, dass die Berechnung die gleichzeitige Anbindung

beider Proteine an ihre Bindungsstellen zuläßt. Im Falle des *lac* Operons trifft aber gerade dieser Fall nicht zu. Die beiden Bindungsstellen überlappen und können nur von der RNA-Polymerase oder vom Regulatorprotein *LacI* besetzt werden. Im folgenden soll nun ein neues Verfahren vorgestellt werden, welches die molekularen Wechselwirkungen berücksichtigt und eine Strukturierung mit einem hierarchischen Aufbau erlaubt. In den Simulationsrechnungen und der Diskussion sollen die Möglichkeiten und Grenzen des Verfahrens aufgezeigt werden.

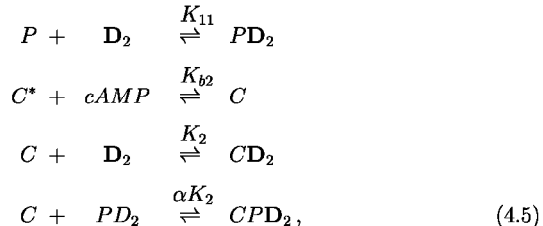
Ausgehend von einem vollständigen Reaktionsschema, welches alle Wechselwirkungen beschreibt sind dann die entsprechenden Gleichungen für jede Ebene des reduzierten Modells abzuleiten. Jede Ebene repräsentiert damit einen Teil des Gesamtnetzwerkes. Die Ableitung der mathematischen Gleichungen soll an einem Beispiel erläutert werden, wobei zunächst nur zwei Ebenen betrachtet werden.

Gesamtmodell

Die Proteine P und C stehen mit der spezifischen Kontrollsequenz D_2 in Wechselwirkung. Die Strukturgene von D_2 kodieren ein Enzym, dessen Synthese modelliert werden soll. Neben der Kontrollsequenz D_2 steht Protein P noch mit weiteren Bindungsstellen D_1 in Wechselwirkung. Protein P^* ist nur in der mit dem σ -Faktor aktivierten Form P aktiv.



Protein C wird durch den Metaboliten *cAMP* aktiviert und kann nur in komplexierter Form an die DNA binden. Mit dem Wechselwirkungsparameter α gelten folgende Reaktionsgleichungen für die Kontrollsequenz D_2



wobei C und P positiv miteinander wechselwirken ($\alpha < 1$)¹. Die Größen PD_2 und CPD_2 beschreiben den Initiationskomplex, wenn P alleine und wenn P und

¹Die Gleichgewichtskonstanten sind als Dissoziationskonstanten angeschrieben. Ein Faktor < 1 bedeutet, dass die Bindung stärker wird.

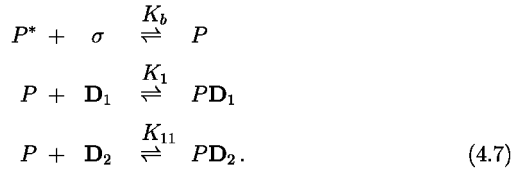
C gemeinsam an die Kontrollsequenz gebunden haben. Die Wechselwirkung der Kontrollsequenz D_1 mit P lässt sich durch die Reaktionsgleichung



beschreiben, wobei von einer gemittelten Affinität K_1 der RNA-Polymerase zu allen Promotoren D_1 ausgegangen wird. Die Affinität K_{11} der Polymerase zu D_2 ist in der Regel schwächer, da über Protein C eine Aktivierung erfolgt.

Reduziertes Modell

Die Dekomposition von Reaktionsnetzwerk 4.4 – 4.6 in zwei Koordinatoren erfolgt, indem Protein P die oberste und Protein C die zweite Ebene darstellen. Grundlage für P ist hierbei der Koordinatorbaustein aus Kapitel 3, Abbildung 3.7 rechts. Er ist lediglich um zusätzliche Ein- und Ausgangsgrößen zu erweitern. Das Reaktionssystem lautet:



Auf der obersten Ebene werden gemäß Abbildung 4.9 die Wechselwirkungen von P mit den Bindungsstellen 1 und 2 sowie dem σ -Faktor berücksichtigt. In der zweiten Ebene ist zunächst die Aktivierung durch $cAMP$ und die Anbindung an die freie DNA Bindungsstelle zu berücksichtigen, weiterhin die Bindung der freien Polymerase an die Bindungsstelle. Für Koordinator 2 ergibt sich damit das Reaktionsschema zu

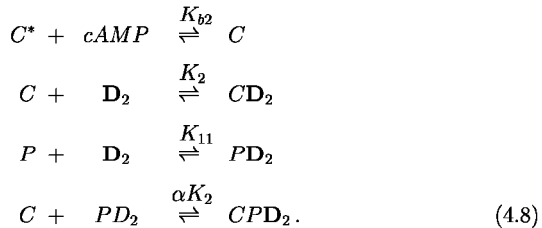


Tabelle 4.3: Zusätzliche Parameter zu Tabelle 3.2 zur Lösung der algebraischen Gleichungen.

Eingangsgrößen und Parameter	
Gesamtmenge Protein C	0.005 [$\mu\text{mol/g TM}$] [37]
Gesamtanzahl Promotoren $\mathbf{D0_2}$	40 [-]
Bindungskonstante K_{11}	$2.0 \cdot 10^{-1}$ [$\mu\text{mol/g TM}$]
Bindungskonstante K_{b2}	2.44 [$\mu\text{mol/g TM}$] [37]
Bindungskonstante K_2	$2.44 \cdot 10^{-5}$ [$\mu\text{mol/g TM}$] [37]
Faktor α	0.01 [-]
n_P für $\mathbf{D_2}$	10

RNA-Polymerase limitierend, da viele Bindungsstellen bedient werden müssen. Es ergibt sich ein relativ großer Fehler.

Kapitel 5

Umsetzung des Modellierungskonzeptes in ein Modellierungswerkzeug

Durch die modulare Struktur des Modellierungskonzeptes bietet sich die Umsetzung in ein Rechnerwerkzeug mit einer objekt-orientierten Umgebung an. Die Umsetzung in reine Simulationswerkzeuge ist nur bedingt möglich. Die Simulationsumgebung ACSL bietet durch Verwendung von Unterprogrammen die Möglichkeit eines modularen Aufbaus des Modells. Unter Verwendung des symbolverarbeitenden Programms MATHEMATICA ist eine Umgebung vorgestellt worden, die die Erstellung von Modellen und die Simulation mit ACSL ermöglicht [33, 34]. Zwei objekt-orientierte Ansätze sind beschrieben [73, 75], die sich aber hauptsächlich auf die Beschreibung der dynamischen Stoffflüsse konzentrieren und keine Objektklassen für die Signaltransduktion beinhalten. In diesem Kapitel soll die Umsetzung des Modellierungskonzeptes in eine C⁺⁺-Umgebung beschrieben werden. Diese erlaubt die Erstellung der Modelle sowohl mit einem Texteditor als auch über eine graphische Benutzeroberfläche. Die Modellerstellung über die Benutzeroberfläche besitzt allerdings nicht den vollen Funktionsumfang.

5.1 Die Modellbeschreibungssprache EULER

Die auf dem Industriestandard C⁺⁺ basierende Modellbeschreibungssprache EULER (expert oriented, unified modeling language for thermodynamic systems) [47, 48, 46] ist eine allgemeine Sprache, die zunächst kein spezifisches Fachwissen zur Implementierung der Modellbausteine voraussetzt. Sie kann damit auch für elektrotechnische, mechanische und andere verfahrenstechnische Systeme eingesetzt

werden. Die mit `EULER` erstellten Modelle werden in Codegenerator-Files für die Simulationsumgebung `DIVA` [49] übersetzt. Der Codegenerator legt anschließend die entsprechenden Files für die Simulationsumgebung an.

Den in den vorangegangenen Kapiteln definierten Modellbausteinen entsprechen im Modellierungskonzept Objektklassen. Diese Klassen zeichnen sich durch die Anzahl und Art der Anschlüsse sowie durch die mathematische Beschreibung aus. Ein wesentliches Merkmal ist die Vererbung von Eigenschaften an andere Objektklassen. Beispielsweise lassen sich alle reaktionskinetischen Ansätze zur Beschreibung einer Reaktion $A \rightarrow B$ ausgehend von einer einzigen Klasse beschreiben, die nur die strukturellen Eigenschaften, wie Anzahl der Anschlüsse für Substrate und Signale, enthält. Ableitungen dieser Modellklasse übernehmen dann diese Eigenschaften und zusätzlich noch die unterschiedlichen reaktionskinetischen Gleichungen.

Das Modellierungswerkzeug soll den Benutzer hauptsächlich bei der Erstellung der mathematischen Gleichungen entlasten. Am aufwendigsten ist hierbei die Erstellung der Differentialgleichungen der Metabolite gemäß Gleichung (3.11) und der algebraischen Erhaltungsgleichungen, wenn bspw. ein Protein in mehreren Konformationen vorliegt. Wie in Kapitel 6 gezeigt wird, ergibt sich für das Protein *Crp* ein recht umfangreiches algebraisches Gleichungssystem.

5.2 Implementierung der Modellbausteine in `CELLMOD`

Mit Hilfe der Modellbeschreibungssprache `EULER` wurde das Programmpaket `CELLMOD` erstellt, welches elementare und aggregierte Modellbausteine sowie eine Modellbibliothek mit reaktionskinetischen Ansätzen zur Verfügung stellt. Tabelle 5.1 gibt eine Übersicht über Modellbausteine und die Namen der zugehörigen Objektklassen.

5.2.1 Stoffspeicher

Der elementare Modellbaustein vom Typ Stoffspeicher zur Beschreibung intrazellulärer Stoffe wird durch die Objektklasse `IStorage` repräsentiert. Abbildung 5.1 zeigt den sogenannten "Ableitungsbaum", der die von einer Oberklasse abgeleiteten Unterklassen zeigt. Die Unterklassen besitzen spezifische Attribute sowie alle Eigenschaften der entsprechenden Oberklasse.

Die Objektklasse `IStorage` besitzt die Konzentrationen c für die Gesamtkonzentration des Stoffes und pc für die Konzentration der freien (unbelegten) Komponente als Zustandsgrößen. Dies hat sich als zweckmäßig erwiesen, da für die

Tabelle 5.1: Modellbausteine und zugehörige Objektklassen.

Modellbaustein	Objektklasse
Stoffspeicher Biomasse	BStorage
Stoffspeicher in der Flüssigphase	LStorage
Stoffspeicher (intrazellulär)	IStorage
Stoffwandler	Transformer
Stoffwandler – Transportprozess	Channel
Stoffwandler – Polymerisationsprozess	Polymerisator
Signalwandler – Koordinator	SigCoor
Signalwandler – enzym. Reaktion	SigEnz
Signalwandler – Aktor	SigP
Modellbaustein Expression	Expressor

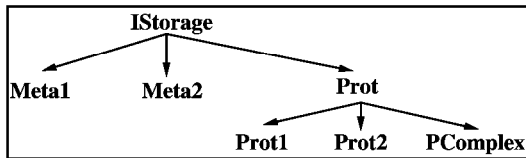


Figure 5.1: Ableitungsbaum der Objektklasse IStorage. Die Pfeilrichtung zeigt von der Oberklasse in die Unterklasse.

Berechnung der Komplexe von Proteinen mit der DNA die Konzentration der freien (unbelegten) Komponenten benötigt wird und sich die Gesamtkonzentration als Summe aller Komplexe, an denen der Metabolit beteiligt ist, berechnet. Der Befehl `set class FastComponent` setzt die Anschlüsse für die einzelnen Summanden. Über den Befehl `set class ReactionTerminalS` wird der Anschluß an die Stoffwandler festgelegt. Dadurch wird bei jeder Verknüpfung des Speichers mit einem Stoffwandlerbaustein der Wert der Konzentration c übergeben und im Gegenzug der reaktive Stoffstrom r_0 übernommen (Stromvektor-Prinzip).

```

class IStorage
{
  set class FastComponent {import state Concentration & c;}
  state Concentration pc;
  public:
  interface(out):
    <> state Concentration c : out;
    <> set class ReactionTerminalS varies ReactionTerminal : in
      {}(c);
}

```

Die erste hier betrachtete Unterklasse `Meta1` ordnet dann dem strukturellen Modellbaustein einen verhaltensbeschreibenden Modellbaustein zu, der die Gleichung für die zeitliche Ableitung c' der Konzentration des Stoffspeichers enthält. Eingangsgröße in diesem Baustein ist die spezifische Wachstumsrate μ . Es werden die Raten über alle Anschlüsse im `ReactionTerminal` aufsummiert. Für Metabolite, die der Klasse `Meta1` angehören, wird angenommen, dass sie keine Komplexe mit anderen Stoffen bilden oder die Menge der Komplexe unwesentlich gegenüber der Gesamtmenge ist. Die Gesamtmenge c und die Menge an freier Komponente pc sind damit gleichzusetzen.

```
class Meta1 extends IStorage
{
public:
    dynamic Time t;
interface(out):
    import state Activity mu : out;
    dynamic:
        c' == sum[p in ReactionTerminals] p.r*p.gamma - c * mu;
        c == pc;
}
```

Wie oben ausgeführt liegen Regulatorproteine und DNA Bindungsstellen in unterschiedlichen Konformationen vor. Zur Zeit gibt es keinerlei rechnergestützte Möglichkeit, sich die algebraischen Gleichungen automatisch generieren zu lassen. Mit den im folgenden vorgestellten Klassen soll ein erster Schritt dazu unternommen werden. Für diese Modellbausteine ist die Objektklasse `Prot1` definiert, die neben einer Differentialgleichung für die Gesamtmenge c eine algebraische Gleichung besitzt, die die Summe über alle Komplexe bildet. Zur Beschreibung der Komplexbildung ist der Baustein `PComplex` definiert. Dieser Baustein besitzt als Eingang die Konzentrationen pc von zwei Stoffen `part1` und `part2`, die in der Gleichung zur neuen Ausgangsgröße pc verknüpft werden.

```
class PComplex extends Prot
{
    FastComponent pu(pc);
    import IStorage & part_1;
    import IStorage & part_2;
    part_1.FastComponent p1(c);
    part_2.FastComponent p2(c);
    const Concentration K;
    dynamic:
        part_1.pc * part_2.pc == K * pc;
        c == sum [p in FastComponent] p.c;
}
```

Die Funktionsweise soll an einem einfachen Beispiel gezeigt werden. Die Stoffe A und B bilden einen Komplex AB . Die entsprechenden Programmaufrufe lauten

```

Prot1 A;
Prot1 B;
PComplex AB(A,B);

```

Folgende Gleichungen ergeben sich (die Bezeichnung der Zustandsgrößen erfolgt durch den Namen des Stoffes, dann folgt ein Punkt und anschließend die Zustandsgröße selbst):

$$\frac{d A.c}{dt} = -\mu A.c, \quad A.c = A.pc + AB.c \quad (5.1)$$

$$\frac{d B.c}{dt} = -\mu B.c, \quad B.c = B.pc + AB.c \quad (5.2)$$

$$A.pc * B.pc = K_1 AB.pc, \quad AB.c = AB.pc. \quad (5.3)$$

In den Differentialgleichungen erscheint nur der Verdünnungsterm. Setzt man zur Kontrolle die Gleichungen ineinander ein, erhält man das algebraische Gleichungssystem

$$A.c = A.pc + \frac{A.pc * B.pc}{K_1} \quad (5.4)$$

$$B.c = B.pc + \frac{A.pc * B.pc}{K_1}. \quad (5.5)$$

Das Modell soll nun erweitert werden, indem die bereits vorhandenen Bausteine beibehalten werden. Der Komplex AB bildet einen weiteren Komplex ABC mit dem Stoff C . Der Aufruf lautet

```

Prot1 C;
PComplex ABC(AB,C);

```

und die entsprechenden veränderten bzw. zusätzlichen Gleichungen

$$\frac{d C.c}{dt} = -\mu C.c \quad (5.6)$$

$$C.c = C.pc + ABC.c \quad (5.7)$$

$$AB.c = ABC.c + AB.pc \quad \text{erweiterte Gleichung} \quad (5.8)$$

$$AB.pc * C.pc = K_2 ABC.pc \quad (5.9)$$

$$ABC.c = ABC.pc. \quad (5.10)$$

Die algebraischen Gleichungen für A und B bleiben unverändert. Die zusätzlichen Einträge kommen über die Gleichung für $AB.c$ indirekt dazu. Setzt man zur Kontrolle wiederum alle Terme entsprechend ein, ergibt sich

$$A.c = A.pc + \frac{A.pc * B.pc}{K_1} + \frac{A.pc * B.pc * C.pc}{K_1 * K_2} \quad (5.11)$$

$$B.c = B.pc + \frac{A.pc * B.pc}{K_1} + \frac{A.pc * B.pc * C.pc}{K_1 * K_2} \quad (5.12)$$

$$C.c = C.pc + \frac{A.pc * B.pc * C.pc}{K_1 * K_2} \quad (5.13)$$

Der Vorteil dieser programmtechnischen Konstruktion ist die Erstellung von Gleichungen auch für große Reaktionsnetzwerke, da bereits definierte Komplexe zur Bildung von weiteren Komplexen herangezogen werden können. Dieser Vorteil überwiegt den Nachteil, dass die Gleichungen verschachtelt und undurchsichtig werden und die Anzahl der Gleichungen pro Komplex um zwei zunimmt.

5.2.2 Stoffwandler

Aus praktischen Gründen sind in einem ersten Schritt Bausteine implementiert worden, die eine Kombination aus Steuerelement und eigentlichem Stoffwandler darstellen. Diese werden im folgen kurz vorgestellt. Als Beispiel wird die Klasse `Transformer2` betrachtet, welche eine Reaktion vom Typ $A \rightarrow B$ repräsentiert. Die Klasse `Transformer2` enthält als Zustand die Reaktionsrate r ; als Eingang für die Enzymmenge ist die Variable `enz` vorgesehen. Die Anschlüsse für die Stoffspeicher sind mit a und b bezeichnet.

```
class Transformer2
{
    state ReactionRate r;
    interface(out):
    const Concentration enz : in;
    interface:
    >> ReactionTerminal a : out(r);
    << ReactionTerminal b : out(r);
    a.gamma = -1;
    b.gamma = 1;
}
```

Diesem strukturellen Modellbaustein soll ein verhaltensbeschreibender Modellbaustein, der die Gleichung der Michaelis-Menten-Kinetik enthält, zugeordnet werden. Der Eintrag für die Kinetik in der Modellbibliothek lautet:

```

class MM
{
public:
    import const Concentration & ce;
    import state Concentration & s1;
    import state ReactionRate & r;
    const Activity sa;
    const Concentration Ks1;
dynamic:
    r == ce*sa*s1/(Ks1+s1);
}

```

Nach der Vereinbarung der Variablen *ce*, *s1* und *r* sowie der Parameter *sa* und *Ks1* ist dann die entsprechende Gleichung für *r* angegeben. Die Zuweisung des kinetischen Ausdrucks zu der strukturellen Hülle erfolgt, indem die Variablen der Kinetik auf die entsprechenden Größen in der strukturellen Hülle verweisen.

```

class Transformator2_MM extends Reaction2
{
    MM f(ce->enz,s1->a.c,r);
}

```

Eine Reaktion $\text{Glc6P} \rightarrow \text{Fru6P}$ über das Enzym Phosphoglucoseisomerase (Pgi) läßt sich mit den vereinbarten Bausteinen folgendermaßen schreiben:

```

Metal Glc6P, Fru6P;
Transformer2_MM Pgi;
connect:
    Glc6P - Pgi - Fru6P;

```

Das Schlüsselwort **connect** verschaltet Stoffwandler und Stoffspeicher.

5.2.3 Signalwandler

Als Beispiel für einen Signalwandler sei ein Koordinator betrachtet. Er besitzt die Eingänge *p* und *d* für ein Protein und eine DNA Bindungsstelle. Der Ausgang *Psi* ist der mit Protein belegte Anteil an der DNA.

```

class SigCoor1
{
public:
    import IStorage & p;
    import IStorage & d;
    state Fraction Psi : out;
}

```

```

PComplex pd(p,d);

dynamic:
  Psi == pd.pc/p.c;
}

```

5.3 Die graphische Bedienoberfläche von CELLMOD

Die graphische Bedienoberfläche gliedert sich auf dem Bildschirm in drei Teilbereiche: Im *Auswahlbereich* werden alle bereits ausgewählten Objekte mit dem Namen angezeigt. Das entsprechende Symbol ist im *Vorschaufenster* zu sehen. Auf der *Aktionsfläche* können dann die Objekte miteinander verschaltet werden (Abbildung 5.2).

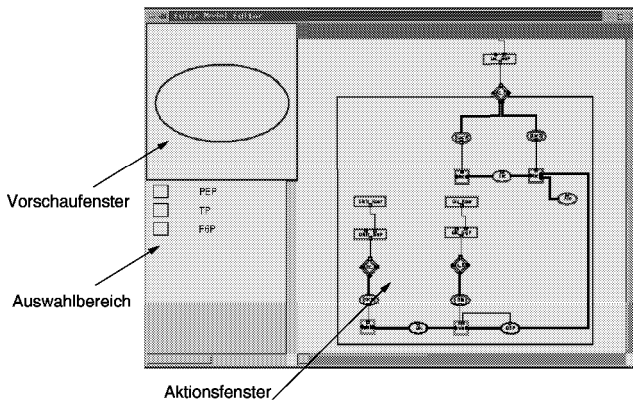


Figure 5.2: Graphische Bedienoberfläche von CELLMOD mit Auswahlbereich, Vorschaufenster und Aktionsfläche.

Um Modellbausteine auszuwählen steht ein Klassenbrowser zur Verfügung. Dieser zeigt zunächst alle Oberklassen an. Durch ein Anklicken mit der Maus können die Unterklassen sichtbar gemacht werden. Alle Attribute eines Objektes können mit dem Instanzenbrowser betrachtet und gegebenenfalls modifiziert werden. Damit können bspw. Anfangswerte der Differentialgleichungen oder kinetische Parameter gesetzt werden.

Die Verschaltung auf der *Aktionsfläche* erfolgt mit dem Connectmenue, welches mit der rechten Maustaste auf dem Objekt aufgebaut wird. Die Anschlüsse für die Stoffflüsse und Signalflüsse sind unterschiedlich gekennzeichnet, um die Verschaltung zu erleichtern. Die Anschlüsse für die Stoffflüsse sind nur in den Modellbausteinen Transformer zu sehen, da dort die Anzahl genau festgelegt ist. Bei den Stoffspeichern kann von jedem Punkt des Bausteins auf der Oberfläche eine Stoffflußverbindung gezogen werden. Abbildung 5.3 zeigt den Instanzen- und den Klassenbrowser.

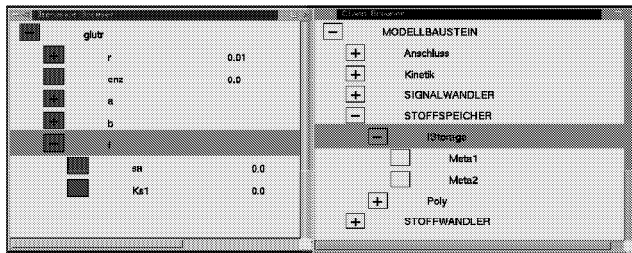


Figure 5.3: Links: Instanzenbrowser: Hier können die Parameter bspw. für einen reaktionskinetischen Ausdruck modifiziert werden. Rechts: Klassenbrowser.

Kapitel 6

Modell der Kataboliten-Repression

Das Modellierungskonzept soll auf das Beispiel des Bakteriums *Escherichia coli* angewendet werden. Das Bakterium gilt als sehr gut untersucht und die Stöchiometrie des zellulären Reaktionsnetzwerks gilt als aufgeklärt.

Wächst eine *Escherichia coli* Kultur auf einer Substratmischung aus zwei Kohlenstoffquellen, so werden oft zwei Wachstumsphasen beobachtet. Zuerst wird der bevorzugte Zucker verbraucht und erst nach einer Umstellung des Stoffwechsels erfolgt der Abbau des zweiten Zuckers. Dieses Verhalten wird als Diauxie bezeichnet und wurde erstmals von Jacques Monod im Jahre 1942 hinsichtlich der molekularen Regulationsmechanismen gründlich untersucht [50]. Seit dieser Zeit sind eine Vielzahl von Veröffentlichungen erschienen und die biomolekularen Details sind weitestgehend bekannt. Allerdings sind die Mechanismen, die dem Phänomen Diauxie zu Grunde liegen unterschiedlich und abhängig von den vorgelegten Zuckern. Das am besten untersuchte Beispiel ist die Glucose-Lactose Diauxie, deren Erforschung grundlegende Erkenntnisse zum Verständnis des Wachstumsverhaltens von *Escherichia coli* geliefert hat.

Auch die Theoretiker haben sich schon seit langem mit der Glucose-Lactose Diauxie beschäftigt und in den letzten drei Dekaden sind einige mathematische Modelle vorgestellt worden. 1997 präsentierten Wong et al. [85] ein Modell der Glucose-Lactose Diauxie, welches die biomolekularen Erkenntnisse sehr gut beschreibt. Allerdings wird für die Glucoseaufnahme nur ein sehr einfacher Ansatz ohne den Prozess der Gruppentranslokation gemacht. Damit kann auch der Signalweg der Kataboliten Repression nur vereinfacht abgebildet werden.

Für die Kataboliten Repression soll im folgenden ein detailliertes Modell entwickelt und dynamische Simulationsstudien durchgeführt werden, wobei zunächst

das Wachstumsverhalten eines Wildtyp Stammes im Vordergrund steht. Im Laufe der Arbeit konnten auch aktuelle Forschungsergebnisse biologischer Arbeitsgruppen in das Modell integriert werden. Diese Resultate sind aber noch nicht vollständig abgesichert. Aus diesem Grund erfolgt zunächst die Vorstellung eines Grundmodells (Unterkapitel 6.1), welches in den Unterkapiteln 6.3-6.5 verfeinert wird. Die aktuellen biologischen Forschungsergebnisse sind als Hypothesen formuliert und werden anhand von Simulationsrechnungen diskutiert.

6.1 Grundmodell

Im Modell ist das gesamte biochemische Reaktionsnetzwerk von *E. coli* in drei Funktionseinheiten strukturiert:

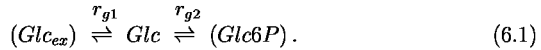
- Stoffwechselweg Glucose Transport/spezifischer Abbau
- Stoffwechselweg Zentraler Kohlenhydratabbau/ Abflüsse in die Monomersynthese
- Stoffwechselblock *crp* Modulon mit den Einheiten
 - Phosphotransferase System (PTS)
 - Synthese von cAMP
 - Regulator Crp
 - Stoffwechselweg Lactose

wobei die ersten drei Einheiten das globale Signaltransduktionssystem des Modulons beschreiben.

6.1.1 Stoffwechselweg Glucose Transport/spezifischer Abbau

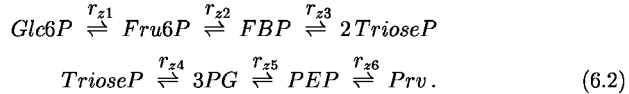
Glucose wird von *E. coli* über eine große Anzahl von Transportern aufgenommen. Neben dem für Glucose spezifischen PTS zeigen noch eine Reihe anderer Transportproteine eine mehr oder weniger starke Affinität zu Glucose und können diese in die Zelle transportieren. Intrazelluläre Glucose wird über das Enzym Glukokinase in *Glc6P* umgewandelt. Glucose-Transporter, Glukokinase und intrazelluläre Glucose sind im Stoffwechselweg Glucose-Abbau zusammengefaßt, wobei der Transporter hier nicht über ein spezifisches Protein festgelegt ist, sondern vielmehr die Klasse eines mittelaaffinen Transporters repräsentiert. Im vorgestellten Stoffwechselweg sind die Enzyme als konstitutiv angenommen. Untersuchungen

über die Regulation der Enzymkonzentration sind sehr selten, vielmehr hat man sich auf die Regulation der Enzymaktivität konzentriert. In diesem Bereich ist eine umfangreiche Anzahl von Literaturstellen zu finden (siehe z.B. [13]). Es ergibt sich folgendes Reaktionsschema¹ für den Stoffwechselweg Glucose Transport und Abbau (siehe auch Abbildung 6.1)



6.1.2 Stoffwechselweg zentraler Kohlenhydratabbau/Abflüsse Monomersynthese

Das Reaktionschema für den Zentralen Kohlenhydratabbau lautet



In den Bilanzgleichungen für die Metabolite werden die Abflüsse in andere Bereiche des Zentralen Kohlenhydratabbaus und Abflüsse direkt in die Biosynthese

Tabelle 6.1: Zusammenstellung der verwendeten reaktionskinetischen Ansätze für die Stoffwechselwege Glucose Abbau und Zentraler Kohlenhydratabbau. Abkürzungen: B Abfluß Biosynthese; ^aKinetik vom Michaelis-Menten (MM) Typ; ^bMM Kinetik mit nichtkompetitiver Hemmung; ^cMonod-Wyman-Changeux Modell mit $n = 4$; ^d Reversible MM Kinetik; ^eMM Kinetik mit essentieller Aktivierung; Gleichungen siehe Kapitel 3.

Rate	Enzym	Kinetik	Effektoren	Rate	Kinetik
				$r_{PPW_{Glc6P}}$	1. Ord.
r_{g1}	–	MM ^a	–	$r_{PPW_{Fru6P}}$	1. Ord.
r_{g2}	Glk	MM + I ^b	$Glc6P$	$r_{PPW_{TrioseP}}$	1. Ord.
r_{z1}	Pgi	MM	–	$r_{B_{Glc6P}}$	1. Ord.
r_{z2}	Pfk	MWC ^c	PEP, ADP	$r_{B_{Fru6P}}$	1. Ord.
r_{z3}	Fda	Revers. MM ^d	–	$r_{B_{TrioseP}}$	1. Ord.
r_{z4}	Gap	Revers. MM	–	$r_{B_{3PG}}$	1. Ord.
r_{z5}	Eno	Revers. MM	–	$r_{B_{PEP}}$	1. Ord.
r_{z6}	Pyk	MM + A ^e	FDP	$r_{TCA_{PEP}}$	1. Ord.
				$r_{B_{Prv}}$	1. Ord.

¹Extrazelluläre Metabolite werden mit Index *ex* bezeichnet. Steht ein Metabolit in einer Reaktionsgleichung in Klammer bedeutet dies, dass er zu einer anderen Funktionseinheit bzw. zur Flüssigphase gehört.

durch die in Tabelle 6.1 zusammengestellten Raten berücksichtigt. Die Abflüsse sind mit dem im Anhang B vorgestellten Verfahren der Stoffflußanalyse berechnet. Abbildung 6.1 faßt die beiden oben vorgestellten Stoffwechselwege zusammen.

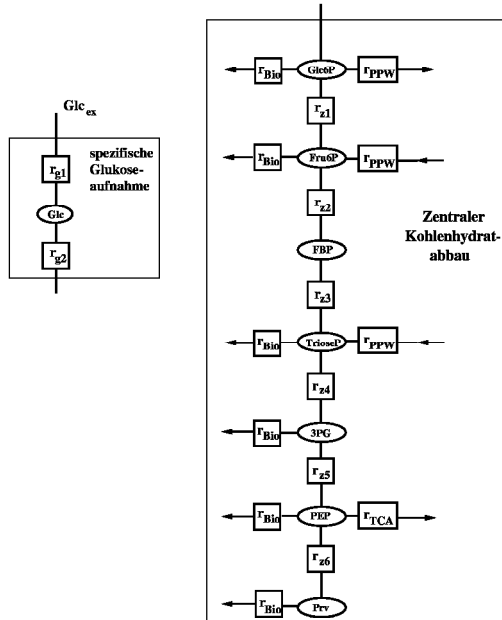


Figure 6.1: Stoffwechselwege für spezifische Glucoseaufnahme und Abbau sowie die zentralen Kohlenhydratabbaue. Um die Flußrichtung in den zentralen Abbauewegen zu verdeutlichen sind entsprechende Pfeile eingetragen. Der Pentosephosphatweg (PPW) wird ausgehend von $Glc6P$ durchlaufen, wobei die Abflüsse im PPW in die Biosynthese durch die Flußanalyse berücksichtigt sind (Anhang B). Über die Metabolite $Fru6P$ und $TrioseP$ ist der PPW wieder an die Glykolyse angekoppelt. Der Abfluß von PEP zum TCA ist eine anaplerotische Reaktion, die zur Aufrechterhaltung des Stoffflusses durch den TCA dient.

6.1.3 Stoffwechselblock *crp* Modulon

Wie in Abbildung 4.8 gezeigt, umfaßt dieser Stoffwechselblock ein globales Signaltransduktionssystem und den in Abbildung 4.6 gezeigten Stoffwechselweg für

den Transport und Abbau von Lactose. Das Signaltransduktionssystem umfaßt die Modellbausteine für das PTS und die Synthese von *cAMP*. Der Regulator des Signaltransduktionsweges ist das Protein *Crp*, dessen Verteilung auf die spezifischen Bindungsplätze mit einem Koordinator beschrieben wird.

Signaltransduktionssystem: PTS

Das bakterielle Phosphotransferase System (PTS) ist ein komplexes Beispiel eines zusammengesetzten Bausteins, da es neben der Funktion als Signalübertragungssystem auch die Funktion eines Transportsystems besitzt. In Abbildung 6.2 ist

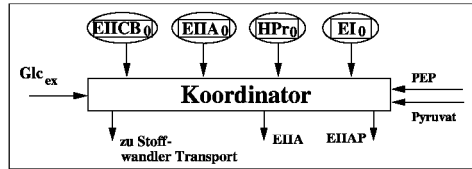
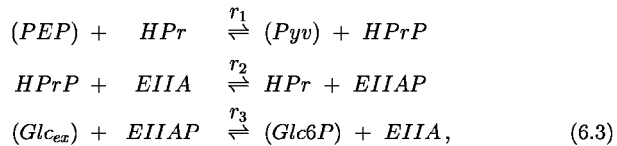


Figure 6.2: Das PTS kann mit einem Koordinatorbaustein beschrieben werden. Eingänge sind die Gesamtkonzentrationen der beteiligten Enzyme sowie die externe Glucose und die Metabolite PEP und Pyruvat. Ausgänge sind bspw. die verschiedenen Konformationen *EIIA*, *EIIAP*, *EI* und *EIP*.

dieser Baustein mit seinen Signalein- und ausgängen dargestellt.

Für das PTS soll folgender Reaktionsmechanismus angenommen werden



wobei der erste Reaktionsschritt durch das Enzym *EI* katalysiert wird. Schritt 2 überträgt die Phosphatgruppe von *HPrP* auf Enzym *EIIA*. Schritt 3 des Mechanismus wird durch das eigentliche Transportenzym *EIICB* realisiert. Diese Aufteilung der Reaktionsschritte erscheint aus zwei Gründen zweckmäßig: die Proteine *EI* und *HPr* sind generelle PTS Proteine, die für alle PTS Transporter notwendig sind. In Schritt 2 erfolgt die Übertragung auf ein für Glucose spezifisches Enzym. Der Mechanismus kann damit einfach erweitert werden, wenn *HPrP* die Phosphatgruppe auf Proteine für andere Zucker überträgt. Schritt 3 stellt den eigentlichen Transportschritt dar, wobei mehrere Einzelschritte denkbar

sind. So ist die Reihenfolge der Anbindung von Glc_{ex} und $EIIAP$ nicht festgelegt. Man kann daher von einem Random-Mechanismus ausgehen. Auch die Beobachtung, dass intrazelluläre Glucose möglicherweise über das PTS phosphoryliert werden kann, läßt sich wie unten gezeigt recht einfach in Schritt 3 integrieren.

Ein detailliertes Modell für das Glucose PTS ist von Rohwer [64] erstellt worden. In diesem Modell werden für die einzelnen Schritte der Phosphatübertragung Zwischenkomplexe angenommen. Zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten wird die Annahme getroffen, dass sich die Zwischenkomplexe quasistationär verhalten. Die von Rohwer ermittelten Parameter sind Grundlage der unten gezeigten Simulationsrechnungen.

Abbildung 6.3 zeigt den kinetischen Mechanismus für die Schritte 1 und 3 in der Cleland Notation [9]. Für Schritt 1 ist ein reversibler Ping-Pong Mechanismus



Figure 6.3: Kinetischer Mechanismus der Stoffumsetzung für die Schritte 1 (links) und 3 (rechts) des PTS in der Cleland Notation.

angenommen; für Schritt 2 eine reversible Reaktion zweiter Ordnung und für Schritt 3 ein irreversibler Random BiBi Mechanismus. Damit ergeben sich die Reaktionsraten für das PTS zu

$$r_1 = \frac{k_1 c_{EI0} c_{PEP} (K_{11} c_{Pyv} + \alpha \frac{c_{HPr}}{K_{12}}) - K_{11} c_{Pyr} (c_{PEP} + \alpha c_{HPrP})}{K_{11} c_{Pyv} + \alpha \frac{c_{HPr}}{K_{12}} + c_{PEP} + \alpha c_{HPrP}} \quad (6.4)$$

$$r_2 = k_2 (c_{EIIA} c_{HPrP} - K_2 c_{EIIAP} c_{HPr}) \quad (6.5)$$

$$r_3 = \frac{k_3 c_{EII CB0} c_{EII AP} c_{Glc_{ex}}}{(K_{EII AP} + c_{EII AP}) (K_{Glc_{ex}} + c_{Glc_{ex}})} \quad (6.6)$$

Die entsprechenden Gleichungen für die PTS Proteine ergeben sich zu

$$\frac{d c_{HPrP}}{dt} = r_1 - r_2 \quad (6.7)$$

$$c_{HPr} = c_{HPr0} - c_{HPrP} \quad (6.8)$$

$$\frac{d c_{EII AP}}{dt} = r_2 - r_3 \quad (6.9)$$

$$c_{EIIA} = c_{EIIA0} - c_{EII AP} \quad (6.10)$$

Da hier sehr hohe Flußraten auftreten, ist die Vernachlässigung der Verdünnungsterme durch Wachstum gerechtfertigt. Für die Enzyme EI und EIICB ist nur die Gesamtkonzentration c_{EI0} bzw. c_{EIICB0} von Bedeutung.

Regulatorprotein Crp

Ein für den Transport von Zuckern wichtiges Protein ist *Crp* (cAMP receptor protein) welches durch *cAMP* aktiviert werden kann und bei der Initiation einer großen Anzahl von Transportenzymen eine Rolle spielt. Obwohl das Protein

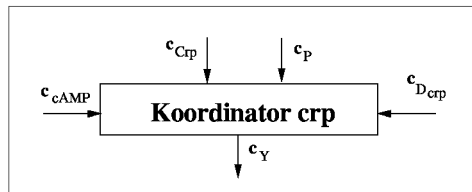


Figure 6.4: Der Koordinatorbaustein für *Crp*. Gezeigt sind die Ein- und Ausgänge des Bausteins.

zwei Bindungsstellen für *cAMP* besitzt, wird die aktive Form mit der Anbindung von bereits einem *cAMP* Molekül erreicht [22]. Die Anbindung von *Crp* an die spezifischen Bindungsstellen erfolgt nur in der, durch *cAMP* aktivierten Form *cAMP.Crp*. Die Kontrollregion für das Gen *crp*, welches *Crp* kodiert, besitzt zwei Bindungsstellen. Bei *crp* wirkt *cAMP.Crp* als Aktivator, d.h. es erleichtert die Anbindung der Polymerase. Für die Initiation der Transkription des *crp* Gens wurde von der Arbeitsgruppe von Aiba ein komplexes Modell beschrieben [19, 24] (Abbildung 6.5). Die Transkription kann starten, wenn kein *Crp*

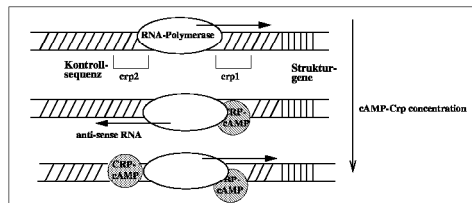
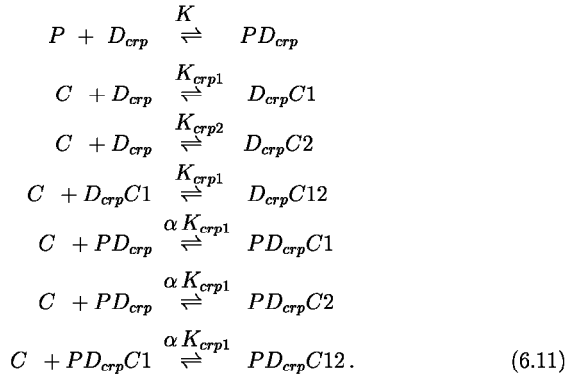


Figure 6.5: Modell der Initiation der Transkription für das *crp* Gen. Aus [19]

gebunden hat. Die Bindungsstelle D_{crp1} besitzt eine höhere Affinität für Crp als die Bindungsstelle D_{crp2} . Ist aber diese Bindungsstelle alleine besetzt, kann die RNA-Polymerase an den Promotor anbinden, läuft aber in die “falsche” Richtung und synthetisiert eine nicht verwertbare anti-sense mRNA. Sind beide Stellen belegt, kann die Transkription in der richtigen Richtung starten.

Proteine, deren Expression durch Crp aktiviert werden, zeichnen sich durch einen schwachen Promotor aus. Die Ebenen der in Abbildung 4.9 gezeigten Hierarchie werden den folgenden Berechnungen zu Grunde gelegt. Der Ausgang c_P dieses Blocks wird als Konstante aufgefaßt, da die Gesamtmenge c_{P0} und die Menge der σ -Faktoren als zeitlich konstant angenommen werden. Gemäß der in Kapitel 4 vorgestellten Methode ergeben sich folgende Reaktionsgleichungen für den Koordinatorbaustein:



Die Gleichung, die für die Gesamtmenge an Promotor zu lösen ist, lautet:

$$\begin{aligned}
 c_{D0_{crp}} = & c_{D_{crp}} + c_{PD_{crp}} + c_{D_{crp}C1} + c_{D_{crp}C2} + \\
 & c_{D_{crp}C12} + c_{PD_{crp}C1} + c_{PD_{crp}C2} + c_{PD_{crp}C12} .
 \end{aligned} \tag{6.12}$$

Für den Komplex Y ergibt sich in diesem Falle

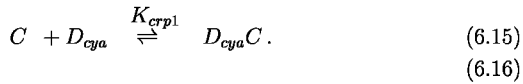
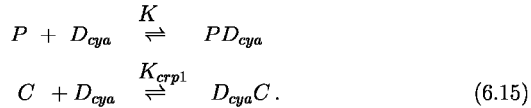
$$c_Y = c_{PD_{crp}} + c_{PD_{crp}C2} + c_{PD_{crp}C12} , \tag{6.13}$$

und damit die Gleichung für die Synthese von C

$$\dot{c}_C = k c_Y - (k_a b + \mu) c_C . \tag{6.14}$$

Adenylatzyklase Cya

Bei der Transkription der Adenylatzyklase wirkt der Regulator *Crp* als Repressor. Die entsprechenden Reaktionsgleichungen lauten:



(6.16)

Die Gleichung für die Gesamtmenge an Promotor lautet:

$$cD0_{cya} = cD_{cya} + cPD_{cya} + cD_{cya}C . \quad (6.17)$$

Für den Komplex Y ergibt sich:

$$c_Y = cPD_{cya} , \quad (6.18)$$

und damit die Gleichung für die Synthese von Cya

$$\dot{c}_{Cya} = k c_Y - (k_a b + \mu) c_{Cya} . \quad (6.19)$$

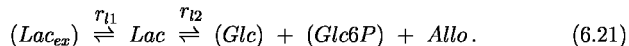
Synthese von *cAMP*

Die Synthese des Alarmons *cAMP* wird mit einem Modellbaustein vom Typ SigEnz beschrieben. Es wird angenommen, dass die Aktivierung der Adenylatzyklase durch *EIIAP* essentiell ist. Experimentelle Erkenntnisse sprechen dafür, dass *cAMP* aus der Zelle ausgeschieden wird. Ein Transportsystem wurde allerdings noch nicht dafür entdeckt. Das Ausschleusen von *cAMP* wird daher durch eine Reaktion erster Ordnung berücksichtigt. Für intrazelluläres *cAMP* ergibt sich dann mit der Konzentration der Zykase c_{Cya} und der Affinität K_{EIIAP} des Aktivators folgende Differentialgleichung

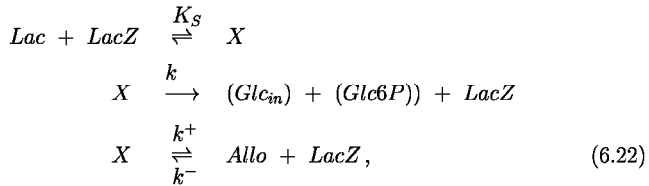
$$\frac{d c_{AMP}}{dt} = k_{syn} c_{Cya} \frac{c_{EIIAP}}{EIIAP + K_{EIIAP}} - (k_{out} + \mu) c_{AMP} . \quad (6.20)$$

Stoffwechselweg Lactose

Das Reaktionsschema für den in Abbildung 4.6 gezeigten Stoffwechselweg lautet



Das Enzym *LacY* transportiert Lactose in die Zelle, wo sie von *LacZ* in Glucose und Galactose gespalten wird. Da der Galactose Stoffwechsel nicht im Modell aufgenommen ist, wird als zweites Spaltprodukt gleich *Glc6P* eingesetzt, welches beim Abbau der intrazellulären Galactose entsteht. Die Allolactose wird als Nebenprodukt gebildet und nicht weiter verstoffwechselt. Die Umsetzung in das Nebenprodukt erfolgt mit einer anderen Rate als in die Hauptprodukte. r_{l2} steht damit für zwei Raten, die im folgenden diskutiert werden: Für die Stoffumsetzung von *LacZ* wird folgender Reaktionsmechanismus angesetzt

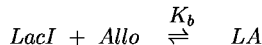


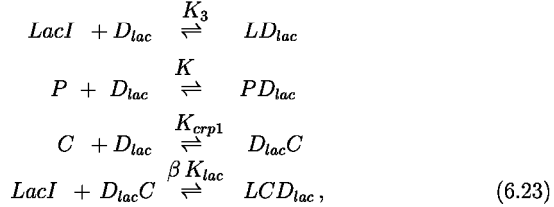
wobei angenommen wird, dass die Anbindung von Lac_{in} an das Enzym sehr schnell verläuft (Bindungskonstante K_{lac}). Der Quotient $\alpha = \frac{k^+}{k^-}$ bezeichnet das Verhältnis der beiden Geschwindigkeitskonstanten in der dritten Reaktionsgleichung. Tabelle 6.2 faßt die kinetischen Ansätze für den Lactose Transport und Abbau zusammen.

Rate	Enzym	Kinetik	Effektoren
r_{l1}	LacY	MM + I. ^a	EIIA
r_{l2}	LacZ	MM ^b (Hauptprodukte)	–
		$k^+ \cdot c_{E0} \cdot \frac{c_{Lac} - \alpha K_S c_{Allo}}{K_S + c_{Lac}}$	–
		(Nebenprodukt Allo)	

Tabelle 6.2: Zusammenstellung der verwendeten reaktionskinetischen Ansätze für den Stoffwechselweg Lactose Abbau. Die Hauptprodukte der zweiten Reaktion sind Glucose und Galactose. ^aMM Kinetik mit nichtkompetitiver Hemmung; ^bKinetik vom MM Typ

Im Koordinatorbaustein für *LacI* wird die Competition zwischen dem Repressor und der RNA-Polymerase berücksichtigt. Insgesamt gibt es in der Kontrollsequenz für das Lactose Gen drei Bindungsstellen für *LacI* und es kann gezeigt werden, dass der Repressor an zwei Bindungsstellen gleichzeitig binden kann und dabei die DNA verbiegt. Allerdings zeigen Untersuchungen von Oehler et al. [56] dass der Operator *O1* physiologisch den größten Einfluß besitzt. Aus diesem Grund ist im vorgestellten Reaktionsmechanismus nur eine Bindungsstelle vorgesehen. Es ergibt sich folgendes Reaktionsschema





wobei Parameter β die positive Kooperation zwischen *Crp* und *LacI* beschreibt [23].

Die Gleichung, die für die Gesamtmenge an Promotor zu lösen ist, lautet:

$$c_{D0_{lac}} = c_{D_{lac}} + c_{PD_{lac}} + c_{D_{lac}C} + c_{LCD_{lac}}. \tag{6.24}$$

Für den Komplex *Y* ergibt sich in diesem Falle

$$c_Y = c_{PD_{lac}} \tag{6.25}$$

und damit die Gleichung für die Enzyme LacY und LacZ

$$\dot{c}_{E_0} = k c_Y - (k_a b + \mu) c_{E_0}. \tag{6.26}$$

6.2 Verschaltung der Modellbausteine

Abbildung 6.6 zeigt zunächst den Signaltransduktionsweg im *crp* Modulon und die Verschaltung mit den spezifischen Expressor Bausteinen. Der Weg besteht aus dem Koordinator für das PTS, dem Baustein SigE_{enz} für die Bildung von *cAMP* und den Koordinatoren für die Polymerase und das Protein *Crp*.

Die Verschaltung des Stoffwechselblocks und der Stoffwechselwege erfolgt gemäß Abbildung 6.7. Die einzelnen Blöcke sind hauptsächlich über Stoffflußleitungen miteinander verbunden. Es findet nur ein geringer Austausch von Signalen zwischen den Einheiten statt. Intensive Signalfüsse finden innerhalb der Einheiten statt, vor allem innerhalb des *crp* Modulons, was zeigt, dass die einzelnen Einheiten eine gewisse Abgeschlossenheit besitzen. Betrachtet man das ungestörte Wachstum des Organismus auf Glucose als Regelstrecke, wirkt das *crp* Modulon als Regler, der aktiv wird, wenn es zu einer Störung (hier Mangel an Glucose) kommt. Die Signale, die dem Regler anzeigen, dass er aktiv werden soll, sind die Glucose im Medium und Metabolite im Zentralen Kohlenhydratabbauweg. Die Regelstrecke besitzt somit am Eingang und am Ausgang Meßstellen, die ihren physiologischen Zustand charakterisieren. Die Aktivität des Reglers liegt damit in der Bereitstellung eines neuen Aufnahmesystems.

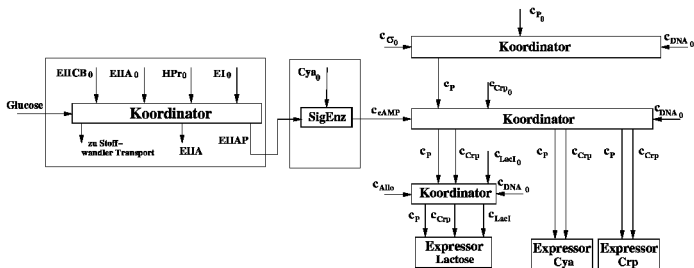


Figure 6.6: Verschaltung der Modellbausteine für den Signaltransduktionsweg im *crp* Modulon.

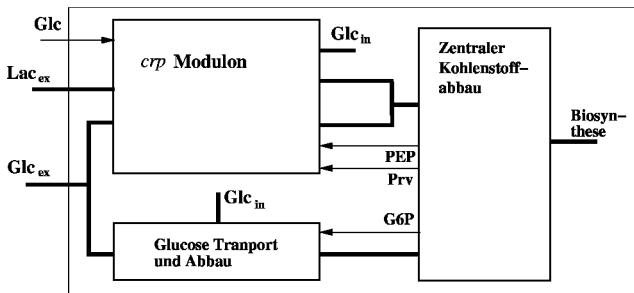


Figure 6.7: Verschaltung des Stoffwechselblocks *crp* Modulon mit den Stoffwechselwegen für den Transport und Abbau von Glucose und dem Zentralen Kohlenhydratabbauweg.

6.2.1 Parametrisierung der Modellbausteine

Zur Parametrisierung der Modellbausteine sind eine ganze Reihe von kinetischen Parametern notwendig, die grob in zwei Klassen gegliedert werden können:

- spezifische Aktivitäten und Bindungskonstanten für die Stoffwandler vom Typ enzymatische Reaktion
- Bindungskonstanten zur Beschreibung der Protein-Protein und der Protein-DNA Wechselwirkungen.

Die Bindungskonstanten sind für *Escherichia coli* weitestgehend in der Literatur zu finden. Allerdings sind diese nicht *in vivo*, sondern mit gereinigten Enzymen bzw. DNA Fragmenten ermittelt worden. Aus der Berechnung der intrazellulären Stoffflüsse und Werte von intrazellulären Metabolitkonzentrationen läßt sich bei Kenntnis der Enzymkonzentration die spezifische Aktivität eines Enzyms ermitteln. Die Rate r berechnet sich, wie oben gezeigt, folgendermaßen:

$$r = k_{E0} f(c_{Mi}, \dots). \quad (6.27)$$

Mit den berechneten Stoffflüssen r_{rech} aus der Stoffflußanalyse kann man dann obige Gleichung nach der spezifischen Aktivität k auflösen

$$k = \frac{r_{rech}}{c_{E0} f(c_{Mi}, \dots)}. \quad (6.28)$$

Ist die Enzymkonzentration konstant oder nicht bekannt, kann nach der maximalen Rate $r_{max} = k_{E0}$ aufgelöst werden. Alle Parameter sind im Anhang C zusammengestellt.

6.2.2 Simulationsstudien

Simulationsstudien des Grundmodells sollen dazu dienen, das grundlegende Verhalten des Modells aufzuzeigen und den Verlauf von charakteristischen Zustandsgrößen zu diskutieren. Abbildung 6.8 zeigt den Verlauf der Zustandsgrößen in der Flüssigphase (Glucose, Lactose) und den Verlauf der Biomasse. Im zeitlichen Verlauf der Biomasse sind zwei Wachstumsphasen zu erkennen, die mit dem Verlauf der Zuckerkonzentrationen einhergehen. Zunächst wird nur die Glucose verstoffwechselt und erst nach deren Verbrauch die Lactose. In der Umschaltphase geht die spezifische Wachstumsrate fast auf Null zurück und steigt beim Wachstum auf Lactose wieder an. Um das Phänomen zu verstehen, werden zunächst Größen aus dem oben vorgestellten Signaltransduktionssystem (Abbildung 6.6) betrachtet.

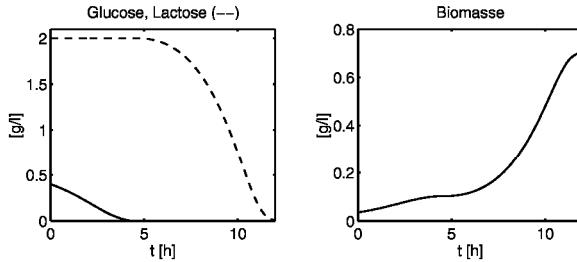


Figure 6.8: Verlauf von Glucose, Lactose und Biomasse in der Flüssigphase.

Abbildung 6.9 links zeigt den Verlauf des Proteins *EIIA* in unphosphorylierter und phosphorylierter Form (*EIIAP*). Der Verlauf der Größen ist spiegelbildlich, da die Gesamtmenge an Protein unverändert ist. In der ersten Wachstumsphase ist die Komponente fast vollständig in unphosphorylierter Form, da die Phosphatgruppe als Energiequelle für die Aufnahme der extrazellulären Glucose benötigt wird. Der scharfe Verlauf in der Übergangsphase wird durch die rechte Abbildung verdeutlicht. Gezeigt ist der Verlauf der Aufnahmeraten an Glucose nur in der ersten Wachstumsphase. Glucose wird über zwei Systeme mit unterschiedlichen Affinitäten aufgenommen. Für die Simulation ist angenommen, dass sich das PTS als “scavenger system” verhält, also nur eine niedrige maximale Aufnahmerate

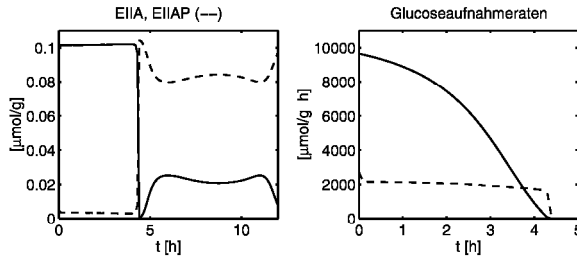


Figure 6.9: Links: Verlauf von unphosphoryliertem und phosphoryliertem EIIA. Rechts: Verlauf der beiden Aufnahmeraten für Glucose in der ersten Wachstumsphase. Durchgezogene Linie: Aufnahmerate des niedrig affinen Transporters; Gestrichelte Linie: Rate des PTS.

besitzt. Die höhere Affinität macht sich bei niedrigen Substratkonzentrationen bemerkbar: während das PTS noch voll aktiv ist, nimmt die Aufnahme über den zweiten Transporter rasch ab. Erst nach fast vollständigem Verbrauch der Glu-

cose fällt die Aufnahme rate über das PTS auf Null ab. Dies hat zur Folge, dass die Phosphatgruppen nicht mehr weiter übertragen werden können und *EIIAP* fast komplett in phosphorylierter Form vorliegt. Der weitere zeitliche Verlauf von *EIIA* hängt nun in starkem Maße von den kinetischen Parametern des PTS ab. Da die Reaktionsgleichungen als reversibel angenommen werden und als Eingangsgröße keine Glucose mehr vorhanden ist, aber die Metabolite *PEP* und Pyruvat noch vorliegen, beobachtet man, dass die phosphorylierte Form *EIIAP* ein Maximum durchläuft und um einen stationären Wert pendelt.

Abbildung 6.10 zeigt den zeitlichen Verlauf von zwei weiteren Größen im Signaltransduktionsweg: *cAMP* und *Crp*. Der Verlauf von *cAMP* ist eng mit dem

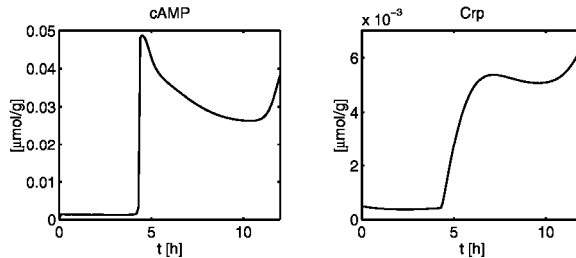


Figure 6.10: Links: Verlauf von *cAMP*. Rechts: Verlauf von *Crp*.

Verlauf von *EIIAP* gekoppelt. *EIIAP* ist essentieller Aktivator der Adenylatzyklase. *cAMP* nimmt nach Verbrauch von Glucose schnell zu. In der zweiten Wachstumsphase nimmt *cAMP* wieder ab, da der Komplex *cAMP.Crp* ein Repressor der Synthese der Adenylatzyklase ist. Der Komplex *cAMP.Crp* ist ein Aktivator der Synthese von *Crp* selbst. Daher ist hier ebenfalls ein Anstieg in der zweiten Wachstumsphase zu beobachten. Durch den Rückgang der *cAMP* Konzentration kommt es zur Erniedrigung der *Crp* Konzentration. Der erneute Anstieg beider Kurven am Ende des Simulationslaufes ist durch den vollständigen Verbrauch beider Substrate zu erklären.

Abbildung 6.11 zeigt den Verlauf der Syntheserate der Enzyme für den Lactoseabbau und den Verlauf von *LacZ*. Der Anstieg von *LacZ* am Ende der Simulation ist wiederum auf den Einfluß der Wachstumsrate zurückzuführen.

Im folgenden soll die Rolle des PTS für das gezeigte Verhalten noch einmal herausgestrichen werden. In der Simulationsstudie ist die maximale Rate des Transportenzym variert. Abbildung 6.12 zeigt für zunehmende Werte das Verhalten des Systems. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf von Biomasse, *EIIA*, *cAMP* und *LacZ*. Für niedrige Werte ist kein zweiphasiges Wachstum mehr zu erkennen.

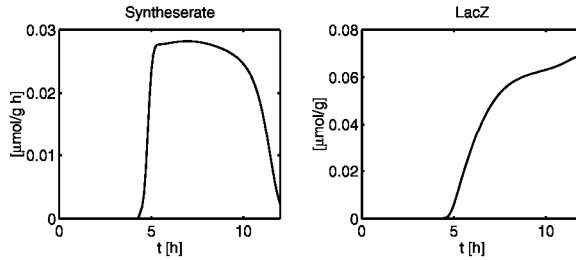


Figure 6.11: Verlauf der Syntheserate der Enzyme für den Lactoseabbau, Verlauf von *LacZ*.

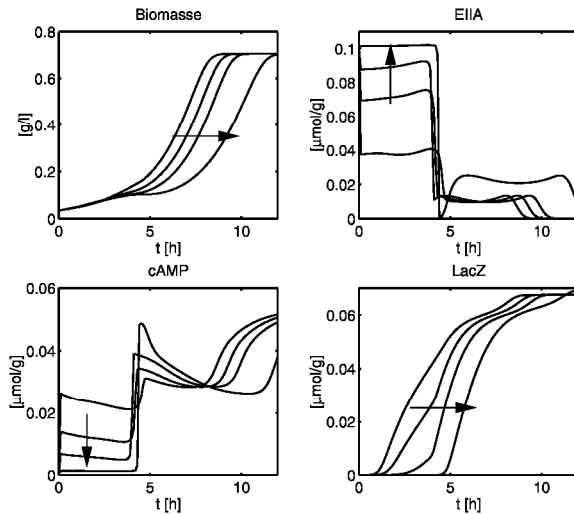


Figure 6.12: Zeitlicher Verlauf von Biomasse, *EIIA*, *cAMP* und *LacZ* in Abhängigkeit der Glucoseaufnahme über das PTS. Variiert wurde die maximale Aufnahme-rate, die in Pfeilrichtung zunimmt.

Dieses hängt in starkem Maße von der Aufnahme der Glucose über das PTS ab.

6.3 Modellerweiterung: Phosphorylierung intrazellulärer Glucose

In diesem Abschnitt steht die Phosphorylierung intrazellulärer Glucose *Glc* im Vordergrund. *Glc* gelangt über Nicht-PTS Transporter in die Zelle und entsteht zusätzlich bei der Spaltung von intrazellulärer Lactose, wie in Abbildung 6.13 veranschaulicht ist. Es soll folgender Hypothese nachgegangen werden:

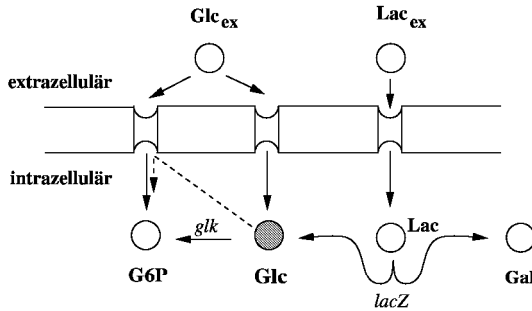


Figure 6.13: Schematische Darstellung der Phosphorylierung der intrazellulären Glucose. Intrazelluläre Glucose *Glc* entsteht durch Spaltung der Lactose sowie durch direkte Aufnahme aus dem Medium. *Glc* wird über die Glukokinase phosphoryliert. Alternativ besteht die Möglichkeit der Phosphorylierung durch das PTS (gestrichelt gezeichnet).

- Intrazelluläre Glucose kann zusätzlich zur Glukokinase auch über das PTS phosphoryliert werden.

Glucose, die aus dem Medium aufgenommen wird, muß zunächst durch die Zellwand gelangen, da die phosphorylierte Komponente an der Innenseite der Membran liegt. Aus diesem Grund scheint es plausibel, dass Glucose, die intrazellulär gebildet wird, ebenfalls über die Innenseite der Membran phosphoryliert werden kann. Der Mechanismus der enzymatischen Umsetzung ist dann wie in Abbildung 6.14 gezeigt entsprechend zu erweitern. Die beiden Substrate *Glc* und extrazelluläre Glucose verhalten sich kompetitiv zueinander, da sie um die gleiche

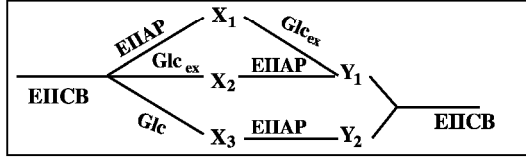


Figure 6.14: Erweiterung des Mechanismus für das Enzym *EIICB* um die Phosphorylierung von intrazellulärer Glucose. Beide Komplexe Y_1 und Y_2 tragen zur Bildung von *Glc6P* bei.

Enzymbindungsstelle konkurrieren. Die entsprechenden Raten r'_3 für die extrazelluläre Glucose und r''_3 für die intrazelluläre Glucose ergeben sich zu

$$r'_3 = \frac{k_3 \cdot c_{EIICB0} \cdot c_{EIAP} \cdot c_{GLC_{ex}}}{(K_{EIAP} + c_{EIAP})(K_{Glc_{ex}} + c_{Glc_{ex}} + \frac{K_{Glc_{ex}} \cdot c_{Glc}}{K_{Glc}})} \quad (6.29)$$

$$r''_3 = \frac{\alpha_{EIICB} \cdot k_3 \cdot c_{EIICB0} \cdot c_{EIAP} \cdot c_{GLC}}{(K_{EIAP} + c_{EIAP})(K_{Glc} + c_{Glc} + \frac{K_{Glc} \cdot c_{Glc_{ex}}}{K_{Glc_{ex}}})} \quad (6.30)$$

wobei α_{EIICB} ein Maß dafür ist, ob die zweite Reaktion einen größeren Maximalwert besitzt als die erste Reaktion. Parameter α_{EIICB} soll nun in der folgenden Simulationsstudie variiert werden. Abbildung 6.15 zeigt den Verlauf der beiden Raten r_{g2} und r'_3 über die die intrazelluläre Glucose phosphoryliert wird. Die intrazelluläre Glucose wird in der ersten Wachstumsphase fast vollständig über die Glukokinase phosphoryliert. In der zweiten Wachstumsphase nimmt die Rate

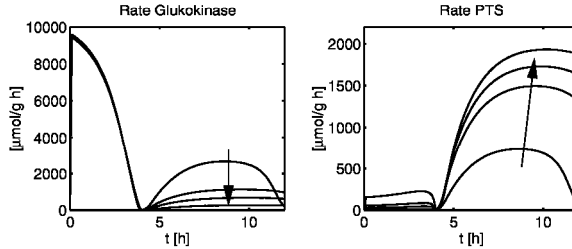


Figure 6.15: Verlauf der Raten der Phosphorylierung intrazellulärer Glucose in Abhängigkeit des Parameters α_{EIICB} . Links: Rate der Glukokinase. Rechts: Rate des PTS.

über das PTS mit größerem α_{EIICB} zu. Die zunehmende Aktivität des PTS hat

indirekte Folgen in der zweiten Wachstumsphase. Protein *EIIA* liegt vermehrt in nichtphosphorylierter Form vor, was bedeutet, dass die Lactoseaufnahme wieder verstärkt gehemmt wird. Abbildung 6.16 zeigt den zeitlichen Verlauf von *EIIA*, der Lactoseaufnahme, der spezifischen Wachstumsrate μ und der Biomassekonzentration. Die Auswirkungen der verminderten Lactoseaufnahme sind im

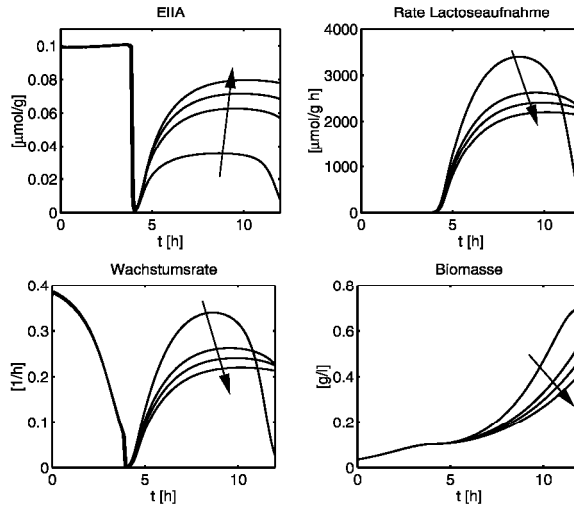


Figure 6.16: Verlauf der Konzentration von *EIIA* (links oben) und der Lactoseaufnahme (rechts oben) sowie von Wachstumsrate μ (links unten) und Biomassekonzentration (rechts) in Abhängigkeit von Parameter α_{EIICB} .

schwächeren Anstieg der Wachstumsrate und damit in der Biomasse zu erkennen.

Der vorgestellte Rückkopplungsmechanismus hat für die Zelle folgenden Vorteil. Eine hohe Lactoseaufnahme führt unter Umständen zu hohen Konzentrationen an phosphorylierten Metaboliten, die, obwohl essentiell, in hohen Konzentrationen toxisch wirken können. Dies wird durch Hemmung des Lactoseaufnahmesystems verhindert. Folgende Simulationsstudie variiert die maximale Aufnahme an Lactose und stellt den Verlauf von *Glc6P* für die Fälle mit und ohne Rückkopplung dar. Abbildung 6.17 macht deutlich, dass Änderungen in der Lactoseaufnahme recht drastische Änderungen im zeitlichen Verlauf von Glykolysemetaboliten haben können. Durch die Rückkopplung wird der variierte Parameter – hier die maximale Lactoseaufnahme – insensitiv. Diese Erkenntnis ist auch in Hinblick

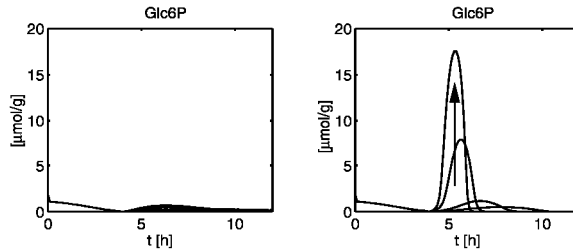


Figure 6.17: Vergleich der beiden Modelle in Hinblick auf das Verhalten von *Glc6P*. Links Modell mit Rückkopplung; rechts ohne Rückkopplung in Abhängigkeit der maximalen Lactoseaufnahme, die in Pfeilrichtung erhöht wurde.

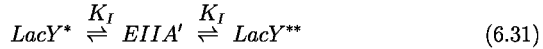
auf die Identifizierung unbekannter Parameter von Bedeutung, da der meßtechnische Aufwand zur Bestimmung der Parameter erheblich sein kann. Durch Simulationsstudien kann im Vorfeld abgeklärt werden, welche Parameter eine niedrige Sensitivität besitzen und bei der Identifikation zunächst zurückgestellt werden können.

6.4 Modellerweiterung: Komplexierung *LacY* mit *EIIA*

In diesem Abschnitt soll untersucht werden, welchen Einfluß die Komplexierung des Lactosetransporters *LacY* mit dem PTS Protein *EIIA* hat. *EIIA* bindet allosterisch an das Transportenzym und inhibiert die Aufnahme von Lactose. Bei der Anwendung der Methoden aus der Enzymkinetik geht man in der Regel davon aus, dass inhibitorisch oder aktivierend wirkende Effektoren in deutlich größeren Konzentrationen vorliegen als Enzyme. Physiologisch relevante Werte aus der Literatur zeigen, dass bspw. Intermediate aus dem Kohlenhydratabbau im Durchschnitt im Bereich von $0.1 - 10 \text{ } [\mu\text{mol/g}]$ liegen; Enzymkonzentrationen im Bereich von $10^{-4} - 10^{-3} \text{ } [\mu\text{mol/g}]$. In der Bilanzgleichung der Metabolite wird der am Enzym gebundene Anteil daher in der Regel vernachlässigt.

Bei Protein-Protein Wechselwirkungen ist jedoch zu erwarten, dass die Mengenverhältnisse eine Rolle spielen können. Die Gesamtzymmenge an *LacY* liegt im Bereich von $0.06 \text{ } [\mu\text{mol/g}]$; die des Effektors *EIIA* im Bereich von $0.1 \text{ } [\mu\text{mol/g}]$. Um die Wechselwirkung zu beschreiben, ist der Modellbaustein für das PTS zu erweitern. Im Reaktionssystem (6.3) ist dazu die zweite Gleichung zu modifizieren. Unphosphoryliertes *EIIA* ist in drei Konformationen zu betrachten: freie Form *EIIA'*, gebunden an freien Lactosetransporter *LacY** und gebunden an den Lactosetransporter, der bereits mit dem Substrat komplexiert ist *LacY***. Es

wird angenommen, dass die drei Konformationen im Gleichgewicht miteinander stehen. Es gilt mit der Bindungskonstanten K_I



An der Phosphatübertragung kann aber nur das freie $EIIA'$ teilnehmen. Die entsprechende Reaktionsrate r'_2 ergibt sich mit dem Anteil $\xi_{EIIA'}$ nach Anwendung der Regel von Cha zu

$$r'_2 = k_2 (\xi_{EIIA'} c_{EIIA} c_{HPrP} - K_2 c_{EIIAP} c_{HPr}) . \quad (6.32)$$

Setzt man die Bindungskonstante K_I für den Effektor und K_S für das Substrat Lactose ein, ergibt sich für $\xi_{EIIA'}$ mit der Gesamtzymkonzentration c_{E0LacY}

$$\begin{aligned} \xi_{EIIA'} &= \frac{EIIA'}{LacY^* + EIIA' + LacY^{**}} \\ &= \frac{K_I K_S}{K_I K_S + K_S c_{E0LacY} + c_{E0LacY} c_{Lacex}} . \end{aligned} \quad (6.33)$$

Abbildung 6.18 zeigt in Abhängigkeit der Bindungskonstanten K_I den zeitlichen Verlauf von $EIIA$ und $EIIA'$. Während die Gesamtmenge an unphosphorylier-

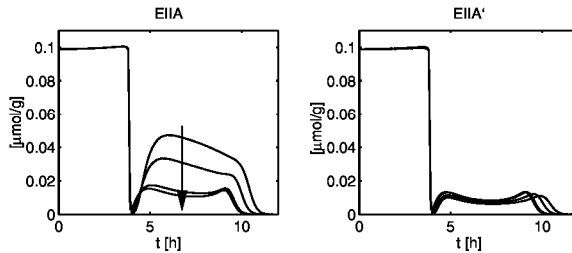


Figure 6.18: Zeitlicher Verlauf von $EIIA$ und $EIIA'$ (*freie Form*). Variiert wurde die Bindungskonstante K_I .

tem $EIIA$ in der zweiten Wachstumsphase eine starke Abhängigkeit vom Parameter zeigt, ist der freie Anteil nahezu unverändert. Für große Bindungskonstanten, was einer schwachen Anbindung entspricht, fallen die Kurven fast aufeinander. Das Gesamtverhalten des Systems wird kaum merklich beeinflusst.

Um die Auswirkungen der Komplexbildung besser zu veranschaulichen, ist ein in der Literatur vorgestelltes reales Experiment in einer Simulationsstudie nachgebildet worden. Rohwer et al. [65] haben in *Salmonella typhimurium* das Glycerin Aufnahmesystem vorinduziert und die Hemmung der Aufnahme von Methyl-Glucopyranosid über ein PTS untersucht. Das Glycerin System wird ähnlich wie das Lactose-Aufnahmesystem durch *EIIA* inhibiert, nur dass nicht der Transporter, sondern die folgende Kinase inhibiert wird. Bei den Experimenten, bei denen

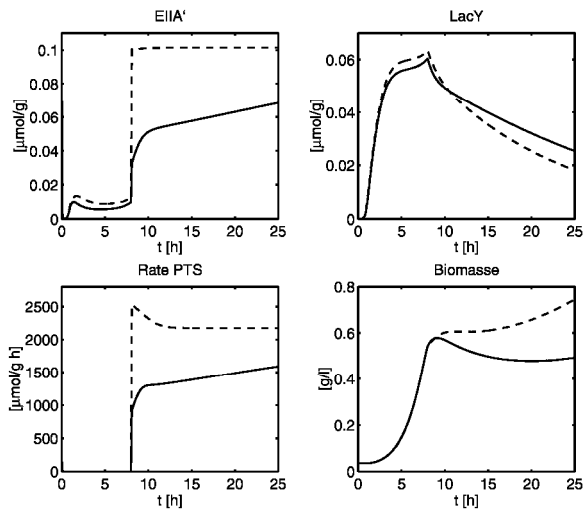


Figure 6.19: Zeitlicher Verlauf von *EIIA* (*EIIA'*), *LacY*, PTS Aufnahmerate und Biomasse. Modell mit Berücksichtigung der Komplexbildung durchgezogene Linie, Modell ohne Berücksichtigung der Komplexbildung gestrichelte Linie.

das Glycerin Aufnahmesystem bereits voll induziert war, konnte eine deutliche Hemmung des PTS beobachtet werden. Mit dem vorgestellten Modell soll der Versuch in folgender Weise nachgebildet werden: Zunächst liegt in einem Batch nur Lactose im Medium vor und die entsprechenden Enzyme werden synthetisiert. Nach ca. 8 Stunden – kurz bevor die Lactose vollständig verbraucht ist – wird Glucose mit fester Rate und Konzentration zugeführt. Abbildung 6.19 zeigt das Verhalten der Modelle mit und ohne Berücksichtigung der Komplexbildung. Freies Protein *EIIA* liegt im Fall der Komplexbildung in deutlich niedrigerer Konzentration vor. Damit kann das PTS im Vergleich zum Modell ohne Komplexbildung weniger Zucker aufnehmen und die Biomasse geht in Folge der Verdünnung durch

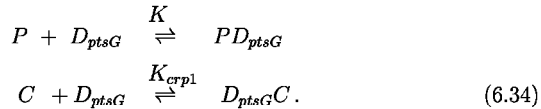
den Zufluß sogar zurück. Nach Verbrauch der Lactose wird kein neues *LacY* mehr synthetisiert und infolge der Verdünnung durch das Wachstum nimmt die Konzentration ab. Damit steigt das freie *EIIA* langsam an.

6.5 Modellerweiterung: Regulation der Synthese von *EIICB*

Während des Entstehens der vorliegenden Arbeit haben sich biologische Arbeitsgruppen intensiv mit der Regulation der Synthese des Glucose Transporters *EIICB* beschäftigt. Zwei wesentliche Aspekte gelten heute als sicher: (i) Die Synthese wird durch den *cAMP.Crp* Komplex aktiviert. (ii) Die Synthese erfolgt nur, wenn Glucose im Medium vorhanden ist. Allerdings ist der Mechanismus der Induktion Schwerpunkt laufender biologischer Forschungstätigkeit und noch nicht vollständig aufgeklärt. In diesem Abschnitt soll zunächst die Aktivierung durch *cAMP.Crp* in das Modell aufgenommen werden und anschließend ein vorgeschlagener Mechanismus der Induktion diskutiert werden.

6.5.1 Aktivierung der Synthese durch *cAMP.Crp*

Das in Abschnitt 6.1.3 erstellte Modell für den Koordinatorbaustein für das *Crp* Protein ist zunächst zu erweitern. Folgende Reaktionsgleichungen müssen zusätzlich aufgenommen werden:



Die Gleichung, die für die Gesamtmenge an Promotor zu lösen ist, lautet:

$$c_{D0_{ptsG}} = c_{D_{ptsG}} + c_{PD_{ptsG}} + c_{D_{ptsG}C}. \quad (6.35)$$

Für die nachfolgende Simulation ist die Anfangsbedingung so gewählt, dass *EIICB* zunächst nicht in der Zelle vorhanden ist. Alle anderen Bedingungen entsprechen dem oben vorgestellten Grundmodell. Wie in Abbildung 6.20 zu sehen ist, nimmt die Konzentration von *EIICB* zu. Da jedoch zu Beginn der Simulation nur einige Moleküle vorhanden sind, liegt Protein *EIIA* größtenteils in phosphorylierter Form vor. Dies führt zum Anstieg von *cAMP*, was wiederum die Synthese von *EIICB* beschleunigt. Durch diesen Effekt wird *EIICB* rasch gebildet; der Anteil an phosphoryliertem *EIIA* geht zurück, da das Phosphat nun für den Transport benötigt wird. Der *cAMP* Spiegel senkt sich wieder. Nach Verbrauch der Glucose steigt der *cAMP* Spiegel erwartungsgemäß an. Dies führt zu einer verstärkten Expression von *EIICB*, was aber zu diesem Zeitpunkt physiologisch gesehen wenig sinnvoll erscheint, da keine Glucose mehr im Medium vorhanden ist.

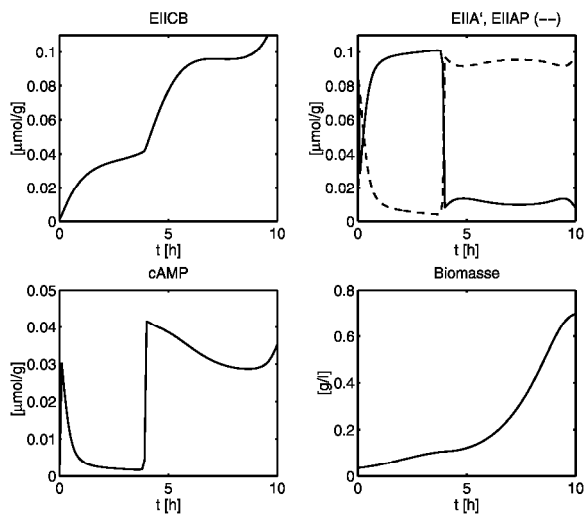


Figure 6.20: Zeitlicher Verlauf von *EIICB*, *EIIA*, *EIAP*, *cAMP* und Biomasse. Protein *EIICB* liegt zu Beginn des Experiments nicht vor und wird erst synthetisiert.

6.5.2 Induktion von *EIICB* durch Glucose

Da zunächst keine Modellvorstellungen über diesen Mechanismus vorhanden waren, ist ein einfacher Signaltransduktionsweg postuliert und untersucht worden. Abbildung 6.21 zeigt schematisch die Modellerweiterung mit einem hypothetischen Repressor R , der durch Glucose inaktiviert wird. Die entsprechenden Gleichungen lauten:

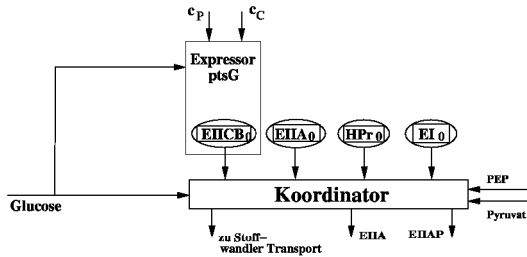
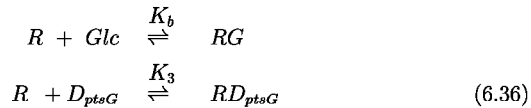


Figure 6.21: Schematische Darstellung des Modells mit Induktion durch Glucose.

Der Effekt der Induktion von *EIICB* hat Änderungen im Signaltransduktionsweg sowie Änderungen der katabolen Flußverteilung zur Folge. Abbildung 6.22 stellt die beiden Modellvarianten gegenüber. Ein deutlicher Effekt auf den Stofffluß ist nur zu erwarten, wenn die interne Glucose auch über das PTS phosphoryliert wird. Durch den Anstieg von *EIICB* in der zweiten Wachstumsphase ändert sich auch der Phosphorylierungsgrad der PTS Proteine. Gezeigt ist hier der Verlauf von *EIIAP*, welches in der zweiten Wachstumsphase dann deutlich niedrigere Werte annimmt, da die Phosphatgruppen auf *EIICB* übertragen sind. Damit ändert sich auch der Verlauf von *cAMP* (nicht gezeigt), was Änderungen der Syntheseraten der betroffenen Enzyme zur Folge hat. Änderungen ergeben sich auch in der Flußverteilung zwischen Glukokinase und PTS bei der Phosphorylierung der intrazellulären Glucose. Wird die weitere Synthese von *EIICB* verhindert, so steigt die Rate der Glukokinase wieder an; im anderen Fall erfolgt die Phosphorylierung der intrazellulären Glucose ausschließlich über das PTS.

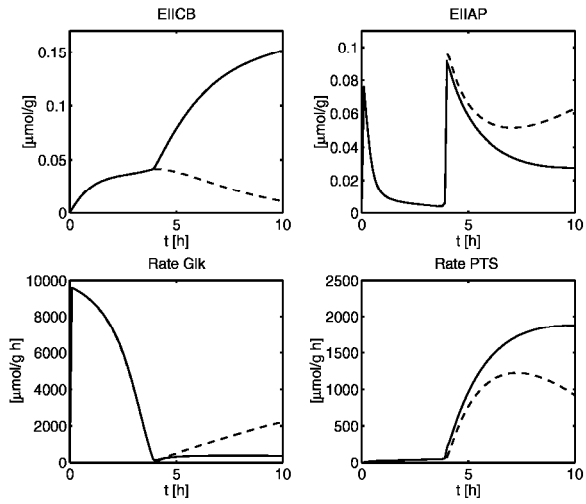


Figure 6.22: Zeitlicher Verlauf von *EIICB*, *EIIP*, Glukokinase Rate und PTS Rate. Modell ohne Berücksichtigung der Induktion durchgezogene Linie, Modell mit Berücksichtigung der Induktion gestrichelte Linie.

Das JAHREIS-Modell der Induktion

Zum Abschluß des Kapitels soll eine noch bisher unveröffentlichte Modellvorstellung der Induktion von *EIICB*, die von Knut Jahreis, Osnabrück (persönliche Mitteilung), entwickelt wurde, näher untersucht und in einem mathematischen Modell abgebildet werden. Abbildung 6.23 zeigt schematisch den Mechanismus. Das Transportprotein *EIICB* liegt wie die anderen Komponenten des PTS in phosphorylierter und nicht phosphorylierter Form vor. Bei Anwesenheit von Glucose im Medium ist davon auszugehen, dass *EIICB* hauptsächlich in der nicht-phosphorylierten Form vorliegt. Ist keine Glucose vorhanden oder geht Glucose aus, so sollte die phosphorylierte Form dominieren. Die nichtphosphorylierte Form deaktiviert ein Protein *DgsA*. Die aktive Form dieses Proteins ist der Repressor, der den Operator von *ptsG* belegt und das Ablesen der genetischen Information im anderen Fall verhindert.

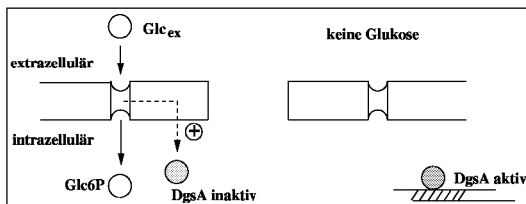


Figure 6.23: Modellvorstellung der Induktion von *EIICB*. Links: Glucose vorhanden. *DgsA* liegt in der inaktiven Form vor. Rechts: Keine Glucose im Medium vorhanden. *DgsA* ist aktiv und hemmt die Synthese von *EIICB*.

Um die biologische Modellvorstellung umzusetzen, sind zunächst die zusätzlichen Modellbausteine auszuwählen, zu parametrieren und zu verschalten. Abbildung 6.24 zeigt die Modellbausteine und ihre Verschaltung. Im oberen Koordinatorbaustein wird zunächst der aktive und inaktive Anteil von *DgsA* ermittelt. Nach der Vorstellung von JAHREIS sind bestimmte Konformationen des Transporters daran beteiligt. Der Mechanismus der Anbindung von *DgsA_{aktiv}* an die DNA und die Modifikation des Signals aus der oberen Ebene erfolgt analog der Vorgehensweise bei Lactose.

In einem ersten Schritt ist der Koordinatorbaustein zur Beschreibung der Aktivierung/Deaktivierung von *DgsA* zu betrachten. Es wird angenommen, dass beide Konformationen im Gleichgewicht miteinander stehen und sich die Gleichgewichtskonstante K_{DgsA} als eine Funktion von *EIICB* ausdrücken läßt:

$$DgsA_{inaktiv} \xrightleftharpoons{K_{DgsA}} DgsA_{aktiv} \quad (6.37)$$

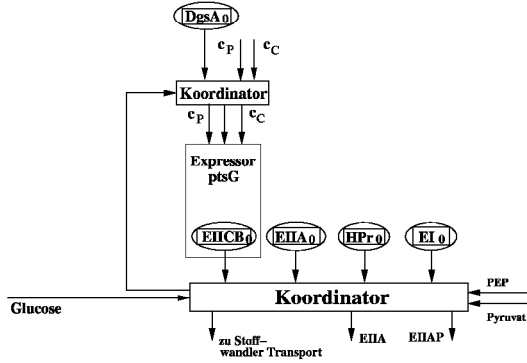


Figure 6.24: Schematische Darstellung des Modells mit Induktion durch ein PTS Protein nach der Modellvorstellung von JAHREIS.

Die aktive Form von $DgsA$ berechnet sich aus der Gesamtkonzentration c_{DgsA0} und der Gleichgewichtskonstanten K_{DgsA} zu

$$c_{DgsA_{aktiv}} = \frac{c_{DgsA0}}{1 + K_{DgsA}} \quad (6.38)$$

Um eine sinnvolle Funktion $K_{DgsA} = f(EIICB)$ anzugeben, ist zunächst zu überlegen, welche Konformationen von $EIICB$ hier zum Tragen kommen können. Dazu wurde eine Vorstudie durchgeführt, die bei konstanter Konzentration c_{EIICB0} den zeitlichen Verlauf einzelner Konformationen des Enzyms verfolgt (die einzelnen Konformationen von $EIICB$ sind Abbildung 6.14 zu entnehmen). Abbildung 6.25 stellt zwei Gruppen einander gegenüber. In Gruppe 1 sind die unphosphorylierten Konformationen freies $EIICB'$, $X2$ und $X3$ zusammengefaßt. Gruppe 2 faßt alle Konformationen zusammen, an die extrazelluläre Glucose ($X2$, $Y1$) oder intrazelluläre Glucose ($X3$, $Y2$) gebunden hat. Es ergeben sich folgende Gleichungen für die Anteile f_{G1} und f_{G2} am gesamten Enzym c_{EIICB0} mit $c_{G1} = c_{EIICB} + c_{X2} + c_{X3}$ und $c_{G2} = c_{X2} + c_{X3} + c_{Y1} + c_{Y2}$

$$f_{G1} = \frac{c_{G1}}{c_{EIICB0}} = \frac{K_{EIICB}}{K_{EIICB} + c_{EIICB}} \quad (6.39)$$

$$f_{G2} = \frac{c_{G2}}{c_{EIICB0}} = \frac{K_{Glc_{in}} c_{Glc_{ex}} + K_{Glc_{ex}} c_{Glc_{in}}}{K_{Glc_{in}} K_{Glc_{ex}} + K_{Glc_{in}} c_{Glc_{ex}} + K_{Glc_{ex}} c_{Glc_{in}}} \quad (6.40)$$

Die Abbildung macht deutlich, dass als Signal für die Induktion, die in Gruppe 2 zusammengefaßten Konformationen sinnvoller erscheinen. Dies ist damit zu begründen, dass nach dem Verbrauch der Glucose ein schärferes Signal zu erkennen

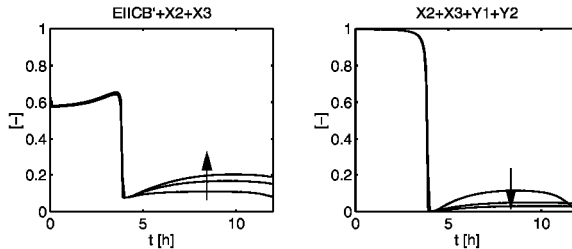


Figure 6.25: Anteil der Konformationen in Gruppe 1 (links) und in Gruppe 2 (rechts) an der gesamten Konzentration c_{EIICB0} . Variiert wurde die maximale Rate der Phosphorylierung der intrazellulären Glucose über das PTS.

ist. Im linken Teil der Abbildung ist zudem ein neuer Anstieg der Kurve in der zweiten Wachstumsphase zu erkennen. Dies liegt an der Phosphorylierung der intrazellulären Glucose und würde zu einer weiteren Synthese führen. In Gruppe 2 spielt dies keine große Rolle. Mit zunehmender Phosphorylierung nimmt die Kurve sogar ab, da die Affinität von *EIIAP* zu *EIICB* stärker ist.

Die gesuchte Funktion $K_{DgsA} = f(EIICB)$ muß noch Eckwerte erfüllen. Faßt man die Konformationen von Gruppe 2 zur Konzentration c_{G2} zusammen, so muß gelten:

$$f\left(\frac{c_{G2}}{c_{EIICB0}} = 0\right) = 0 \quad f\left(\frac{c_{G2}}{c_{EIICB0}} \rightarrow 1\right) \rightarrow K_{max}, \quad (6.41)$$

wobei K_{max} ein festzulegender Parameter ist, der in den Simulationsexperimenten anzupassen ist. Abbildung 6.26 zeigt den Verlauf von *EIICB* und *DgsA_{aktiv}* für unterschiedliche Anfangsbedingungen mit der Funktion

$$f = \frac{K_{max} \left(\frac{c_{G2}}{c_{EIICB0}}\right)^2}{K_m + \left(\frac{c_{G2}}{c_{EIICB0}}\right)^2}. \quad (6.42)$$

Liegt Glucose im Medium vor, so wird *EIICB* synthetisiert. Nach Verbrauch von Glucose kommt es infolge des Anstiegs von *cAMP* noch kurzzeitig zur weiteren Synthese. Da nun aber *DgsA* in aktivierter Form vorliegt, wird die Synthese reprimiert. Die Konzentration der aktiven Form von *DgsA* nimmt ab, da intrazelluläre Glucose den Gleichgewichtszustand wiederum verschiebt. Ist keine Glucose vorhanden, so wird nur ein Basalniveau an *EIICB* gebildet. *DgsA* ist in der aktiven Form und verhindert eine starke Transkription des *ptsG* Gens.

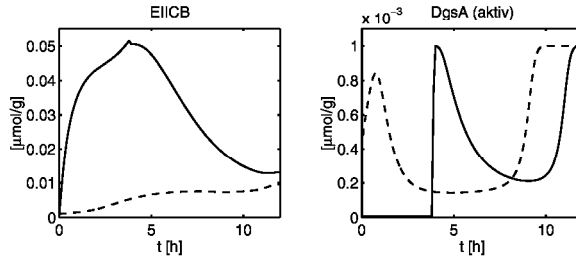


Figure 6.26: Zeitlicher Verlauf von *EIICB* und *DgsA* für unterschiedliche Anfangsbedingungen. Durchgezogene Linien: Glucose und Lactose zu Beginn im Medium vorhanden. Gestrichelte Linien: Nur Lactose im Medium vorhanden.

6.6 Zusammenfassung

In diesem Kapitel sind detaillierte Modellvorstellungen über die Kataboliten Repression bei *Escherichia coli* in ein mathematisches Modell umgesetzt worden. Damit konnte gezeigt werden,

- dass die Definition der Modellbausteine tragfähig ist, um detailliertes biologisches Wissen abzubilden
- dass das Modell dem ganzheitlichen Anspruch gerecht wird, da das gesamte biochemische Reaktionsnetzwerk berücksichtigt ist, wobei ein kleiner Teil des Stoffwechsels sehr detailliert, der andere Teil sehr vereinfacht abgebildet wurde
- dass die Möglichkeit besteht, Hypothesen umzusetzen sowie Vorstudien zu machen, um Biologen Hinweise zu geben, ob Modellvorstellungen sinnvoll scheinen (siehe JAHREIS-Modell der Induktion).

Kapitel 7

Simulationsstudien genetisch veränderter Organismen – die KIMATA-Stämme

Ziel der folgenden Simulationsstudien ist es, zu zeigen, dass das im letzten Kapitel vorgestellte Modell reale Experimente in Schüttelkolben korrekt wiedergibt. Der Begriff der Modellvalidierung ist hier etwas weiter gefaßt: Das Verhalten der Stämme soll qualitativ richtig wiedergegeben werden, wobei aber die vorhandenen Zeitverläufe von wenigen Zustandsgrößen quantitativ richtig beschrieben werden sollen. Experimente, die genügend Daten liefern, um das Modell vollständig zu validieren, sind zur Zeit nicht verfügbar. Dies liegt hauptsächlich an der aufwendigen Meßtechnik, um den zeitlichen Verlauf von intrazellulären Proteinmengen und Metabolitkonzentrationen zu bestimmen. Die Menge an Protein wird heute oft über die spezifische Aktivität bestimmt, wobei man annimmt, dass zwischen beiden Größen ein konstanter Umrechnungsfaktor besteht. Dies ist bei den in diesem Kapitel vorgestellten Experimenten für das Enzym *LacZ* der Fall. Die in Veröffentlichungen angegebenen Daten sind in der Regel in *units* angegeben. Aus einer anderen Arbeit ist ein Referenzwert für die maximale Konzentration angegeben [26]. Damit ist ein Umrechnungsfaktor gefunden, der in allen Simulationsrechnungen verwendet wurde.

Kimata et al. aus der Arbeitsgruppe von H. Aiba in Nagoya, Japan, haben in einer Veröffentlichung [29] eine ganze Reihe von Stämmen vorgestellt, die Mutationen in den im vorhergehenden Kapitel modellierten Signaltransduktionswegen besitzen. Bei den Experimenten sind die Zeitverläufe der *LacZ* Aktivität und der Biomasse angegeben. Als Ausgangsstamm wurde eine *E. coli*-Mutante gewählt, die einen veränderten Promotor für die *lac*-Gene besitzt. Dieser Stamm wird im folgenden als Referenzstamm bezeichnet. Ausgehend davon, sind Mutationen in

den Genen *crr*, *crp*, *ptsG*, *cya* und *lacY* eingebracht und untersucht worden. Weiterhin sind in diese Mutanten bestimmte Gene wieder auf einem Plasmid eingebracht worden, die aber eine veränderte Kontrollsequenz besitzen. Die Anpassung der Daten erfolgte an insgesamt sechs Stämme; im folgenden sollen drei Stämme ausführlicher diskutiert werden.

7.1 Die L8UV5-Mutation – der Referenzstamm

Für die Modellierung wird von dem in Kapitel 6 vorgestellten Grundmodell ausgegangen, wobei die Phosphorylierung der intrazellulären Glucose über das PTS, die Komplexbildung von *EIIA* mit *LacY* und die Regulation der Synthese von *EIICB* integriert sind. Bei der Induktion von *EIICB* liegt allerdings der einfachere Ansatz zu Grunde (Kapitel 6.5.2), da das JAHREIS-Modell noch in der Entwicklung begriffen ist und noch keine gesicherten Erkenntnisse vorliegen, ob der Mechanismus Gültigkeit besitzt.

Der L8UV5-Stamm besitzt eine veränderte Kontrollsequenz des *lac* Operons, so dass der Stamm nur eine sehr schwache Abhängigkeit von dem Aktivator *Crp* zeigt. Damit es aber trotzdem zur Expression der Gene kommt, wurde ein starker Promotor eingesetzt. Diese Mutationen sind im Modell realisiert, in dem

- (i) der Wechselwirkungsparameter α zwischen *Crp* und der RNA-Polymerase für das *lac* Operon stark vermindert wurde (Gleichung (6.11)) und
- (ii) das Eingangssignal c_P (freie Polymerase) in den Koordinatorbaustein für *Crp* stärker gewichtet wurde (siehe Abbildung 6.4).

Abbildung 7.1 zeigt den zeitlichen Verlauf von der Konzentrationen von Biomasse und *LacZ* im Vergleich zu den experimentellen Daten. Das Signaltransduktionssystem für das *crp* Modulon wird durch die Verläufe der Konzentrationen von *EIIA*, *cAMP*, *Crp* und *Cya* charakterisiert, die in Abbildung 7.2 gezeigt sind. Für den Stoffwechselweg Lactose sind intrazelluläre Lactose und Allolactose gezeigt. Die Verläufe der Konzentrationen von *EIIA'* und *cAMP* sind aus Kapitel 6 bekannt. Die Konzentration von *Crp* nimmt nach dem Verbrauch von Glucose zu. Dies liegt zum einen an der positiven Autoregulation und zum anderen an der niedrigen Wachstumsrate. Nach dem Abklingen des *cAMP* Spiegels sinkt *Crp* wieder ab. Die negative Rückkopplung von *cAMP* auf die Konzentration der Adenylatzyklase ist kaum zu bemerken, da hier ebenfalls die Wachstumsrate einen Beitrag in der Bilanzgleichung hat. Lactose gelangt sehr schnell in die Zelle und staut sich an, da die weiteren Enzyme noch nicht synthetisiert sind. Der Induktor Allolactose wird erst mit Verzögerung gebildet. Nach der Induktion der

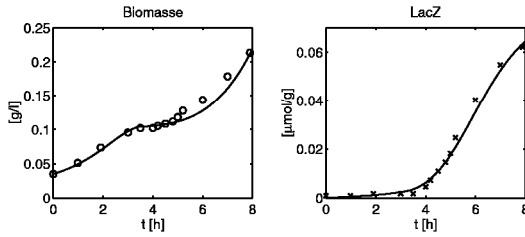


Figure 7.1: Zeitlicher Verlauf der Simulationsergebnisse und der experimentellen Daten von Biomasse und *LacZ* beim Referenzstamm.

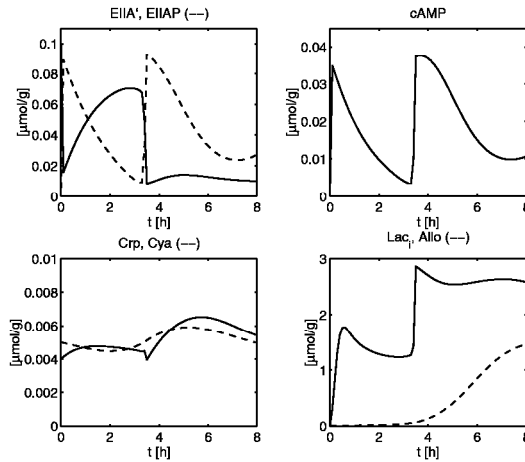


Figure 7.2: Zeitlicher Verlauf von *EIIA'*, *cAMP*, *Crp*, *Cya*, *Lac_i* und Allolactose.

Lactose Enzyme steigt intrazelluläre Lactose weiter an, bis ein zweites Plateau erreicht ist.

7.1.1 Zugabe des Induktors IPTG ins Medium

In einem weiteren Experiment ist im Medium der Stoff IPTG zugegeben worden, der einen ähnlichen molekularen Aufbau wie Allolactose besitzt, aber von der Zelle stets aufgenommen wird. IPTG wirkt intrazellulär als Induktor und kann die Expression der Gene auslösen. Zu Beginn des Experiments sind die Zellen schon induziert, so dass beide Substrate gleichzeitig aufgenommen werden. Durch

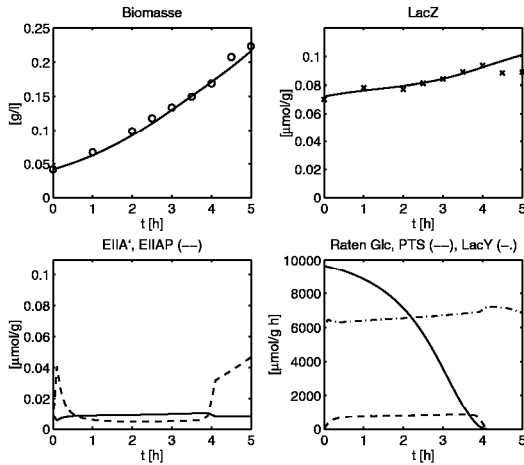


Figure 7.3: Zeitlicher Verlauf der Simulationsergebnisse und der experimentellen Daten von Biomasse und *LacZ*; Simulation von *EIIA'* und der Aufnahmeraten über die einzelnen Systeme bei der Zugabe von externem IPTG.

die hohe Aufnahmerate von Lactose steht kaum freies *EIIA'* für das PTS zur Verfügung (Abbildung 7.3). Hier macht sich besonders deutlich der Effekt der Komplexierung bemerkbar.

7.2 Die *crp* Mutante

Bei dieser Stammvariante ist das *crp* Gen ausgeschaltet. Da der Einfluß auf die Expression der *lac*-Gene nur sehr schwach ist, zielt dieses Experiment auf die Synthese der Regulation des PTS ab. Abbildung 7.4 zeigt wiederum die Verläufe von Biomasse und *LacZ*. Der erste Meßpunkt der *LacZ*-Aktivität zeigt bereits einen sehr hohen Wert an, so dass davon ausgegangen werden muß, dass der Stamm bereits in einem Medium mit Lactose kultiviert wurde. Da bei dieser Ausgangssituation damit zu rechnen ist, dass das Enzym der Proteolyse unterliegt, ist ein zusätzlicher Stoffwandler zur Beschreibung des Abbaus in das Modell aufgenommen worden. Der Verlauf der Meßdaten für *LacZ* kann nicht optimal beschrieben

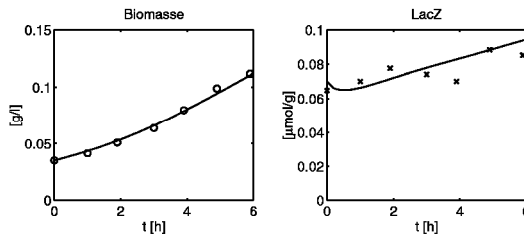


Figure 7.4: Zeitlicher Verlauf der Simulationsergebnisse und der experimentellen Daten von Biomasse und *LacZ* bei der *crp* Mutanten.

werden, da zu vermuten ist, dass die Messungen in diesem Experiment nicht ganz konsistent sind. Die Simulationsrechnung gibt die Tendenz richtig wieder. Das Transportprotein *EIICB* kann nicht synthetisiert werden, da *cAMP.Crp* als Verstärkungsfaktor fehlt. Durch den Ausfall des PTS wird keine Diauxie mehr beobachtet. Der Verlauf von *EIIA*, *cAMP*, *Crp*, *Cya*, interner Lactose und Allolactose ist in Abbildung 7.5 zu sehen. Protein *EIICB* befindet sich zu etwas mehr als 50% in phosphoryliertem Zustand, was zur *cAMP* Synthese führt. Der Verlauf von *Cya* ist nahezu konstant. Durch den hohen Induktionszustand liegt auch Allolactose nach kurzer Zeit in hoher Konzentration in der Zelle vor.

7.3 Die *crp* Mutante mit dem Plasmid pth111

Um zu überprüfen, ob der Einfluß des PTS tatsächlich so signifikant ist, wurde das entsprechende Gen *ptsG* für den Glucosetransporter *EIICB* auf einem Plasmid in den Organismus gebracht. Die Expression erfolgt konstitutiv, da die

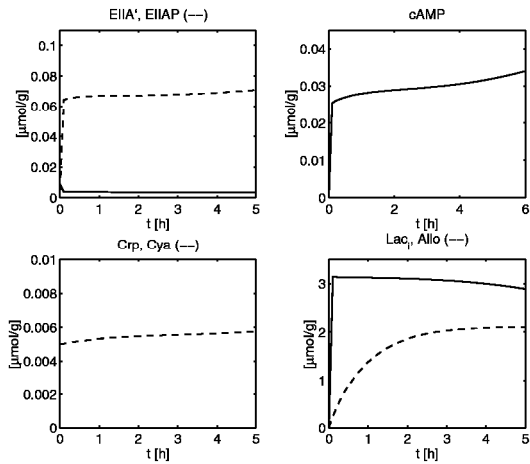


Figure 7.5: Zeitlicher Verlauf von *EIIA'*, *cAMP*, *Crp*, *Cya*, *Lac_i* und Allolactose bei der *crp* Mutanten.

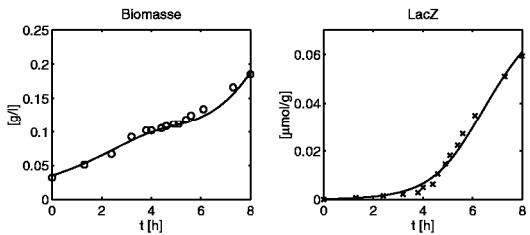


Figure 7.6: Zeitlicher Verlauf der Simulationsergebnisse und der experimentellen Daten von Biomasse und *LacZ* bei der *crp* Mutanten mit dem Gen *ptsG* auf Plasmid.

Kontrollsequenz nur einen unregulierten Promotor enthält. Abbildung 7.6 zeigt den Verlauf von Biomasse und *LacZ*. Es ist wiederum ein zweiphasiges Wachstum zu erkennen, was aber nicht so deutlich ausgeprägt ist. Die Glucoseaufnahme über das PTS ist bei diesem Stamm geringer. Infolge dessen ist der *cAMP* Spiegel relativ hoch. Da aber die Expression der *lac* Gene nur schwach von diesem Wert abhängt, ist in der ersten Phase keine Synthese zu erkennen. Der Wert von *EIIA'* reicht aus, die Aufnahme von Lactose zu hemmen. Erst nach Verbrauch der Lactose kommt es zu Synthese der *lac* Proteine (Abbildung 7.7).

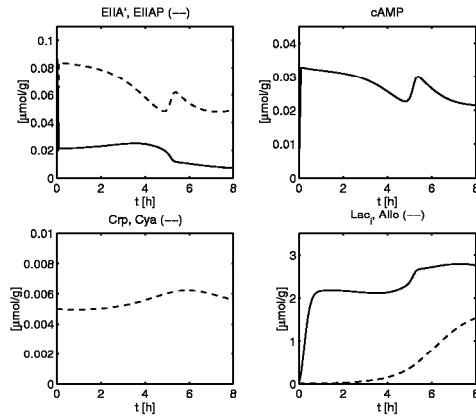


Figure 7.7: Zeitlicher Verlauf von *EIIA'*, *cAMP*, *Crp*, *Cya*, interner Lactose und Allolactose bei der *crp* Mutante mit dem Plasmid pth111 für *ptsG*.

7.4 Weitere Stammkonstruktionen

Für zwei weitere Stammkonstrukte sollen der Vergleich zwischen Simulation und Experiment gezeigt und die wesentlichen Eigenschaften kurz diskutiert werden.

7.4.1 Expression von *LacY*

Der Stamm mit konstitutiver Expression des Lactose Aufnahmesystems (Abbildung 7.8) zeigt ein ähnliches Verhalten wie die Zugabe von IPTG ins Medium (siehe oben). Beide Zucker werden gleichzeitig aufgenommen. Durch die Komplexierung erfolgt kaum Transport über das PTS.

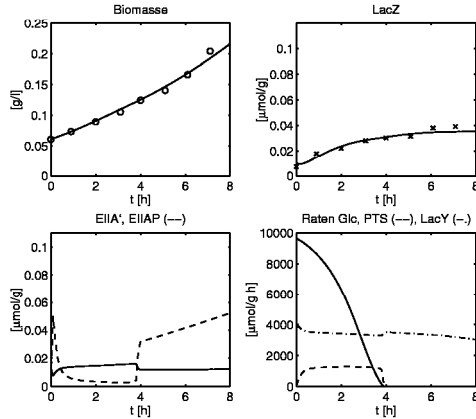


Figure 7.8: Zeitlicher Verlauf der Simulationsergebnisse und der experimentellen Daten von Biomasse und *LacZ*; Simulation von *EIIA'* und der Aufnahmezeiten über die einzelnen Systeme bei der Überexpression von *LacY*.

7.4.2 Die *crp* Mutante mit dem Plasmid *pha7*

Auf dem Plasmid *pha7* ist das *crp* Gen kodiert. Damit ist der Ausgangsstamm fast rekonstruiert (Abbildung 7.9). Die Expression erfolgt auch hier konstitutiv durch die Verwendung eines anderen Promotors in der Kontrollsequenz. Damit entfällt die Autoregulation der Synthese von *Crp*. Das Verhalten des Stammes entspricht dem des Ausgangsstammes.

7.5 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt erfolgte eine semi-quantitative Validierung des in Kapitel 6 erstellten Modells. Dazu haben experimentelle Daten aus der Literatur Verwendung gefunden. Ein Referenzstamm wurde genetisch verändert und das Experiment mit den gleichen Ausgangsbedingungen wiederholt. Bei einem Experiment sind die Umweltbedingungen durch Zugabe eines Analogons geändert worden. Tabelle 7.1 faßt die Stämme und die wesentlichen Verhaltenseigenschaften zusammen. Die Parameter für die Simulationsrechnungen sind in Anhang C zusammengestellt.

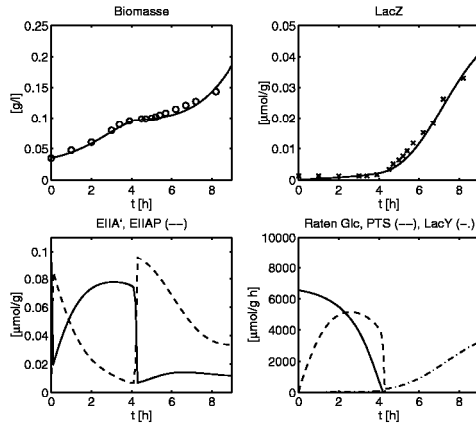


Figure 7.9: Zeitlicher Verlauf der Simulationsergebnisse und der experimentellen Daten von Biomasse und *LacZ*; Simulation von *EIIA'* und der Aufnahmeraten über die einzelnen Systeme bei der *crp* Mutanten mit dem Plasmid *pha7*.

Tabelle 7.1: Zusammenstellung der untersuchten Stammvarianten unter Angabe der Kohlenhydratquellen und Erläuterungen zu beobachteten Effekten.

Stamm	Medium	Diauxie	
L8UV5	Glc,Lac	ja	
	Glc, Lac, IPTG	nein	Induktion von außen
L8UV5 <i>crp</i>	Glc,Lac	nein	keine Expression des PTS Transporters
L8UV5 <i>crp</i> + <i>pth111</i>	Glc,Lac	ja	konst. Expression des PTS Transporters
L8UV5 <i>lacY</i> ⁺	Glc,Lac	nein	Komplexierung <i>EIIA'</i> mit <i>LacY</i> verhindert Induktor Ausschluß
L8UV5 <i>crp</i> + <i>pha7</i>	Glc,Lac	ja	konst. Expression <i>Crp</i>

Kapitel 8

Schlußbemerkung

Aus zwei Gründen ist es angebracht, am Ende dieser Arbeit einen Blick über das Fachgebiet hinaus zu machen: (i.) Die Biotechnologie rückt immer mehr ins Zentrum des öffentlichen Interesses. Die Möglichkeiten der Veränderung des genetischen Codes beschäftigt nicht nur Wissenschaftler, Ethiker, Theologen und Philosophen sondern auch die breite Öffentlichkeit. Heute kann festgestellt werden, dass neben rein wissenschaftlichen Fragestellungen zunehmend mehr wirtschaftliche und ethische Aspekte die Diskussionen beherrschen, sei es durch veränderte Lebensmittel wie Tomaten, Soja und Mais oder aber auch durch die Einsatzmöglichkeiten in der Medizin. Die vorliegende Arbeit ist auf die Quantifizierung von Stoffwechselvorgängen ausgerichtet, auch von gentechnisch veränderten Lebewesen. Für den Wissenschaftler gibt es kaum Anhaltspunkte, was er aus ethischer Sicht zu tun und zu lassen hat: zu verzwickt scheinen heute die Folgen wissenschaftlichen Handelns. Hans Jonas (Das Prinzip Verantwortung, Suhrkamp TB, 1984) hat sich mit ethischen Aspekten technischer Entwicklungen beschäftigt und stellt das Prinzip Verantwortung in den Mittelpunkt seines Denkens. Waren die Handlungsmaximen früher auf Zeitgenossen und auf einen engen räumlichen Horizont beschränkt, so macht die moderne Technik es notwendig, Maximen, die neue Größenordnungen umfassen, festzulegen: *Handle so, dass die Wirkungen deiner Handlung verträglich sind mit der Permanenz echten menschlichen Lebens auf Erden.* Diese Maxime macht deutlich, dass dem Erwerb wissenschaftlicher Erkenntnisse eine zunehmend größere Bedeutung zukommt, denn nur durch handfestes Wissen über ein zu untersuchendes System ist ein Wissenschaftler in der Lage, mögliche Folgen seines Handelns abzuschätzen. Insbesondere in der modernen (molekularen) Biotechnologie sind die Konstruktion und der Einsatz von gentechnisch veränderten Organismen gerade deshalb so umstritten, weil die Folgen noch nicht abgesichert sind. Vielleicht kann langfristig betrachtet auch hier der Einsatz von mathematischen Modellen zu einem verbesserten Verständnis der Zusammenhänge beitragen.

(ii.) Die Arbeit beschäftigt sich mit Leben und zwar mit der Minimalform: dem Einzeller. Viele Gedankengebäude in alter und neuer Philosophie sind der Frage "Was ist Leben?" nachgegangen, die auch heute im Mittelpunkt der Auseinandersetzungen zwischen Geistes- und Naturwissenschaften steht. Aus neueren Publikationen wird klar, dass das Verständnis von "Woher kommen wir?" und "Wohin gehen wir?" in all seinen Facetten ohne die Entdeckungen der modernen Biologie nicht zu beantworten ist. Die Theorie des Neurobiologen und Erkenntnistheoretikers Humberto Maturana (Was ist Erkennen?, Piper, 1994) läßt sich bspw. auf folgende Kurzformel bringen: *Leben ist Erkennen*. Maturana ist der Begründer des radikalen Konstruktivismus. Diese Denkrichtung sagt, dass es keine objektive Wahrheit in unserer Welt gibt, sondern, dass wir als Beobachter der Welt die Wirklichkeit immer nur subjektiv wahrnehmen können. Interessanterweise läßt sich diese Denkrichtung auch auf frühe Arbeiten aus den Gebieten der Kybernetik und der Systemtheorie zurückführen, wobei der Begriff des Systems eine zentrale Rolle spielt. Bei Maturana wird das untersuchte Objekt – die einzelne Zelle oder der Mensch – als System aufgefaßt, welches durch eine Grenze von der Umwelt abgetrennt ist. Das System versucht nun, Änderungen der Umwelt so auszugleichen, dass sich ein stabiler Gleichgewichtszustand einstellt (Homöostase). Übertragen auf erkenntnistheoretische Aspekte bedeutet dies, dass das biologische System die Umwelt bezogen auf die Störung konstruiert. Damit kommt der Wahrnehmung der Umwelt bzw. dem Erkennen eine wesentliche Bedeutung im Verständnis des Phänomens Leben zu. Maturana hat neben philosophischen Aspekten auch Folgen für die Gesellschaft und Politik untersucht und kommt zum Schluß, dass der Umgang mit seinen Mitmenschen und der Natur auf einer kooperativen und toleranten Basis erfolgen muß. Paul Watzlawick (Die Unsicherheit unserer Wirklichkeit, Piper, 1995) schreibt hierzu: " Aus der Idee des Konstruktivismus ergeben sich zwei Konsequenzen. Erstens die Toleranz für die Wirklichkeiten anderer - denn dann haben die Wirklichkeiten anderer genausoviel Berechtigung als meine eigene. Zweitens ein Gefühl der absoluten Verantwortlichkeit. Denn wenn ich glaube, daß ich meine eigene Wirklichkeit herstelle, bin ich für diese Wirklichkeit verantwortlich, kann ich sie nicht jemandem anderen in die Schuhe schieben." Damit läßt sich eine Brücke zu Hans Jonas schlagen, der in seinen Arbeiten die Bedeutung der Verantwortung jedes Einzelnen für sein Tun und Handeln herausgearbeitet hat.

Kapitel 9

Zusammenfassung

Das Verständnis des Wachstums- und Produktbildungsverhaltens von Mikroorganismen setzt detailliertes molekularbiologisches Wissen voraus. Um aber das Potential von biologischen Systemen auch nutzen zu können, z.B. um gezielt genetische Veränderungen zur Herstellung relevanter biotechnologischer Produkte durchführen zu können, reichen qualitative Betrachtungen nicht mehr aus. Ein möglicher Zugang zu einer quantitativen Beschreibung ist die Erstellung von mathematischen Modellen.

Diese Arbeit stellt eine Modellierungssystematik vor, die es erlaubt, mathematische Modelle durch Auswahl, Parametrierung und Verschaltung von Modellbausteinen zu erstellen. Um eine möglichst hohe biologische Transparenz zu erhalten, sind die Modellbausteine so definiert, dass sie sich eng an zellulären Strukturen orientieren. Die Modellbausteine haben definierte Ein- und Ausgänge und erlauben es, ausgehend von Grundbausteinen (elementare Modellbausteine) komplexe Modelle durch Aggregation zu bilden. Eine quantitative Modellanalyse wird durch Zuordnung von mathematischen Gleichungen zu den Modellbausteinen ermöglicht. Elementare Modellbausteine sind Speicherelemente, Stoffwandler und Signalwandler. Der modulare Charakter des Modellierungskonzeptes wird in besonderem Maße durch aggregierte Modellbausteine, die hier als Funktionseinheiten bezeichnet werden, deutlich. Die Aggregation von Modellbausteinen und damit ihre Abgrenzung gegenüber ihrer Umgebung erfolgt anhand biologischer Kriterien. Das wichtigste und aussagekräftigste Kriterium betrachtet dabei den Austausch von Information zwischen der Funktionseinheit und seiner Umgebung. Ist dieser Informationsfluß im Vergleich zu Vorgängen in der Funktionseinheit sehr gering, so stellen die zusammengefaßten Elemente eine Einheit mit begrenzter Autonomie dar. Besondere Kennzeichen dieser Einheiten sind (i) hierarchische Strukturen und (ii) die Verarbeitung von Signalen durch lokale bzw. globale Signaltransduktionselemente. Um dem Anspruch gerecht zu werden, ganzheitliche Modelle zu erstellen, d. h. Modelle, die das ganze biochemische Reaktionsnetzwerk

umfassen, erlaubt das Modellierungskonzept die Beschreibung von Funktionseinheiten mit unterschiedlicher Komplexität, d. h. die Funktionseinheiten werden hinsichtlich ihrer Struktur und ihrem Verhalten je nach vorhandenem Wissen und Anwendung des Modells beschrieben.

Ein zentraler Punkt dieser Arbeit ist ein Verfahren zur Modellreduktion unter Ausnutzung hierarchischer Strukturen in der Zelle. Dies ist für die Initiation der Transkription bei einem Bakterium gezeigt. Bei dem untersuchten Fall sind mehrere Proteine als "Mitspieler" beteiligt. Das Prinzip, nach dem die Hierarchie geordnet wird, ist in der Biologie ein altbekanntes: ausgehend von Vorgängen, die die ganze Zelle betreffen – das Allgemeine – hinunter bis zum einzelnen Stoffwechselweg – das Spezielle. Demnach steht auf der obersten Stufe der Hierarchie ein für das Ablesen aller Gene notwendiges Protein, die RNA-Polymerase, auf der untersten Stufe ein Protein, welches spezifisch für die Induktion oder die Repression eines einzelnen Stoffwechselweges verantwortlich ist. Ausgehend von der obersten Ebene erfolgt die Ermittlung der Signale zur Berechnung der Syntheserate. Das Signal der obersten Ebene wird dabei durch die Eingangssignale der folgenden Ebenen modifiziert, bis in der untersten Ebene das endgültige Signal berechnet wird.

Das vorgestellte Modellierungskonzept ist auch Grundlage für ein rechnergestütztes Modellierungswerkzeug, welches den Benutzer bei der Erstellung der mathematischen Gleichungen unterstützen soll. Es steht das objekt-orientierte Programmpaket *CELLMOD* zur Verfügung, welches auf der Programmiersprache C++ beruht. In diesem Modellierungswerkzeug sind elementare und aggregierte Modellbausteine implementiert, die in einer Textdatei oder (mit geringerer Funktionalität) auf einer graphischen Bedienoberfläche ausgewählt, parametrisiert und verschaltet werden können.

In der vorliegenden Arbeit wird exemplarisch gezeigt, dass die Anwendung des vorgestellten Modellierungskonzeptes zu einem aussagekräftigen mathematischen Modell führt. Das untersuchte Phänomen der "Kataboliten Repression" beschreibt die Unterdrückung der Synthese von Stoffwechselwegen in Anwesenheit einer dominanten Nährstoffquelle. Als Beispiel hierfür ist das Wachstum des Modellorganismus *Escherichia coli* auf den Kohlenstoffquellen Glucose und Lactose untersucht worden. In Anwesenheit von Glucose wird die Synthese der Lactose aufnehmenden und abbauenden Enzyme reprimiert. Der Lactose- und der Glucosestoffwechsel sind Elemente einer höher strukturierten Funktionseinheit - des *crp* Moduls. Diese Funktionseinheit zeigt beispielhaft wie die oben genannten Eigenschaften hierarchischer Aufbau und Signaltransduktionseinheiten in Beziehung stehen. Ausgehend von einem Grundmodell sind Aspekte aktueller biologischer Arbeiten als Hypothesen formuliert und in Simulationsstudien überprüft worden. Dabei zeigt sich, dass die definierten elementaren und aggregierten Modellbausteine eine tragfähige Basis zur Beschreibung des komplexen Wachstumsmusters

des Organismus darstellen. Eine semi-quantitative Validierung des Modells erfolgt durch die Nachbildung von Mutanten, die in der Literatur beschrieben sind und für die zwar wenige, aber aussagekräftige Meßgrößen zur Verfügung stehen. Es ist ein Satz an Parametern ermittelt worden, der das Wachstumsverhalten der vorgestellten Stämme sehr gut wiedergibt.

Summary

The understanding of the growth and production behaviour of microorganisms requires a detailed knowledge in microbiology and genetics. To use the high potential of biological systems, e.g. in biotechnology, the knowledge has to be structured and collected in an apparent form. This will be a basis for setting up mathematical models.

The thesis starts with a presentation of the research field, followed by an introduction in the modeling concept. In the thesis, a systematic approach to develop a detailed metabolic model is introduced. The approach is based on the definition of modeling objects (submodels) with defined in- and outputs. To guarantee a high biological transparency the modeling objects can be assigned directly to cellular units, e.g. a single enzymatic reaction step or e.g. complete pathways for transport and degradation of carbohydrates. Elementary modeling objects represent modeling objects with the highest resolution, i.e. substance storages, substance transformers and signal transformers. Substance storages represent metabolites, substance transformers stand for enzymatic reaction steps or polymerization steps while signal transformers describe processes of signal transduction and processing. A mathematical description is realized by assigning equations to the modeling objects. The following chapter describes the aggregation of elementary modeling objects to 'functional units', i.e. units with higher complexity. Three criteria are given to demarcate functional units. The most important one describes the organization according signal transduction and processing. Special characteristics of functional units are (i) a hierarchical structure and (ii) signal processing in local as well as global signal transduction elements.

An important point discussed in the chapter is signal processing in hierarchical structured units. For the initiation of transcription, in general, activators or inhibitors interact with the RNA polymerase to modify the initiation frequency. However, the influence of these effectors is limited to a small number of binding sites, e.g. the lactose repressor LacI has only one binding site on the whole *E. coli* genome. Hence, the repressor will clearly influence the initiation frequency of the *lac* operon, but it will not influence the overall distribution of the RNA polymerase inside the cell. This fact is used in a new method to describe signal processing. Every protein involved in transcription of a gene is assigned to one

level in hierarchy. Signals are transduced from top level to the lower level, but not vice versa.

A computer tool is necessary to set up models with a large number of equations. The software package CELLMOD is based on C++ and supports the modeler by generating the required equations automatically. A number of elementary and aggregated modeling objects are implemented. Central in this tool is a model library for enzyme catalysed reactions, including about 42 entries, starting from a simple Michaels-Menten equation up to complex models for 4 reaction partners.

The modeling concept is applied to carbohydrate uptake in *Escherichia coli*. The phenomenon of “glucose catabolite repression” means the repression of uptake of carbon sources if glucose is present in the medium. Only if glucose has run out, transport systems of other available carbohydrates are synthesised. This is due to a complex signal transduction pathway starting from the main glucose uptake system. The mathematical model developed in this thesis describes the main glucose uptake system and further elements in the signaltransduction pathway. They represent the highest level of control in a functional unit called *crp* modulation, named after the final target of the signal transduction pathway, the protein Crp. Besides the description of the signal transduction pathway, the metabolic pathways for lactose uptake and degradation and for the glycolysis are also included in the model. Finally the simulation results are compared to data published in the literature. The comparison of simulation results and experimental data of a wild type strain and of strains which are genetically modified are in good agreement.

Anhang A

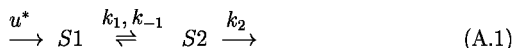
Modellreduktionsverfahren für Reaktionssysteme: Quasistationarität – Schnelles Gleichgewicht

In der Literatur werden einige Verfahren vorgestellt, die eine vereinfachte mathematische Beschreibung von Reaktionssystemen erlauben. Okino und Mavrouniotis [57] geben in einer Übersicht die Gebiete “Lumping”, Sensitivitätsanalyse und Analyse der Zeithierarchien an. Beim “Lumping” wird die Anzahl der Zustandsgrößen durch Zusammenfassen in eine neue Zustandsgröße reduziert. Bei der Sensitivitätsanalyse werden solche Zustandsgrößen eliminiert, die keinen oder nur einen geringen Einfluß auf das Verhalten des Systems haben. Bei der Analyse der Zeithierarchien interessiert nur das Verhalten in einem bestimmten, vorgegebenen Zeitfenster. Vorgänge, die schneller ablaufen, werden dann als eingeschungen betrachtet und mit algebraischen Gleichungen beschrieben. Um die Verfahren der Zentrumsmannigfaltigkeit oder der Singulären Störungsrechnung anwenden zu können, müssen die Systemgleichungen eine bestimmte Form besitzen. Verfahren wie das “Balancing” und die “Minimum simplification” sind in [70] beschrieben.

Am häufigsten werden jedoch die Schlagworte “Quasistationarität” und “Schnelles Gleichgewicht” verwendet, wenn zur Berechnung von reaktionskinetischen Gleichungen Modellvereinfachungen getroffen werden müssen. In diesem Anhang wird gezeigt, wie für lineare Systeme beide Modellreduktionstechniken im Rahmen der Modalanalyse behandelt werden können. In einer Arbeit von Fraser wird eine geometrische Interpretation der Verfahren gezeigt [14]. Schuster und Schuster stellen die beiden Verfahren gegenüber [67].

A.1 Beispielsystem

Am Beispiel des folgenden Reaktionsmechanismus sollen auch die wesentlichen Schritte, wie man zu vereinfachten Modellen kommt, vorgestellt werden. Als Beispielsystem wird folgender Reaktionsmechanismus angenommen.



Die Bilanzgleichungen ergeben sich zu

$$\dot{S}_1 = -k_1 S_1 + k_{-1} S_2 + u^* \quad (\text{A.2})$$

$$\dot{S}_2 = k_1 S_1 - (k_{-1} + k_2) S_2 \quad (\text{A.3})$$

Zur Ermittlung der Kenngrößen des Systems bietet es sich an, das Gleichungssystem zu normieren. Es ergibt sich mit der neuen Zeit $\tau = k_1 t$ (die Ableitung nach der neuen Zeit ist mit einem Apostroph gekennzeichnet)

$$S'_1 = -S_1 + K_1 S_2 + u \quad (\text{A.4})$$

$$S'_2 = S_1 - (K_1 + Ac) S_2 \quad \text{mit} \quad (\text{A.5})$$

$$K_1 = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad Ac = \frac{k_2}{k_1} \quad (\text{A.6})$$

Die stationären Zustände des Systems lauten

$$S_1^{SS} = \frac{K_1 + Ac}{Ac} u \quad S_2^{SS} = \frac{u}{Ac} \quad (\text{A.7})$$

Die Anwendung des Verfahrens der Modalanalyse erfordert die Berechnung der Jacobi Matrix J und der Modalmatrix M . Damit ist eine Transformation des Systems x_{alt} in neue Koordinaten x_{neu} möglich. Für das lineare Beispielsystem läßt sich die Jacobi Matrix direkt aus den Gleichungen anschreiben.

$$J = \begin{bmatrix} -1 & K_1 \\ 1 & -K_1 - Ac \end{bmatrix}; \quad (\text{A.8})$$

die Eigenwerte ergeben sich zu

$$\lambda_1 = \frac{-K_1 - Ac - 1 - \sqrt{1 + 2(K_1 - Ac) + (K_1 + Ac)^2}}{2} \quad (\text{A.9})$$

$$\lambda_2 = \frac{-K_1 - Ac - 1 + \sqrt{1 + 2(K_1 - Ac) + (K_1 + Ac)^2}}{2}. \quad (\text{A.10})$$

Mit dem Ansatz

$$x_{alt} = M x_{neu} \quad (\text{A.11})$$

lautet das System in neuen Koordinaten

$$\dot{x}_{neu} = M^{-1} J M + M^{-1} b u = \Lambda x_{neu} + M^{-1} b u, \quad (\text{A.12})$$

mit der Diagonalmatrix Λ , die die Eigenwerte enthält und dem Vektor $b^T = [1 \ 0]$. Für das Beispiel ergibt sich die Modalmatrix M^{-1} zu

$$M^{-1} = \frac{1}{\sqrt{4K_1 + (K_1 + Ac - 1)^2}} \quad (\text{A.13})$$

$$\begin{bmatrix} -1 & \frac{1}{2} (K_1 + Ac - 1 + \sqrt{4K_1 + (K_1 + Ac - 1)^2}) \\ 1 & \frac{1}{2} (1 - K_1 - Ac + \sqrt{4K_1 + (K_1 + Ac - 1)^2}) \end{bmatrix}. \quad (\text{A.14})$$

A.2 Modellreduktion

Der Begriff quasi stationäres Verhalten wird verwendet, wenn die Zeitkonstante τ_i eines Modes viel kleiner als die Zeitkonstanten der anderen Moden ist.

$$\tau_i < \tau_j \quad (\text{A.15})$$

Der Begriff “viel kleiner” ist in der Literatur nicht präzise definiert. Als Erfahrungswert dient folgende Faustformel $\tau_i \approx \frac{\tau_j}{100}$.

Die Modellvereinfachung besteht nun darin, die Dynamik dieses schnellen Zustandes zu vernachlässigen und die zeitliche Änderung der Zustandsgröße zu Null zu setzen. Im folgenden sollen zwei Sonderfälle betrachtet werden.

Fall 1: $K_1 \rightarrow 0$

$$\text{a. } Ac \ll 1 \quad k_1 \gg k_2$$

Die Eigenwerte ergeben sich in diesem Fall zu

$$\lambda_1 = -1 \quad \rightarrow \quad \tau_1 = 1 \quad \text{schnell} \quad (\text{A.16})$$

$$\lambda_2 = -Ac \quad \rightarrow \quad \tau_2 = \frac{1}{Ac} \quad \text{langsam} \quad (\text{A.17})$$

Der erste Mode ist schnell; seine zeitliche Ableitung wird zu Null gesetzt.

Nach der Umrechnung in die alten Zustände ergibt sich für S_1 eine algebraische Gleichung und für S_2 eine Differentialgleichung. Die Ordnung des Systems ist um 1 reduziert. Für die alten Zustände ergibt sich

$$S_1^{ss} = u \quad (\text{A.18})$$

$$S_2' = S_1^{ss} - Ac S_2 \quad (\text{A.19})$$

$$\text{b. } Ac \gg 1 \quad k_1 \ll k_2$$

Die Eigenwerte ergeben sich hier zu

$$\lambda_1 = -Ac \quad \longrightarrow \quad \tau_1 = \frac{1}{Ac} \quad \text{schnell} \quad (\text{A.20})$$

$$\lambda_2 = -1 \quad \longrightarrow \quad \tau_2 = 1 \quad \text{langsam} \quad (\text{A.21})$$

In diesem Fall ergibt sich nach Umrechnung in die alten Koordinaten eine algebraische Gleichung für S_2 und eine Differentialgleichung für S_1 .

$$S_1' = u - S_1 \quad (\text{A.22})$$

$$S_2^{ss} = \frac{S_1}{Ac} \quad (\text{A.23})$$

Fall 2: $Ac \longrightarrow 0$

Die Eigenwerte ergeben sich zu

$$\lambda_1 = -1 - K_1 \quad (\text{A.24})$$

$$\lambda_2 = 0 \quad (\text{A.25})$$

Das Verschwinden eines Eigenwertes deutet hier direkt auf eine Abhängigkeit der Zustandsgrößen hin.

Die Modalmatrix ergibt sich hier

$$M^{-1} = \begin{bmatrix} -1 & K_1 \\ 1 & 1 \end{bmatrix} \quad (\text{A.26})$$

Der neue Zustand $m_1 = -S_1 + K_1 S_2$ weist große Ähnlichkeit mit einer Gleichung auf, die gilt, wenn sich ein Gleichgewicht zwischen S_1 und S_2 eingestellt hat. Dann

gilt $0 = -S_1 + K_1 S_2$. Der erste Mode repräsentiert demnach das Einschwingen des Systems auf einen Zustand, der dem Zustand im Gleichgewicht entspricht.

Zur Behandlung von Reaktionssystemen, in denen neben Reaktionen, die sehr schnell ablaufen, auch Reaktionen, die langsam ablaufen, vorkommen, hat Cha [7] eine Methode vorgestellt. Die Reaktanden, die im Gleichgewicht angenommen werden, werden zu einer neuen Zustandsgröße $Q = S_1 + S_2$ zusammengefaßt. In der Modalmatrix entspricht diese Vorgehensweise dem zweiten Mode $m_2 = S_1 + S_2$.

$$\begin{matrix} u^* \\ \rightarrow \end{matrix} Q \xrightarrow{k_2 f_{S2}} \quad \text{mit} \quad f_{S2} = \frac{S_2}{Q} \quad (\text{A.27})$$

Es ergeben sich folgende Gleichungen für Q

$$Q = S_1 + S_2 \quad (\text{A.28})$$

$$Q' = u - \frac{Ac}{1 + K_1} Q \quad (\text{A.29})$$

Für S_1 und S_2 erhält man

$$S_1 = f_{S1} Q = \frac{K_1}{1 + K_1} Q \quad (\text{A.30})$$

$$S_2 = f_{S2} Q = \frac{1}{K_1 + 1} Q. \quad (\text{A.31})$$

Das Verfahren der Modalanalyse zeigt, dass die Annahme eines “schnellen Gleichgewichts” ein Sonderfall der Annahme von Quasistationarität ist. In diesem Fall existiert ein direkter algebraischer Zusammenhang zwischen den Zustandsgrößen, was einen verschwindenden Eigenwert zur Folge hat. Wie oben gezeigt, gibt es einen Zusammenhang zwischen der Modalmatrix M^{-1} und der Methode von Cha. Dies wurde bereits von Palsson und Lightfoot beobachtet [60], die das Phänomen jedoch nicht weiter verfolgten. Für komplexe Reaktionssysteme besteht die Schwierigkeit in der Ermittlung derjenigen Kenngrößen, die die Anwendung einer der beiden vorgeschlagenen Wege rechtfertigen. Für die Ableitung der kinetischen Gleichungen für die Stoffwandler und zur Beschreibung der Wechselwirkungen von Proteinen und DNA ist stets die Annahme eines schnellen Gleichgewichts gemacht.

Anhang B

Das Verfahren der stationären Stoffflußanalyse

Ziel des Verfahrens ist die Berechnung von Stoffflußverteilungen durch ein gegebenes Reaktionsnetzwerk mit Hilfe von Messungen der Aufnahme- und Produktionsraten extrazellulärer Stoffe im stationären Zustand. Kinetische Daten werden für dieses Verfahren nicht benötigt. Die Zusammenstellung der theoretischen Grundlagen basiert auf dem Buch von Nielsen und Villadsen [55]. Erste Arbeiten, die sich mit der Berechnung von stationären Raten bei chemischen Reaktoren beschäftigen, gehen auf Madron et al. [43] zurück. Eine wegweisende Arbeit für die Berechnung der Stoffflußverteilung bei *Escherichia coli* findet sich bei Holms [21].

Eine alternative Vorgehensweise zur Berechnung von Stoffflüssen stammt von Varma und Palsson [81, 82]. Sie legen der Berechnung der Stoffflüsse ein Optimalitätskriterium zu Grunde. So konnte gezeigt werden, dass mit der Maximierung der Wachstumsrate auch quantitative Aussagen gemacht werden können, die gut mit experimentellen Ergebnissen übereinstimmen [83]. Das Verfahren wurde auch zur Berechnung von Flußverteilungen herangezogen, um optimale Produktausbeuten, bspw. an Aminosäuren zu erhalten [80].

B.1 Theoretische Grundlagen

Im folgenden soll ein Netzwerk mit j katabolen Reaktionen (Ratenvektor $\hat{r}$), n_x intrazellulären Metaboliten (Vektor x) und n_i Substraten/Produkten betrachtet werden. Mit der stöchiometrischen Matrix $\hat{\Gamma}$ zur Beschreibung der Reaktionsgleichungen gilt

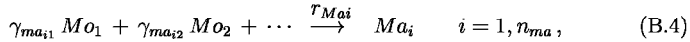
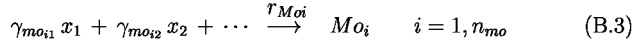
$$\hat{\Gamma} x = 0 \tag{B.1}$$

Die Bilanzgleichung für einen einzelnen Stoffspeicher c_{xi} aus Kapitel 3 kann folgendermaßen angeschrieben werden

$$\dot{c}_{xi} = \sum_j^j \gamma_{ji} \hat{r}_j - \mu c_{xi} . \quad (\text{B.2})$$

Matrix $\hat{\Gamma}$ ist noch um die Abflüsse der Precursor x in die Monomersynthese zu ergänzen. Dabei muß die Zusammensetzung der Makromoleküle Ma an Monomeren Mo sowie letztendlich die Zusammensetzung der Biomasse an Makromolekülen bekannt sein. Das Modell umfasse n_{mo} Monomere und n_{ma} Makromoleküle.

Für die Bildung eines einzelnen Monomers Mo_i und eines Makromoleküls Ma_i gelten folgende Reaktionsgleichungen



wobei angenommen wird, dass Makromoleküle nicht aktiv abgebaut, sondern nur durch Wachstum verdünnt werden. Monomere sind in einigen Fällen für die Synthese anderer Monomere notwendig. Dies ist in der ersten Gleichung bereits berücksichtigt, indem auf der linken Seite der Reaktion nicht die Monomere, sondern gleich die entsprechenden Precursor auftauchen. Die Elemente γ_{mo} werden in der Matrix Γ_{mo} , die Elemente γ_{ma} in der Matrix Γ_{ma} zusammengefaßt.

Die stationäre Syntheserate r_{Ma} ergibt sich mit der Konzentration an Makromolekülen c_{Ma} , der spezifischen Wachstumsrate μ und Gleichung (B.2) zu

$$r_{Ma} = \mu c_{Ma} , \quad (\text{B.5})$$

die stationäre Syntheserate r_{Mo} ergibt sich zu

$$r_{Mo} = \Gamma_{ma}^T r_{Ma} - \mu c_{Mo} ; \quad (\text{B.6})$$

auf Grund der hohen Flußraten kann der Verdünnungsterm hier aber vernachlässigt werden. Obige Gleichung wird mit Gleichung (B.5) zu

$$r_{Mo} = \Gamma_{ma}^T \mu c_{Ma} . \quad (\text{B.7})$$

vereinfacht.

Für die i intrazellulären katabolen Metabolite ergibt sich dann das Bilanzgleichungssystem zu

$$\dot{c} = \hat{\Gamma}^T \hat{r} - \Gamma_{mo}^T r_{Mo} - \mu c . \quad (\text{B.8})$$

Da der Verdünnungsterm hier auch vernachlässigt werden, kann ergibt sich für den stationären Fall mit Gleichung B.7 folgendes Gleichungssystem

$$0 = \hat{\Gamma}^T \hat{r} - \Gamma_{mo}^T \Gamma_{ma}^T \mu c_{Ma}. \quad (\text{B.9})$$

Erweitert man Matrix $\hat{\Gamma}$ um die entsprechenden stöchiometrischen Koeffizienten der Matrizen Γ_{mo} , Γ_{ma} und der Biomassenzusammensetzung c_{Ma} sowie den Ratenvektor $\hat{r}$ um die Rate μ , errechnet sich das Gleichungssystem mit der neuen Matrix Γ und dem neuen Ratenvektor r zu

$$0 = \Gamma^T r. \quad (\text{B.10})$$

Die stationäre Gleichung für die l extrazellulären Stoffe S ergibt sich mit der Durchflußrate D , dem Vektor der Zulaufkonzentrationen c_{SZ} , der Matrix Γ_S und der Biomassenkonzentration c_x zu

$$0 = D (c_{SZ} - c_S) + \Gamma_S^T r c_x \quad (\text{B.11})$$

Das gesamte Gleichungssystem hat folgende Struktur

$$0 = \underbrace{\begin{bmatrix} D \\ c_x \end{bmatrix} (c_{SZ} - c_S)}_{\underbrace{0}_{\tilde{q}}} + \underbrace{\begin{bmatrix} \Gamma_S^T \\ \Gamma^T \end{bmatrix}}_{\tilde{T}^T} r. \quad (\text{B.12})$$

Der Vektor q der Aufnahme- und Produktbildungsraten besitzt die Dimension $(n_l + n_x) \times 1$, Vektor r der intrazellulären Flüsse die Dimension $(j + 1) \times 1$ und Matrix T^T die Dimension $(n_l + n_x) \times (j + 1)$.

Für die Berechnung von unbekannten Flüssen ist folgende Aufteilung der Vektoren q , r und der Matrix T^T zweckmäßig:

$$q = \begin{bmatrix} q_m \\ q_c \\ q_o \end{bmatrix} \quad r = \begin{bmatrix} r_k \\ r_u \end{bmatrix} \quad T^T = \begin{bmatrix} T_1 & T_2 \\ T_3 & T_4 \\ T_5 & T_6 \end{bmatrix} \quad (\text{B.13})$$

q_m	gemessene extrazelluläre Metabolite (dim m)
q_c	nicht gemessene extrazelluläre Metabolite (dim c)
q_o	intrazelluläre Metabolite im 'steady state' (dim o)
r_k	bekannte intrazelluläre Raten (dim k)
r_u	unbekannte intrazelluläre Raten (dim u)

Folgende Fälle sollen betrachtet werden:

Fall I: $m - u + o = 0$

Mit den Matrizen A und B

$$A = \begin{bmatrix} T_2 & 0 \\ T_4 & -I \\ T_6 & 0 \end{bmatrix} \quad B = \begin{bmatrix} I & -T_1 \\ 0 & -T_3 \\ 0 & -T_5 \end{bmatrix}, \quad (\text{B.14})$$

und A quadratisch, $\det(A) \neq 0$ ergibt sich der Vektor der unbekannten intrazellulären Raten und der nicht gemessenen extrazellulären Raten zu

$$\begin{bmatrix} r_u \\ q_c \end{bmatrix} = A^{-1} B \begin{bmatrix} q_m \\ r_k \end{bmatrix} \quad (\text{B.15})$$

Fall II: $m - u + o > 0$

Hier ergibt sich ein überbestimmtes System und es besteht die Möglichkeit Meßfehler in das Verfahren zu integrieren. Mit dem Meßfehler δ ergibt sich die Messung zu

$$q_m = q_m + \delta \quad (\text{B.16})$$

Der Fehler sei normalverteilt und besitze die Kovarianzmatrix F . Das Residuum ϵ ergibt sich zu

$$\epsilon = B \begin{bmatrix} q_m \\ r_k \end{bmatrix} - A \begin{bmatrix} r_u \\ q_c \end{bmatrix} \quad (\text{B.17})$$

Die Lösung für das Optimierungsproblem $\min(\epsilon^T F^{-1} \epsilon)$ lautet:

$$\begin{bmatrix} \hat{r}_u \\ \hat{q}_c \end{bmatrix} = (A^{-1} F^{-1} A)^{-1} A^T F^{-1} B \begin{bmatrix} q_m \\ r_k \end{bmatrix} \quad (\text{B.18})$$

Der geschätzte Fehler $\hat{\delta}$ ergibt sich mit $\hat{q}_m = T_1 r_k + T_2 \hat{r}_{nk}$ zu

$$\hat{\delta} = q_m - \hat{q}_m \quad (\text{B.19})$$

Mit der Testfunktion h mit

$$h = \hat{\delta} F^{-1} \hat{\delta} \quad (\text{B.20})$$

läßt sich die Güte der Schätzung ermitteln. h ist χ^2 verteilt mit dem Freiheitsgrad $m - u + o$. Wenn für ein Konfidenzintervall $h > \chi^2$ gilt, dann ist die Schätzung als unbefriedigend zu betrachten.

B.2 Experimentelle Ergebnisse

Für einen exemplarisch ausgewählten Fermentationsprozess bei Wachstum auf Glucose unter aeroben Bedingungen sollen die Ergebnisse vorgestellt werden. Die Experimente wurden am Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik der Universität Stuttgart durchgeführt. Das Netzwerk umfaßt $j = 42$ Reaktionen, $n_x = 26$ intrazelluläre Metabolite, $l = 8$ Substrate/Produkte, $n_{mo} = 44$ Monomere und $n_{ma} = 7$ Makromoleküle. Die Anzahl der bekannten intrazellulären Raten beträgt $n_k = 8$. Dabei sind solche Raten, die nur bei anaeroben Bedingungen bzw. bei Wachstum auf anderen Zuckern relevant sind. Diese können für dieses Experiment zu Null gesetzt werden.

Tabelle B.1 faßt die Werte aus dem Experiment zusammen. Messungen der Ma-

Tabelle B.1: Zusammenstellung der Meßwerte der Makromoleküle, der Aufnahme- bzw. Produktbildungsraten sowie weiterer Versuchsdaten. ^ageschätzte Werte

Makromolekül	[g/gTM]	Aufnahme/Bildung	[mmol/gTM h]
Protein	0.610	Glucose Aufnahme	5.41
RNA	0.170	Ammonium Aufnahme	3.73
DNA	0.033	O ₂ Aufnahme	9.06
Lipid	0.084	CO ₂ Bildung	9.70
Glycogen ^a	0.033	Lactat Bildung	0.0
Peptidoglycan ^a	0.033	Formiat Bildung	0.0
Lipopolysach. ^a	0.033	Acetat Bildung	3.13
		Ethanol Bildung	0.0
weitere Daten			
Biomasse	0.61 [gTM/l]	Durchflußrate	0.3 [1/h]
Gasdurchsatz	60 [l/h]		

kromoleküle Glykogen, Peptidoglycan und Lipopolysacharrid liegen nicht vor und sind abgeschätzt. Die für die Berechnung der Flüsse benötigten Matrizen Γ , Γ_S , Γ_{mo} und Γ_{ma} sind der Arbeit von Sauter [68] entnommen. Abbildung B.1 zeigt die Flußverteilung für das ausgewählte Experiment.

Anhang C

Zusammenstellung der Modellparameter

C.1 Parameter des Modells in Kapitel 7

Zentraler Abbau

Pgi	$a_{r_{max}}$	4730.58	b_{aus} Flussverteilung berechnet
	K_S	0.49	Bindungskonst. Substrat/Produkt [69]
Pfk	r_{max}	4115.27	aus Flussverteilung berechnet
	K_S	0.03	Bindungskonst. Substrat [5]
	K_A	0.06	Bindungskonst. Aktivat. ADP [5]
	K_I	1.79	Bindungskonst. Inhib.PEP [5]
	N	4	Anzahl Zentren [5]
	L	4000000	Verhältnis R/T Konformationen [5]
Fda	r_{max}	5143.15	aus Flussverteilung berechnet
	K_{S1}	0.324	Bindungskonst. Substrat [2]
	K_{S2}	0.215	Bindungskonst. Produkt [2]

Z. A. (Forts.)

Gap	r_{max}	261967.21	aus Flussverteilung berechnet
	K_{S1}	4.8	Bindungskonst. Substrat (empirisch)
	K_{S2}	4.8	Bindungskonst. Produkt [28]
Eno	r_{max}	13373.99	aus Flussverteilung berechnet
	K_S	0.24	Bindungskonst. Substrat [72]
Pyk	r_{max}	12286.96	aus Flussverteilung berechnet
	K_S	0.20	Bindungskonst. Substrat [71]
	K_A	0.10	Bindungskonst. Aktivat. FDP [71]
Fluß Biosyn.	$k_{B_{Glc6P}}$	27.03	aus Flussverteilung berechnet
	$k_{PPW_{Glc6P}}$	394.59	aus Flussverteilung berechnet
	$k_{B_{Fru6P}}$	24.39	aus Flussverteilung berechnet
	$k_{B_{TrioseP}}$	42.55	aus Flussverteilung berechnet
	$k_{PPW_{Fru6P}}$	135.14	aus Flussverteilung berechnet
	$k_{PPW_{TrioseP}}$	37.84	aus Flussverteilung berechnet
	$k_{B_{3PG}}$	1866.67	aus Flussverteilung berechnet
	$k_{D_{PEP}}$	1142.86	aus Flussverteilung berechnet
	$k_{TCA_{PEP}}$	4714.28	aus Flussverteilung berechnet
	$k_{B_{Pru}}$	6877.78	aus Flussverteilung berechnet
Lactose			
LacY	k	115000.0	
	K_S	0.32	Bind. konst. Substrat Simulationsst.
		(0.064)	[25]
	K_I	0.05	Bindungskonst. Inhibitor
LacZ		(0.048-0.11)	[59]
	$k_{Haupt} = k$	202164.89	aus Flussverteilung berechnet
	K_S	12.2	Bindungskonst. Substrat [41]
	$k_{Neben} = k^+$	12000	Simulationsstudie
	α	0.1	Simulationsstudie
LacI	K_3	1.22e-9	Bindungskonst. DNA [36]
	K_b	2.44e-4	Bindungskonst. Allolactose [36]
$d_{Enzym Syn.}$	k'	4600	Rechnung aus max. Wert [26]
	c_{DNA}	1.32e-5	eigenes Experiment

PTS Glucose

Schritt 1

k_1	1e9	aus Flussverteilung berechnet
K_{11}	0.67	GG-Konstante [64]
K_{12}	0.04	GG-Konstante [64]
α	1.334	k_I/k_{-II} aus [64]
c_{EI0}	0.012	Gesamt EI [64]

Schritt 2

k_2	300000	aus Flussverteilung berechnet
K_2	0.77	GG-Konstante [64]
c_{HPr0}	0.12	Gesamt HPr [64]
c_{EIIA0}	0.105	Gesamt EIIA [64]

Schritt 3

k_3	200000	aus Flussverteilung berechnet
$K_{Glc_{ex}}$	0.0012	Bindungskonst. Substrat [61]
K_{Glc}	0.08	Bindungskonst. Simulationsstudie
K_{EIIAP}	0.0085	Bindungskonst. Substrat [61]

Crp

K_{lac}	2.44e-5	Bindungskonst. DNA [37]
K_{cya}	2.44e-5	Übernahme der Daten für <i>lac</i>
K_{crp1}	2.44e-5	Übernahme der Daten für <i>lac</i>
K_{crp2}	2.44e-4	Faktor 10 schwächer
K_N	2.44e-5	Übernahme der Daten für <i>lac</i>
K_b	2.44	Bindungskonst. cAMP [37]
K_{21}	16.42	Simulationsstudie $\psi_1 = 0.057$
K_{22}	0.165	Simulationsstudie $\psi_2 = 0.858$
α	0.01	Simulationsstudie
c_N	6.6e-4	ca. 40–50 Bindungsstellen

Crp Synth./Abbau

k'	400	Rechnung aus max. Wert [26]
c_{DNA}	1.32e-5	eigenes Experiment
k_{ab}	0.6	Simulationsstudie

Cya

k_{syn}	100000	Simulationsstudie
K_{EIIAP}	10	Simulationsstudie

cAMP Abbau

k_{out}	126	[85]
-----------	-----	------

Cya Synth./Abbau

k'	400	Simulationsstudie
c_{DNA}	1.32e-5	eigenes Experiment
k_{ab}	0.6	Simulationsstudie

Glucose

Glc - Transporter

r_{max}	14000	Simulationsstudie
K_S	0.18	Bindungskonst. Substrat

Glc

r_{max}	45552.11	aus Flussverteilung berechnet
K_S	0.16 (16.3)	Bindungskonst. Substrat Simulationsstudie [15]
K_I	13.17	Bindungskonst. Inhib. <i>Glc6P</i> [15]

weitere Parameter

MG_{Glc}	180.2e-6
MG_{Lac}	332.0e-6
γ_{PTS}	3.05e-5
γ_{Glc}	3.05e-5
γ_{LacY}	10e-5

Anmerkungen

- Die maximale Reaktionsrate r_{max} setzt sich aus spezifischer Aktivität k und der Enzymkonzentration c_{E0} zusammen: $r_{max} = k c_{E0}$. Da für viele Fälle die Enzymkonzentration gar nicht bekannt ist, die maximale Rate sich aber berechnen läßt (siehe b), wird die Enzymkonzentration nicht explizit im Modell verwendet.
- Die maximale Reaktionsrate r_{max} läßt sich berechnen, wenn die stationären Flüsse r_0 bekannt sind. Diese lassen sich bspw. mit der Methode der stationären Flußanalyse berechnen (siehe Anhang B). Außerdem müssen noch die Konzentrationen der beteiligten Metabolite c_{Mi} aus Messungen ermittelt werden. Für das vorgestellte Modell sind Werte aus der Literatur [42] entnommen. Der reaktionskinetische Ausdruck läßt sich in allgemeiner Form folgendermaßen anschreiben:

$$r_0 = r_{max} \frac{Z(c_{Mi})}{N(c_{Mi})}; \quad (C.1)$$

dies läßt sich nach r_{max} auflösen

$$r_{max} = \frac{r_0 N(c_{Mi})}{Z(c_{Mi})}. \quad (C.2)$$

- c Analog der Vorgehensweise von b läßt sich die Konstante k für die Abflüsse in die Biosynthese ermitteln.

$$k = \frac{r_0}{c_M} \quad (\text{C.3})$$

- d Die Translation ist nicht modelliert. Die Translationseffizienz kann damit $\xi = 1$ gewählt werden.

C.2 Parameter des Modells in Kapitel 8

Aufgrund der geringen Anzahl der Meßgrößen und dem primären Ziel einer semi-quantitativen Beschreibung der Experimente wurde auf den Einsatz eines rechnergestützten Identifikationstools verzichtet. Zur Anpassung mußten nur einige wenige Parameter modifiziert werden. Diese betreffen das PTS sowie die Expression der Lactose Gene.

In der verwendeten Literaturstelle sind keine Angaben zu finden, ob bei den Experimenten Nebenprodukte gebildet wurden. Bei den Mutanten ist zudem zu beobachten, dass die Wachstumsrate beim Wachstum auf beiden Zuckern sehr viel geringer ist, als bei Wachstum auf Glucose allein (dies trifft nicht bei der Zugabe von IPTG zu; dort ist eine ähnliche Wachstumsrate zu beobachten). Eine plausible Erklärung für dieses Verhalten ist bis jetzt noch nicht gefunden, so dass die Parameter γ_j zur Berechnung der Wachstumsrate für jede Mutante bestimmt wurden.

Die Parameter, die die Mutation kennzeichnen, sind mit einem $\bullet$ versehen (im Referenzstamm sind im Vergleich zum Ausgangsstamm in Kapitel 6 ebenfalls Mutationen eingebracht).

L8UV5 Referenzstamm

PTS

	k_2	8e+5	
	k_3	1.07e+5	
^e Enzym Synthese Lactose	k'	4600	
	k_{Neben}	170	
	α im Crp Block	0.7	•
Wachstumsrate	γ_{PTS}	3.05e-5	
	γ_{Glc}	3.05e-5	
	γ_{LacY}	6.6e-5	

L8UV5 crp Mutante

Lactose

	k_{ab}	0.14	
Crp	$c_{DNA_{crp}}$	1e-30	•
Wachstumsrate	γ_{Glc}	1.1e-5	
	γ_{LacY}	1.8e-5	

L8UV5 crp Mutante, + pth111 Plasmid

Crp	$c_{DNA_{crp}}$	1e-30	•
Glucose PTS	c_{EIICB0}	0.01 (konstant)	•
Wachstumsrate	γ_{Glc}	3.1e-5	
	γ_{PTS}	3.1e-5	
	γ_{LacY}	5.6e-5	

L8UV5 + IPTG

Lactose

k_{ab} 0.16

Wachstumsrate

γ_{Glc} 2e-5

γ_{PTS} 2e-5

γ_{LacY} 3e-5

L8UV5 + LacY⁺

Lactose

c_{LacY0} 0.045 (konstant) •

k_{ab} 0.9

Wachstumsrate

γ_{Glc} 0.6e-5

γ_{PTS} 0.6e-5

γ_{LacY} 4.1e-5

L8UV5 crp Mutante,
+ pha7 Plasmid

Crp

c_{Crp0} 0.005 (konstant) •

$f_{Lactose}$

k' 3000

Wachstumsrate

γ_{Glc} 2.75e-5

γ_{PTS} 2.75e-5

γ_{LacY} 9e-5

Anmerkungen

- e Beim Wild-Typ ist davon ausgegangen, dass der Promotor schwach ist und durch *Crp* aktiviert wird. Der Referenzstamm besitzt den *bla* Promotor anstelle des *Crp* abhängigen Promotor, was in damit unabhängig von *Crp* macht.
- f Die experimentellen Daten zeigen, daß die Expressionsrate für LacZ geringer ist, als bei den anderen Experimenten und im Modell durch die konstante Expression von *Crp* nicht erklärt werden kann. Der Wert dieses Parameters ist deshalb verändert, um eine gute Anpassung an die Daten zu erhalten.

Literaturverzeichnis

- [1] F. Allgöwer. *Näherungsweise Ein-/Ausgangs-Linearisierung nichtlinearer Systeme*. PhD thesis, Universität Stuttgart, Düsseldorf, 1996.
- [2] J. Babul, D. Clifton, M. Kretschmer, and D. G. Fränkel. Glucose metabolism in *Escherichia coli* and the effect of increased amount of aldolase. *Biochemistry*, 32:4685–4692, 1993.
- [3] W.E. Bentley and D.S. Kompala. A novel structured kinetic modeling approach for the analysis of plasmid instability in recombinant bacterial cultures. *Biotech. Bioeng.*, 33:49–61, 1989.
- [4] H. Bisswanger. *Theorie und Methoden der Enzymkinetik*. Verlag Chemie, Weinheim, 1979.
- [5] D. Blangy, H. Buc, and J. Monod. Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 31:13–35, 1968.
- [6] H. Bremer and P.P. Dennis. Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. In F. C. Neidhardt, Hrsg., *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, Seiten 1527–1542. ASM press, Washington, D.C., 1987.
- [7] S. Cha. A simple method for derivation of the rate equations for enzyme-catalyzed reactions under the rapid equilibrium assumption or combined assumptions of equilibrium and steady state. *Journal of Biological Chemistry*, 243:820–825, 1968.
- [8] W. Chen, J. E. Bailey, and S. B. Lee. Molecular design of expression systems: Comparison of different repressor control configurations using molecular mechanism models. *Biotech. Bioeng.*, 38:679–687, 1991.
- [9] W. W. Cleland. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products I. Nomenclature and rate equations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 67:104–137, 1963.

- [10] S. Cooper. *Bacterial growth and division*. Academic Press, 1991.
- [11] S. J. Van Dien and J. D. Keasling. A dynamic model of the *Escherichia coli* phosphate-starvation response. *Journal of Theoretical Biology*, 190:37–49, 1998.
- [12] 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.
- [13] D. G. Fraenkel. Glycolysis. In F. C. Neidhardt, Hrsg., *Escherichia coli and Salmonella*. ASM Press, Washington, D.C., 1996.
- [14] S. J. Fraser. The steady state and equilibrium approximations: a geometrical picture. *Journal of Chemical Physiology*, 88:4732–4738, 1988.
- [15] Y. Fukuda, S. Yamaguchi, M. Shimosaka, K. Murata, and A. Kimura. Purification and characterization of Glucokinase in *Escherichia coli* B. *Agric. Biologie Chemistry*, 48:2541–2548, 1984.
- [16] J. L. Galazzo and J. E. Bailey. Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.*, 12:162–172, 1990.
- [17] E. D. Gilles. Netzwerktheorie verfahrenstechnischer Prozesse. *Chemie Ingenieur Technik*, 69:1053–1065, 1997.
- [18] B. R. Glick and J. J. Pasternak. *Molekulare Biotechnologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1995.
- [19] A. Hanamura and H. Aiba. A new aspect of transcriptional control of the *Escherichia coli* *crp* gen: positive autoregulation. *Molecular Microbiology*, 6:2489–2497, 1992.
- [20] A. Harder and J. A. Roels. Application of simple structured models in bioengineering. *Adv. Biochemical Engineering*, 21:55–107, 1982.
- [21] W.H. Holms. The central metabolic pathways of *Escherichia coli* relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Current Topics in Cellular Regulation*, 28:69–105, 1986.
- [22] J. M. Hudson, M. Crowe, and M. G. Fried. Effects of anion binding of the cAMP receptor protein to the lactose promoter. *European Journal of Biochemistry*, 212:539–548, 1993.

- [23] J. M. Hudson and M. G. Fried. Co-operative interactions between the catabolite gene activator protein and the *lac* repressor at the lactose promoter. *Journal of Molecular Biology*, 214:381–396, 1990.
- [24] H. Ishizuka, A. Hanamura, T. Inada, and H. Aiba. Mechanism of the down-regulation of camp receptor protein by glucose in *Escherichia coli*: role of autoregulation of the *crp* gene. *The EMBO Journal*, 13:3077–3082, 1994.
- [25] H. R. Kaback. The Lac carrier protein in *Escherichia coli*. *Journal of Membrane Biology*, 76:95–112, 1983.
- [26] D. Kennell and H. Riezman. Transcription and translation initiation frequencies of the *Escherichia coli lac* operon. *Journal of Molecular Biology*, 114:1–21, 1977.
- [27] 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 Letters*, 368:1–4, 1995.
- [28] N. A. Khoroshilova, V. I. Muronetz, and N. K. Nagradova. Interaction between D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase and its functional consequences. *FEBS*, 297:247–249, 1992.
- [29] 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. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12914–12919, 1997.
- [30] R. Knippers. *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1997.
- [31] B. T. Koh and M. G. S. Yap. A simple genetically structured model of *trp* repressor-operator interactions. *Biotech. Bioeng.*, 41:707–714, 1993.
- [32] D. E. Koshland, G. Nemethy, and D. Filmer. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry*, 5:365–385, 1966.
- [33] A. Kremling and E. D. Gilles. Eine ACSL - Anwendung zur Simulation strukturierter biologischer Modelle. In W. Krug, Hrsg., *Fortschritte in der Simulationstechnik*, Seiten 417–422, Dresden, 1996. ASIM, Vieweg.
- [34] A. Kremling, R. Rehner, C. Kammerer, J. Wang, and E. D. Gilles. A simulation tool for metabolic structured models. In A. Sydow, Hrsg., *15th IMACS World Congress*, volume 6, Seiten 635–640, Berlin, Germany, 1997.
- [35] L. Laffand and M. L. Shuler. Structured model of genetic control via the *lac* promoter in *Escherichia coli*. *Biotech. Bioeng.*, 43:399 – 410, 1993.

- [36] S. B. Lee and J. E. Bailey. Genetically structured models for *lac* promotor-operator function in the *Escherichia coli* chromosome and in multicopy plasmids: *lac* operator function. *Biotech. Bioeng.*, 26:1372–1382, 1984.
- [37] S. B. Lee and J. E. Bailey. Genetically structured models for *lac* promotor-operator function in the *Escherichia coli* chromosome and in multicopy plasmids: *lac* promotor function. *Biotech. Bioeng.*, 26:1383–1389, 1984.
- [38] S. B. Lee, A. Seressiotis, and J. E. Bailey. A kinetic model for product formation in unstable recombinant populations. *Biotech. Bioeng.*, 27:1699 ff, 1985.
- [39] J. W. Lengeler. Die biologische Zelle als komplexes Informationssystem. *Biologen in unserer Zeit*, 5:65–70, 1996.
- [40] J. W. Lengeler, G. Drews, and H. G. Schlegel. *Biology of the prokaryotes*. G. Thieme Verlag, Stuttgart und Blackwell Science Ltd., Oxford, 1999.
- [41] E.C.C. Lin. Dissimilatory pathways for sugars, polyols, and carboxylates. In F. C. Neidhardt, Hrsg., *Escherichia coli and Salmonella*. ASM Press, Washington, D.C., 1996.
- [42] O. H. Lowry, J. Carter, J. B. Ward, and L. Glaser. The effect of carbon and nitrogen sources on the level of metabolic intermediates in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 246:6511–6521, 1971.
- [43] F. Madron, V. Veverka, and V. Vanecek. Statistical analysis of material balance of a chemical reactor. *AIChE*, 23:482–486, 1977.
- [44] W. Marquardt. An object-oriented representation of structured process models. European Symposium on Computer Aided Process Engineering 1, ESCAPE-1 24-28 may 1992, Elsinore, Denmark. *Computers chem. Engng. (Suppl.)*, 16:329–336, 1992.
- [45] A. G. Marr. Growth rate of *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 55:316–333, 1991.
- [46] C. May. Von der computer- zur expertenorientierten Modellbeschreibung thermodynamischer Systeme. In A. Kuhn and S. Wenzel, Hrsg., *Fortschritte in der Simulationstechnik*, Seiten 296–301, Dortmund, 1997. ASIM, Vieweg.
- [47] C. May and E. D. Gilles. Textual and visual representations of an object-oriented modeling language – a robust, automatic conversion scheme. In *European Simulation Symposium 1995, ESS'95 (Erlangen-Nürnberg, Germany, October 26-28)*, Seiten 227–231. SCS Europe, 1995.

- [48] C. May, A. Kremling, and E. D. Gilles. On the design of generic model components. In A. Sydow, Hrsg., *15th IMACS World Congress*, volume 2, Seiten 709–714, Berlin, Germany, 1997.
- [49] K. D. Mohl, A. Spieker, E. Stein, and E. D. Gilles. DIVA - Eine Umgebung zur Simulation, Analyse und Optimierung verfahrenstechnischer Prozesse. In A. Kuhn and S. Wenzel, Hrsg., *Simulationstechnik, 11. ASIM-Symposium in Dortmund*, Seiten 278–283. Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1997.
- [50] J. Monod. *Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes*. Hermann, Paris, 1942.
- [51] J. Monod, J. Wyman, and J.-P. Changeux. On the nature of allosteric transition: a plausible model. *Journal of Molecular Biology*, 12:88–118, 1965.
- [52] W. Nachtigall. *Bionik: Grundlagen und Beispiele für Ingenieure und Naturwissenschaftler*. Springer-Verlag, 1998.
- [53] F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, and M. Schaechter. *Physiology of the bacterial cell: A molecular approach*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1990.
- [54] J. Nielsen and J. Villadsen. Modelling of microbial kinetics. *Chemical Engineering Science*, 47:4225–4270, 1992.
- [55] J. Nielsen and J. Villadsen. *Bioreaction Engineering Principles*. Plenum Press New York and London, 1994.
- [56] S. Oehler, M. Amouyal, P. Kolkhoff, B. v. Wilcken-Bergamnn, and B. Müller-Hill. Quality and position of the three *lac* operators of *E. coli* define efficiency of repression. *The EMBO Journal*, 13:3348–3355, 1994.
- [57] M. S. Okino and M. L. Mavrovouniotis. Simplification of mathematical models of chemical reaction systems. *Chemical Reviews*, 98:391–408, 1998.
- [58] E. O. Powell. The growth rate of microorganisms as a function of substrate concentration. In *Microbial and Physiology and Continuous Culture*, Seiten 34–56, 1967.
- [59] T. Osumi and M. H. Saier. Regulation of lactotse permease activity by the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system: evidence for direct binding of the glucose-specific enzyme III to the lactose permease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:1457–1461, 1982.
- [60] B.O. Palsson and E. N. Lightfoot. Mathematial modeling of dynamics and control in metabolic networks: I On Michaelis-Menten kinetics. *Journal of Theoretical Biology*, 111:273–302, 1984.

- [61] P. W. Postma, J. W. Lengeler, and G. R. Jacobson. Phosphoenolpyruvat: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological Reviews*, 57:543–594, 1993.
- [62] R. Ramakrishna, D. Ramkrishna, and A. E. Konopka. Microbial growth on substitutable substrates: characterizing the consumer-resource relationship. *Biotech. Bioeng.*, 54:77–90, 1997.
- [63] M. Rizzi, M. Baltes, U. Theobald, and M. Reuss. In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II. Mathematical model. *Biotech. Bioeng.*, 55:592–608, 1997.
- [64] J. M. Rohwer. *Interaction of functional units in metabolism*. PhD thesis, Universität Amsterdam, 1997.
- [65] J. M. Rohwer, R. Bader, H. V. Westerhoff, and P. W. Postma. Limits to inducer exclusion: inhibition of the bacterial phosphotransferase system by glycerol kinase. *Molecular Microbiology*, 29:641–652, 1998.
- [66] J. M. Rohwer, S. Schuster, and H.V. Westerhoff. How to recognize monofunctional units in a metabolic system. *Journal of Theoretical Biology*, 179:214–228, 1996.
- [67] R. Schuster and S. Schuster. Relationship between modal analysis and rapid-equilibrium approximation in the modelling of biochemical networks. *Syst. Anal. Model. Simul.*, 8:623–633, 1991.
- [68] Th. Sauter. Stationäre Stoffflußanalyse bei *Escherichia coli*. Master's thesis, Universität Stuttgart, 1996.
- [69] R. Schreyer and A. Böck. Phosphoglucose Isomerase from *Escherichia coli* K10: purification, properties and formation under aerobic and anaerobic condition. *Arch. Microbiology*, 127:289–298, 1980.
- [70] Lee A. Segel and Marshall Slemrod. The Quasi-Steady-State assumption: A case study in perturbation. *Siam Review*, 31(3):446–477, 1989.
- [71] M. L. Speranza, G. Valentini, and M. Malcovati. Fructose-1,6-bisphosphate-activated pyruvat kinase from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 191:701–704, 1990.
- [72] T. G. Spring and F. Wold. The purification and characterization of *Escherichia coli* enolase. *The Journal of Biological Chemistry*, 246:6797–6802, 1971.
- [73] H.J. Stoffers, E.L.L. Sonnhammer, G.J.F. Blommesteijn, N.J.H. Raat, and H.V. Westerhoff. Metasim: Object oriented modelling of cell regulation. *CABIOS*, 8:443–449, 1992.

- [74] U. Theobald, W. Mailinger, M. Baltes, M. Rizzi, and M. Reuss. In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. experimental observations. *Biotech. Bioeng.*, 55:305–316, 1997.
- [75] M. Tomita, K. Hashimoto, K. Takahashi, T. S. Shimizu, Y. Matsuzaki, F. Miyoshi, K. Saito, S. Tanida, K. Yugi, J. G. Venter, and C. A. Hutchison III. E-CELL: software environment for whole-cell simulation. *Bioinformatics*, 15:72–84, 1999.
- [76] F. Tränkle, A. Gerstlauer, M. Zeitz, and E. D. Gilles. PROMOT/DIVA: A prototype of a process modeling and simulation environment. In I. Troch and F. Breitenecker, Hrsg., *IMACS Symposium on Mathematical Modelling, 2nd MATHMOD*, Seiten 341–346, Vienna, Austria, February 1997. ARGESIM Report.
- [77] G. T. Tsao and T. P. Hanson. Extended Monod equation for batch cultures with multiple exponential phases. *Biotech. Bioeng.*, 17:1591–1598, 1975.
- [78] B.G. Turner and D. Ramkrishna. Reversed enzyme synthesis rate expression in cybernetic models of bacterial growth. *Biotech. Bioeng.*, 31:41–43, 1988.
- [79] B.G. Turner, D. Ramkrishna, and N.B. Jansen. Cybernetic modelling of bacterial cultures at low growth rates: mixed substrate systems. *Biotech. Bioeng.*, 32:46–54, 1988.
- [80] A. Varma, B. W. Boesch, and B. O. Palsson. Biochemical production capabilities of *Escherichia coli*. *Biotech. Bioeng.*, 42:59–73, 1993.
- [81] A. Varma and B. O. Palsson. Metabolic capabilities of *Escherichia coli*: I. synthesis of biosynthetic precursors and cofactors. *Journal of Theoretical Biology*, 165:477–502, 1993.
- [82] A. Varma and B. O. Palsson. Metabolic capabilities of *Escherichia coli*: II. optimal growth pattern. *Journal of Theoretical Biology*, 165:503–522, 1993.
- [83] A. Varma and B. O. Palsson. Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:3724–3731, 1994.
- [84] K. S. Wilson, C. R. Conant, and P. H. von Hippel. Determinants of the stability of transcription elongation complexes: Interactions of the nascent RNA with the DNA template and the RNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 289:1179–1194, 1999.
- [85] P. Wong, S. Gladney, and J. D. Keasling. Mathematical model of the *lac* operon: Inducer exclusion, catabolite repression, and diauxic growth on glucose and lactose. *Biotechnology Progress*, 13:132–143, 1997.