

**Theoretische Untersuchung  
zur Wirkung von Inhibitoren in  
Abhängigkeit von ihrem Angriffsort  
im metabolischen Netzwerk und ihrem Typ**

Bachelorarbeit

im Studiengang Bioinformatik an der FU-Berlin. April 2004

eingereicht von: Susanne Gerber

Korrektor: Dr. Edda Klipp  
Zweitkorrektor: Dr. Wilhelm Huisinga

Berlin, April 2004



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Motivation . . . . .	1
1.2	Kinetik reversibler Reaktionen . . . . .	2
1.3	Metabolische Kontrolltheorie . . . . .	4
<b>2</b>	<b>Das Modell</b>	<b>7</b>
2.1	Die Reaktionskette . . . . .	7
2.2	Inhibitionsterme . . . . .	7
<b>3</b>	<b>Die Simulation</b>	<b>9</b>
3.1	Vereinfachtes Modell . . . . .	9
3.2	Simulationsergebnisse . . . . .	9
3.3	Verallgemeinertes Modell . . . . .	16
3.4	Simulationsergebnisse . . . . .	17
3.5	Einfluß der Konstanten $K_{ms}$ und $K_{mp}$ . . . . .	22
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>27</b>
4.1	Zusammenfassung . . . . .	27
4.2	Diskussion und Perspektiven . . . . .	28
	<b>Danksagung</b>	<b>31</b>



# Abbildungsverzeichnis

3.1	Selektivitäten(Unkomp/Komp) aufgetragen gegen die Positionen, an denen gehemmt wird bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen. Pro Kurve wurde die Inhibitorkonzentration konstant gehalten. Offensichtlich ist unkompetitive Inhibitor generell der stärkere.	10
3.2	Selektivitäten(Nichtkomp/Komp) aufgetragen gegen die Positionen an denen gehemmt wird bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen. Pro Kurve wurde die Inhibitorkonzentration konstant gehalten.	11
3.3	Selektivitäten(Unkomp/Nichtkomp) aufgetragen gegen die Positionen an denen gehemmt wird bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen. Pro Kurve wurde die Inhibitorkonzentration konstant gehalten.	12
3.4	Selektivitäten gegen Anfangskonzentrationskontrollkoeffizienten der Edukte bei Inhibitorkonzentrationen von 0.1 (oben links); 1 (oben rechts); und 10 (unten)]. In jeder Grafik wurde nacheinander an jeder Position in der Kette einmal gehemmt. Die Selektivität die durch Hemmung an Position 1 erreicht werden kann ist jeweils markiert.	13
3.5	Selektivitäten gegen Anfangs-Konzentrationskontrollkoeffizienten der Produkte bei Inhibitorkonzentrationen von 0.1 (oben links); 1 (oben rechts); und 10 (unten links)]. In jeder Grafik wurde nacheinander an jeder Position in der Kette einmal gehemmt. Die Selektivität die durch Hemmung an Position 1 erreicht werden kann ist jeweils markiert.	14
3.6	Selektivitäten berechnet aus den Flüssen (linke Spalte) und aus den Flusskontrollkoeffizienten (rechte Spalte) gegen die Positionen an denen gehemmt wurde bei Inhibitorkonzentrationen von 0.1 (obere Reihe); 1 (mittlere Reihe) ; und 10 (untere Reihe).	15
3.7	Die Abbildungen 7a und 7b zeigen Simulationsergebnisse mit Inhibitor kombination (Unkomp/Komp) bei geringen Inhibitorkonzentrationen.	17
3.8	Die Abbildungen 8a und 8b zeigen Simulationsergebnisse mit Inhibitor kombination (Unkomp/Komp) bei hohen Inhibitorkonzentrationen.	18
3.9	Die Abbildungen 9a und 9b zeigen Simulationsergebnisse mit Inhibitor kombination (Unkomp/Komp) bei hohen Inhibitorkonzentrationen, die das Kriterium (3.5) erfüllen.	18
3.10	Simulation für Inhibition(Nichtkomp/Komp): Abb.10a und 10b zeigen Simulationsergebnisse für erfülltes Kriterium (3.5) bei geringen, Abb. 11a und 11b bei hohen Inhibitorkonzentrationen. Abb.12a und 12b zeigen Resultate für hohe Inhibitorkonzentrationen, die das Kriterium (3.4) erfüllen.	19
3.11	Abb.13a und 13b mit Inhibitor kombination (Unkomp/Nichtkomp) zeigen Resultate bei geringen Abb. 14a und 14b bei hohen Inhibitorkonzentrationen. Daten in den linken Grafiken (13a, 14a) erfüllen das Kriterium (3.5).	20

- 3.12 Simulationsergebnisse mit Inhibitor Kombination (Nichtkomp/Komp): Abb. 15 zeigt Resultate für geringe, Abb. 16 für hohe Inhibitor Konzentrationen. In den linken Grafiken (Abb. 15a, 16a) sind jeweils die Parameter eingetragen, die Kriterium (3.5) erfüllen. . . . 21
- 3.13 Aufgetragen sind die Selektivitäten (Nichtkomp/Komp) gegen die Positionen, an denen gehemmt wurde. Die Inhibitor Konzentration beträgt jeweils 0.01. Pro Grafik ist ein  $K_{ms}$ -Wert festgehalten und pro Simulationsergebnis werden jeweils die  $K_{mp}$ -Werte variiert. . . . 22
- 3.14 Aufgetragen sind die Selektivitäten (Nichtkomp/Komp) gegen die Positionen, an denen gehemmt wurde. Die Inhibitor Konzentration beträgt jeweils 1. Pro Grafik ist ein  $K_{ms}$ -Wert festgehalten und pro Simulationsergebnis werden jeweils die  $K_{mp}$ -Werte variiert. . . . 23
- 3.15 Aufgetragen sind die Selektivitäten (Nichtkomp/Komp) gegen die Positionen, an denen gehemmt wurde. Die Inhibitor Konzentration beträgt jeweils 10. Pro Grafik ist ein  $K_{ms}$ -Wert festgehalten und pro Simulationsergebnis werden jeweils die  $K_{mp}$ -Werte variiert. . . . 24
- 3.16 Aufgetragen sind die Selektivitäten (Nichtkomp/Komp) gegen die Positionen, an denen gehemmt wurde. Die Inhibitor Konzentration beträgt jeweils 10. Pro Grafik ist ein  $K_{ms}$ -Wert festgehalten und pro Simulationsergebnis werden jeweils die  $K_{mp}$ -Werte variiert. . . . 25

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Motivation

Bei der Suche nach geeigneten Inhibitoren ist es wichtig ein Enzym zu finden, das in einem metabolischen Netzwerk ein Erfolg versprechendes Angriffsziel darstellt, aber natürlich auch welche Inhibitionsart gewählt werden sollte um einen Organismus unter bestimmten Voraussetzungen am erfolgreichsten zu schädigen. Es könnte z.B. unter den vorgegebenen Bedingungen ein kompetitiver Inhibitor eine stärkere Auswirkung auf den Stoffwechsel haben, als ein nichtkompetitiver obwohl dieser normalerweise als der effektivere angesehen wird. Dies kann daran liegen, das ein Organismus die Inhibition nicht einfach durch eine Erhöhung der konkurrieren Substrat-Konzentration kompensieren kann, oder weil die kinetischen Parameter einen kompetitiven Inhibitionsmechanismus begünstigen. Um herauszufinden welche Bedingungen das sind, unter denen ein Inhibitor den Fluss in einem gegebenen System am stärksten schädigen kann, wurden in dieser Arbeit unter Verwendung der Metabolischen Kontrolltheorie das Verhalten einer linearen Kette bestehend aus 10 enzymkatalysierten gekoppelten Reaktionen am Computer simuliert. Es wird die allgemeine Vorgehensweise beschrieben, wie dieses biochemische Reaktionssystem mathematisch modelliert wird, um das Verhalten nach Störung durch Inhibition eines Enzyms innerhalb der Kette untersuchen zu können. Um allgemeine Aussagen und Vorhersagen über die Wahl geeigneter Inhibitoren zu gegebenen Parametern machen können, werden die Auswirkungen drei verschiedener Inhibitionstypen als Störfaktoren miteinander verglichen und deren Konzentration und Angriffsziele in der Reaktionskette, sowie diejenigen kinetischen Parameter, die das System beschreiben, variiert.

Folgende Fragen waren dabei besonders wichtig:

1. Wie stark kann der Fluss durch die unterschiedlichen Inhibitionstypen (kompetitive, nichtkompetitive oder unkompetitive Hemmung ) bei einer festen kinetischen Parameterkombination in Abhängigkeit von der Konzentration und der Angriffsposition innerhalb der Kette gehemmt werden?
2. Kann man allgemeine Regeln aufstellen an welcher Position innerhalb einer linearen

Kette in Abhängigkeit von der Inhibitionsart und Konzentration am selektivsten gehemmt werden kann?

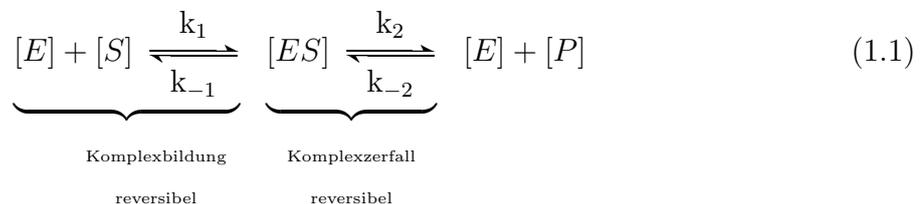
3. Existieren Abhängigkeiten zwischen der Selektivität und Kontrollkoeffizienten (der Konzentrationen oder der Flüsse) ? Und wenn ja, welche und unter welchen Bedingungen ?
4. Die Selektivitäten werden auf zwei verschiedene Arten berechnet: Zum Einen analytisch, aus den alten und neuen steady-state Flüssen, und zum Anderen numerisch aus Flusskontrollkoeffizienten und Elastizitäten. Sind diese Selektivitäten vergleichbar oder haben sie wenigstens die gleiche Tendenz ?

Können solche Aussagen bei diesem vereinfachten fiktiven Modell gemacht werden dann erlaubt dies eine wesentliche Erleichterung bei einer Erweiterung auf reale Stoffwechselwege, wie z.B. der Glykolyse oder verzweigter Netzwerke. Außerdem könnten dadurch evtl. neue Ideen für die Entwicklung inhibitorischer Medikamente entstehen, indem man beim drug-design nicht nur vornehmlich die 3-Dimensionale Struktur eines Angriffsenzyms betrachtet, sondern die Wahl der Inhibitionsart z.B. auch von dessen Position innerhalb einer Stoffwechselkette abhängig macht.

## 1.2 Kinetik reversibler Reaktionen

Alle Reaktionen des untersuchten Modells sind reversible und enzymkatalysiert. In diesem Abschnitt wird kurz auf die Herleitung der Geschwindigkeitsausdrücke eingegangen die im Modell benutzt werden. Für Details siehe z.B. [Kub91].

Ausgangspunkt ist hier das allgemeine Modell einer reversiblen enzymkatalysierten Reaktion:



Dabei gelten in (1.1) die folgenden Bezeichnung:

$[E]$  = Katalysator (Enzymkonzentration)

$[S]$  = Substratkonzentration

$[ES]$  = Enzym-Substrat-Komplex

$[P]$  = Produktkonzentrationen

$[k_i]$  = kinetische Konstanten

Für die zeitliche Änderung der einzelnen Reaktionspartner ergibt sich folgendes nichtlineares Differentialgleichungssystem:

$$\frac{d}{dt}[S] = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \quad (1.2)$$

$$\frac{d}{dt}[E] = (k_{-1} + k_2)[ES] - (k_1[S] + k_{-2}[P])[E] \quad (1.3)$$

$$\frac{d}{dt}[ES] = -(k_{-1} + k_2)[ES] - (k_1[S] + k_{-2}[P])[E] \quad (1.4)$$

$$\frac{d}{dt}[P] = k_2[ES] - k_{-2}[E][P] = v \quad (1.5)$$

Die Produktbildungsrate entspricht der Reaktionsgeschwindigkeit. Da diese Gleichungen ohne Vereinfachungen analytisch nicht lösbar sind, wird die sog. steady-state Annahme

$$\frac{d}{dt}[ES] = 0 \quad (1.6)$$

gemacht. Diese Annahme eines Fließgleichgewichts, eine Vereinfachung mit allgemeiner Gültigkeit wurde erstmals 1925 von G.E. Briggs und B.S. Haldane vorgeschlagen.

Üblicherweise liegt nämlich das Substrat in großem Überschuss im Vergleich zum Enzym vor ( $[S] \gg [E]$ ). Mit Ausnahme der Anfangsphase der Reaktion, die gewöhnlich nur wenige Millisekunden dauert, während  $E$  und  $S$  gemischt werden bleibt  $[ES]$  annähernd konstant bis das Substrat aufgebraucht ist. Daher muss die Geschwindigkeit der Bildung von  $[ES]$  während der Reaktion gleich der Geschwindigkeit seines Verbrauchs sein. Mit Hilfe der Beziehung für die Gesamtmenge des Enzyms  $[E]_{total} = [E] + [ES]$  erhält man die folgende Geschwindigkeitsgleichung:

$$v = [E]_{total} \frac{[S]q - [P]}{\frac{k_1[S]}{k_{-1}k_{-2}} + \frac{1}{k_{-2}} + \frac{k_2}{k_{-1}k_{-2}} + \frac{[P]}{k_{-1}}} \quad (1.7)$$

$$\text{mit } q = \frac{k_1k_2}{k_{-1}k_{-2}} \text{ als Gleichgewichtskonstante}$$

Für den praktischen Gebrauch müssen die kinetischen Ausdrücke noch zu experimentell bestimmbar Größen formuliert werden, daher wird diese Gleichung unter Benutzung von

$$q = \frac{V_{max}^{\rightarrow} \cdot K_p}{V_{max}^{\leftarrow} \cdot K_{ms}} \quad (1.8)$$

und mit Hilfe der Definitionen der Michaelis-Menten Kinetik in die folgende Form gebracht:

$$v = \frac{\frac{V_{max}^{\rightarrow}}{K_{ms}} [S] - \frac{V_{max}^{\leftarrow}}{K_{mp}} [P]}{1 + \frac{[S]}{K_{ms}} + \frac{[P]}{K_{mp}}} \quad (1.9)$$

wobei  $K_{mS}$  und  $V_{max}^{\rightarrow}$  Michaelis-Konstante und Maximalgeschwindigkeit für die Hinreaktion, und  $K_{mP}$  und  $V_{max}^{\leftarrow}$  die der Rückreaktion sind. Darüberhinaus gelten

$$K_{ms} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (1.10)$$

$$K_{mp} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}} \quad (1.11)$$

$$V_{\max}^{\rightarrow} = k_2[E]_{total} \quad (1.12)$$

$$V_{\max}^{\leftarrow} = k_{-1}[E]_{total} \quad (1.13)$$

### 1.3 Metabolische Kontrolltheorie

Die Anfang der siebziger Jahre entwickelte Metabolische Kontrolltheorie (cf. [Rap74] und [Bur73]) wird inzwischen weltweit in breitem Umfang zur experimentellen und theoretischen Untersuchung der Kontroll- und Regulationseigenschaften metabolischer und genetischer Systeme eingesetzt. Sie basiert auf mathematischen Modellen der beteiligten Reaktionen in einem Stoffwechselnetzwerk mit deren Hilfe die kontrollierenden Reaktionsschritte in einem Stoffwechselnetzwerk ermittelt werden können. Eine Sensitivitätsanalyse liefert die gewünschten Kontrollkoeffizienten: sie beschreiben die differentielle Änderung z.B. des Stoffflusses durch einen Stoffwechselweg bei einer differentiellen Änderung der Aktivität eines der beteiligten Enzyme. Sie können also als quantitative Indikatoren der globalen Kontrolle angesehen werden, die ein Enzym auf den Fluss durch das System oder eine bestimmte Metabolitenkonzentration hat. Dadurch erhält man u. A. Informationen darüber, welche (genetischen) Veränderungen im Stoffwechsel oder bei der Prozessführung vorgenommen werden müssen, um einen biotechnologischen Produktionsprozess zu optimieren (metabolic engineering).

Im Folgenden werden kurz die verwendeten Definitionen und Ideen vorgestellt werden, für Details siehe: [Fel97] oder [Sch96] Reaktionssysteme werden hierbei im stationären Zustand betrachtet, wo sich die Metabolitenkonzentration mit der Zeit nicht mehr verändert. Dadurch wird eine implizite Abhängigkeit der Konzentrationen und Flüsse von den Parametern beschrieben.

$$\frac{d}{dt}[S] = 0 \quad \text{bzw.} \quad N \cdot v([S], p) = 0 \Rightarrow J = v([S(p)], p) \quad (1.14)$$

Dabei gelten in (1.14) die folgenden Bezeichnung:

$N = (n_{ij}) \quad i = 1, \dots, n \quad j = 1, \dots, r$  : Stöchiometrische Matrix des Systems

$[S] = ([S_1], \dots, [S_m])^T$  : Vektor der Metabolitenkonzentrationen

$v = (v_1, \dots, v_m)^T$  : Vektor der Reaktionsraten

$p = (p_1, \dots, p_m)^T$  : Parametervektor

$J$  : Fluss im stationären Zustand

Die Relationen zwischen steady-state Variablen und Parametern sind i. A. nichtlinear und können nicht analytisch angegeben werden. Durch eine Beschränkung auf infinitesimale Änderungen wird eine Linearisierung des Systems in der Nähe des stationären Zustandes erreicht.

Zur sicheren Bestimmung metabolischer Kontrollkoeffizienten müssen neben der Modellstruktur auch die biochemischen Modellparameter bekannt sein. Zwei verschiedene Typen von Koeffizienten müssen unterschieden werden, in Abhängigkeit davon ob lokale (Elastizitätskoeffizienten) oder globale (Kontrollkoeffizienten) Kontrolle bestimmt werden soll. Die Ersten quantifizieren die direkte und unmittelbare Empfindlichkeit einer Rate für die Änderung einer Konzentration oder eines Parameters Hierbei wird das Enzym als isoliert betrachtet .

$$\epsilon_i^k = \left( \frac{S_i}{v_k} \frac{\Delta v_k}{\Delta S_i} \right)_{\Delta S_i \rightarrow 0} = \frac{S_i}{v_k} = \frac{\partial \ln(v_k)}{\partial \ln S_i} \quad (1.15)$$

Elastizitätskoeffizient der Reaktion  $k$  bezüglich des Metaboliten  $S_i$

$$\pi_m^k = \frac{\partial \ln v_k}{\partial \ln p_m} \quad (1.16)$$

Elastizitätskoeffizient bezüglich eines kinetischen Parameters  $p$

Dagegen sind Kontrollkoeffizienten ein quantitatives Maß für die Änderung einer steady-state Variablen (Flüsse, Konzentrationen) eines Systems metabolischer Reaktionen nach Störung einer bestimmten Reaktion. Solche Störungen können z.B. durch Hinzufügen von Enzymen, Inhibitoren oder Metaboliten hervorgerufen werden, die das System zwingen in einen neuen stationären Zustand überzugehen. Man unterscheidet hier zum Einen den Flusskontrollkoeffizient der  $k$ -ten Reaktion in einem Stoffwechselsystem

$$C_k^{J_j} = \frac{v_k}{J_j} \frac{\Delta J_j}{\Delta v_k} = \frac{v_k}{J_j} \frac{\frac{\partial J_j}{\partial p_k}}{\frac{\partial v_k}{\partial p_k}} = \frac{\partial \ln}{\partial \ln v_k} \quad (1.17)$$

mit den Bezeichnungen in (1.17):

$\Delta v_k$  : Ratenänderung der  $k$ -ten Reaktion unter isolierten, festen Bedingungen

$\Delta J_j$  : resultierende Änderung des steady-state Flusses durch die  $j$ -te Reaktion

$\Delta \frac{v_k}{J_j}$  : Normierungsfaktor und  $p$  als kinetischem Parameter dieser  $k$ -ten Reaktion

und zum Anderen den Konzentrationskontrollkoeffizient der  $k$ -ten Reaktion in einem Stoffwechselsystem

$$C_k^{S_j} = \frac{v_k}{S_j} \frac{\Delta S_j}{\Delta v_k} = \frac{v_k}{S_j} \frac{\frac{\partial S_j}{\partial p_k}}{\frac{\partial v_k}{\partial p_k}} = \frac{\partial \ln}{\partial \ln v_k} \quad (1.18)$$

mit den Bezeichnungen in (1.18):

$\Delta v_k$  : Ratenänderung der  $k$ -ten Reaktion unter isolierten, festen Bedingungen

$\Delta S_i$  : resultierende Änderung des steady-state-Konzentration von  $S_i$

$\Delta \frac{v_k}{S_i}$  : Normierungsfaktor und  $p$  als kinetischem Parameter dieser  $k$ -ten Reaktion

Konzentrationskontrollkoeffizienten sind ein Maß für den Grad in dem Reaktion  $k$  eine gegebene Metabolitenkonzentration im stationären Zustand kontrolliert.

Um das Antwortverhalten eines Systems auch auf andere als infinitesimale Störungen quantifizieren zu können und um die unterschiedliche Effektivität der Inhibitionsarten vergleichen zu können, wird zusätzlich der Term "Selektivität" eingeführt, definiert als:

$$\text{Selektivität} = \frac{\% \text{ inhibierter Fluss nach Inhibition mit Inhibitor 1}}{\% \text{ inhibierter Fluss nach Inhibition mit Inhibitor 2}} \quad (1.19)$$

Die Idee hierzu stammt von [Wes02]. Sie führte diesen Terminus im Zusammenhang mit *antiparasitic drug design* ein als :

$$\text{selectivity} = \frac{C_i^J(\text{parasite}) \cdot \epsilon_I^j(\text{parasite})}{C_i^J(\text{host}) \cdot \epsilon_I^j(\text{host})} = \frac{1 - \frac{J_{\text{parasite}}}{J_{\text{parasite}}^0}}{1 - \frac{J_{\text{host}}}{J_{\text{host}}^0}} \quad (1.20)$$

Sie ist also das Verhältnis der Minderung des Flusses in Parasit und Wirt, unter der Annahme, das ein dem Wirt verabreichter Inhibitor bei Wirt und Parasit dasselbe Enzym angreift. In dieser Definition sind die  $J^0$  die steady-state Flüsse vor der Inhibition, und  $J_{\text{parasite}}$  bzw.  $J_{\text{host}}$  die neuen Gleichgewichtsflüsse nach Inhibition.

In der vorliegenden Arbeit wird aber nicht die unterschiedliche Wirkung eines Inhibitors auf zwei unterschiedliche Systeme untersucht, sondern es wird verglichen, welche Auswirkungen unterschiedliche Inhibitoren unter identischen Bedingungen auf den Fluss haben. Dafür kann die Selektivität numerisch entweder direkt aus den alten und neuen steady-state Flüssen berechnet werden, d.h.

$$\text{selectivity}_1 := \frac{C_i^J(\text{Inhibitor}_1) \cdot \epsilon_I^j(\text{Inhibitor}_1)}{C_i^J(\text{Inhibitor}_2) \cdot \epsilon_I^j(\text{Inhibitor}_2)} \quad (1.21)$$

oder auf Basis der Flusskontrollkoeffizienten und Elastizitäten:

$$\text{selectivity}_2 = \frac{1 - \frac{J_{\text{Inhibitor}_1}}{J^0}}{1 - \frac{J_{\text{Inhibitor}_2}}{J^0}} \quad (1.22)$$

Mit Hilfe der Selektivität kann man nun folgende Aussagen machen:

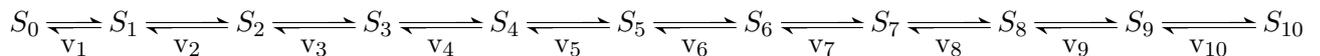
- i) Nimmt sie den Wert 1 an, bedeutet dies, dass überhaupt keine Selektivität erreicht wird, und der Fluss durch beide Hemmtypen eine identische Inhibition erfährt.
- ii) Erhält man einen Wert größer 1, dann bedeutet dies eine Selektivität derart, das Inhibitor<sub>1</sub> die stärkere Wirkung auf den Fluss ausübt,
- iii) sind die Werte kleiner 1, ist Inhibitor<sub>2</sub> der stärkere.

# Kapitel 2

## Das Modell

### 2.1 Die Reaktionskette

Das untersuchte Modellsystem ist wie schon erwähnt eine lineare Kette bestehend aus 10 enzymkatalysierten Reaktionen welche durch die 11 Substrate gekoppelt werden. Dabei stellt das Produkt der Reaktion  $i$  gleichzeitig das Edukt der Reaktion  $i + 1$  dar:



Um eine Basis zu schaffen beginnt die Arbeit mit einem vereinfachten Modell, bei dem alle 10 Reaktionen dieser Kette dieselbe Kinetik haben. Variiert werden die Art der Inhibition, und die Inhibitorkonzentration sowie das Angriffsenzym (die Position innerhalb der Kette).

Die Reaktionsrate jeder beliebigen Reaktion  $i$  in dieser Kette kann durch den eben vorgestellten Geschwindigkeitsausdruck durch folgenden Term ausgedrückt werden:

$$v_i = \frac{\frac{V_{\max}^{\rightarrow}}{K_{ms}} [S_{i-1}] - \frac{V_{\max}^{\leftarrow}}{K_{mp}} [S_i]}{1 + \frac{[S_{i-1}]}{K_{ms}} + \frac{[S_i]}{K_{mp}}}$$

- $K_{ms}$  und  $K_{mp}$  sind hier die Michaelis-Konstanten des Enzyms der  $i$ -ten Reaktion in Bezug auf seine Substratkonzentration  $[S_{i-1}]$  bzw. seine Produktkonzentration  $[S_i]$
- $V_{\max}^{\rightarrow}$  und  $V_{\max}^{\leftarrow}$  sind die Maximalgeschwindigkeiten der Vor- und Rück-Reaktionen der Reaktion  $i$  mit

$$V_{\max}^{\leftarrow} = \frac{K_{mp} \cdot V_{\max}^{\rightarrow}}{q \cdot K_{ms}} \quad (2.1)$$

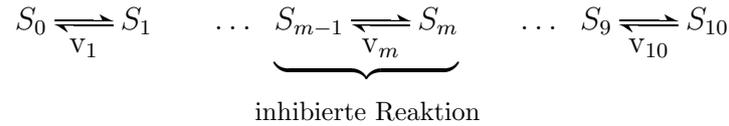
### 2.2 Inhibitionsterme

Als Inhibitoren werden die drei Standardmechanismen verwendet:

- a) Kompetitive Inhibition (hierbei konkurrieren Substrat und Inhibitor um den Bindungsplatz am Enzym)

- b) Unkompetitive Inhibition (Inhibitor bindet den Enzym-Substrat-Komplex)  
 c) Nichtkompetitive Inhibition (Inhibitor binden an freie oder gebundene Enzym)

Diese stören im Modellsystem gerade die  $m$ -te Reaktion, die von dem Enzym katalysiert wird:



Für den Fall einer Hemmung gelten in Abhängigkeit von der Inhibitionsart für die Reaktionsrate der inhibierten Reaktion die folgenden Definitionen:

$$v_m^{(k)} = \frac{\frac{V_{\max}^{\rightarrow}}{K_{ms}} [S_{m-1}] - \frac{V_{\max}^{\leftarrow}}{K_{mp}} [S_m]}{1 + \frac{[S_{m-1}]}{K_{ms}} + \frac{[S_m]}{K_{mp}} + \frac{[I]}{K_I}} \quad (\text{kompetitive Hemmung}) \quad (2.2)$$

$$v_m^{(nk)} = \frac{\frac{V_{\max}^{\rightarrow}}{K_{ms}} [S_{m-1}] - \frac{V_{\max}^{\leftarrow}}{K_{mp}} [S_m]}{\left(1 + \frac{[S_{m-1}]}{K_{ms}} + \frac{[S_m]}{K_{mp}}\right) \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad (\text{nichtkompetitive Hemmung}) \quad (2.3)$$

$$v_m^{(uk)} = \frac{K_I \left( \frac{V_{\max}^{\rightarrow}}{K_{ms}} [S_{m-1}] - \frac{V_{\max}^{\leftarrow}}{K_{mp}} [S_m] \right)}{K_I \cdot \left(1 + \frac{[S_{m-1}]}{K_{ms}} + \frac{[S_m]}{K_{mp}}\right) + [I] \left( \frac{[S_{m-1}]}{K_{ms}} + \frac{[S_m]}{K_{mp}} \right)} \quad (\text{unkompetitive Hemmung}) \quad (2.4)$$

Hierbei sind  $K_I$  die Gleichgewichtskonstante der Inhibitorbindung und  $[I]$  die Inhibitor-konzentration.

Die Einzelschritte Berechnung der Kontrollkoeffizienten auf Basis von Netzwerktopologie und Kinetik der Einzelschritte (Elastizitäten) sowie der Elastizitäten können im angehängten und kommentierten Mathematica-Programm detailliert nachvollzogen werden [siehe Anhang 1].

# Kapitel 3

## Die Simulation

### 3.1 Vereinfachtes Modell

Im ersten Teil der Untersuchung wird die Vereinfachung des Modells durch die Annahmen folgender Werte für alle Reaktionen erreicht:

$$V_{\max}^{\rightarrow} = 1 \quad q = 5 \quad (3.1)$$

$$K_{ms} = 1 = K_{mp} \quad (3.2)$$

Die Startwerte der Substratkonzentrationen werden linear absteigend von 0.9 (für  $S_1$ ) bis 0.1 für  $S_9$  gewählt. Die beiden äußeren Substrate  $S_0$  und  $S_{10}$  werden als externe Metabolite angesehen und konstant auf 1 bzw. 0 gesetzt. Zur zusätzlichen Kontrolle und zum Schutz vor numerischen Fehlern wurden die Summationstheoreme der metabolischen Kontrolltheorie benutzt.

$$\sum_k^r C_{v_k}^{J_j} = 1 \quad \sum_k^r C_{v_k}^{S_j} = 0 \quad (3.3)$$

Diese besagen, dass sich die Flusskontrollkoeffizienten eines Stoffwechselweges zu 1 aufaddieren, da sich die Enzyme die Kontrolle über den Fluss teilen. Die Konzentrationskontrollkoeffizienten eines Stoffes dagegen addieren sich zu 0, da die Metabolitenkonzentration eines Stoffes durch einige Enzyme gesenkt wird, und durch andere erhöht. Alle Berechnungen die diese Kriterien nicht erfüllen und um mehr als  $10^{-4}$  davon abweichen werden als fehlerhaft angesehen und herausgefiltert.

### 3.2 Simulationsergebnisse

Um herauszufinden ob ein Zusammenhang zwischen Position der Hemmung und Größe der Selektivitäten existiert, wurden nacheinander jede Position der Kette mit einer festen Inhibitorkonzentration und einer festen Inhibitorart gehemmt, und die neuen steady-state-Flüsse berechnet. Bei jeder Berechnung wird immer nur eine einzige Reaktion gestört. In Abhängigkeit von der Position, der gewählten Inhibitionsart und dessen Konzentration wurden die Selektivitäten berechnet und gegen die Position an der die Hemmung stattgefunden aufgetragen. Die Kombinationen der Inhibitorarten sind:

$$\text{Selektivität(unkomp/komp)} = \frac{C_i^J(\text{unkompetitiver Inhibitor}) \cdot \epsilon_i^J(\text{unkompetitiver Inhibitor})}{C_i^J(\text{kompetitiver Inhibitor}) \cdot \epsilon_i^J(\text{kompetitiver Inhibitor})}$$

$$\text{Selektivität(nichtkomp/komp)} = \frac{C_i^J(\text{nichtkompetitiver Inhibitor}) \cdot \epsilon_i^J(\text{nichtkompetitiver Inhibitor})}{C_i^J(\text{kompetitiver Inhibitor}) \cdot \epsilon_i^J(\text{kompetitiver Inhibitor})}$$

$$\text{Selektivität(unkomp/nichtkomp)} = \frac{C_i^J(\text{unkompetitiver Inhibitor}) \cdot \epsilon_i^J(\text{unkompetitiver Inhibitor})}{C_i^J(\text{nichtkompetitiver Inhibitor}) \cdot \epsilon_i^J(\text{nichtkompetitiver Inhibitor})}$$

Die Selektivität für Störungen mit kleinen Inhibitorkonzentrationen an den hinteren Po-

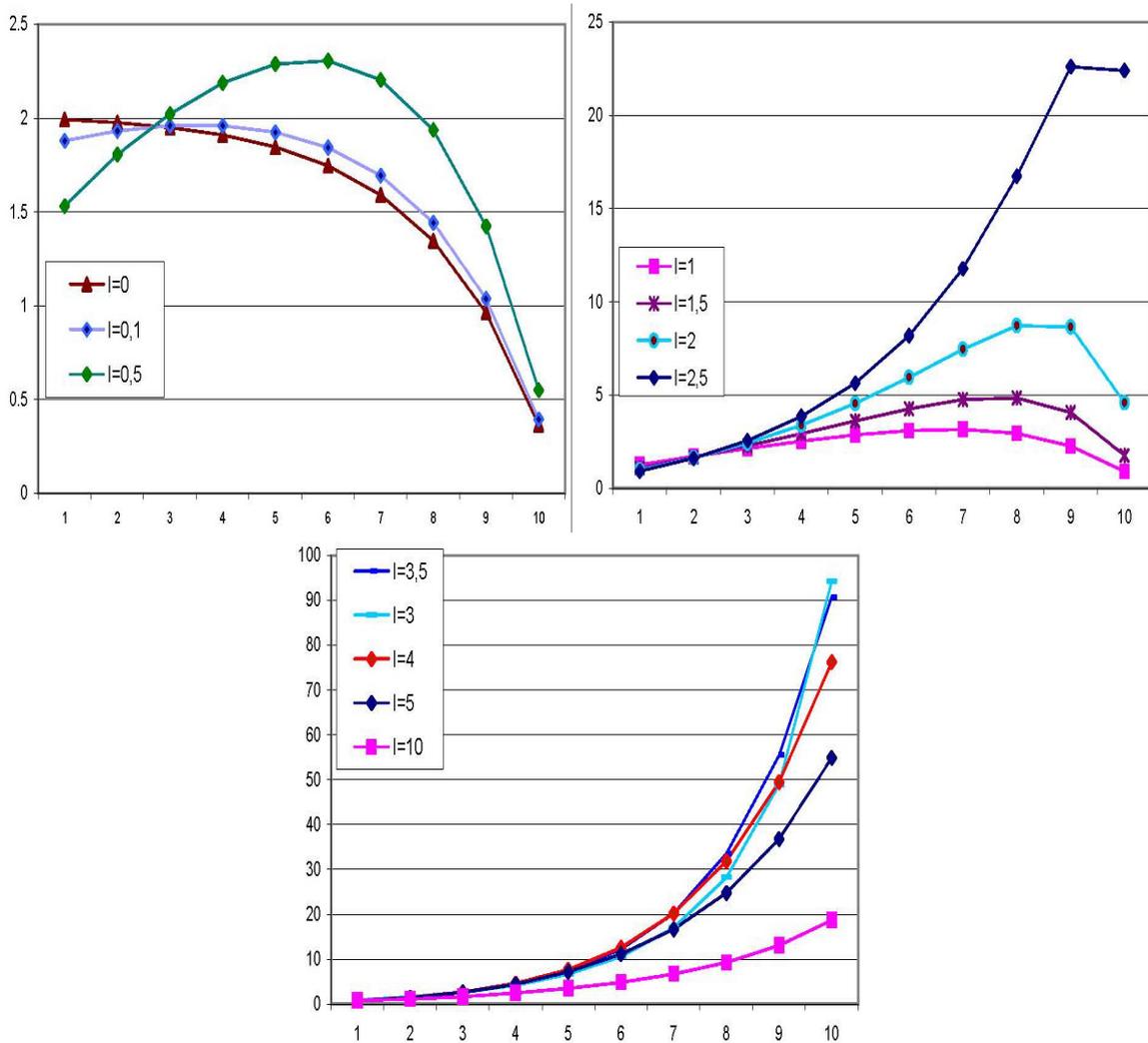


Abbildung 3.1: Selektivitäten(Unkomp/Komp) aufgetragen gegen die Positionen, an denen gehemmt wird bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen. Pro Kurve wurde die Inhibitorkonzentration konstant gehalten. Offensichtlich ist unkompetitive Inhibitor generell der stärkere.

sitionen ist deutlich geringer als an den vorderen. Mit zunehmender Konzentration des Inhibitors ändert sich aber das Verhalten: Bei Konzentrationen zwischen 0.3 und 2.5 kann die größte Selektivität durch Hemmung an mittleren Positionen erreicht werden. Je größer die Konzentration gewählt wird, desto weiter verschiebt sich das Maximum der Kurve nach hinten. Ab einer Inhibitorkonzentration von 2.5 sind die größten Selektivitäten ausschließlich durch Hemmung an einer der hinteren Positionen zu erreichen. Mit steigender Inhibitorkonzentration nimmt außerdem auch die Größenordnung der Selektivitäten zu und sie

kann Werte von bis zu 95 annehmen. Ab einer Inhibitorkonzentration von ca. 4 sinkt die Selektivität wieder, was dadurch erklärt werden kann, dass durch die extrem hohen Konzentrationen beide Flüsse fast vollständig gehemmt werden (totale Inhibition). Natürlich kann anhand dieser Grafiken nur ein ganz grober Überblick über die Tendenz gewonnen werden, da die Testwerte sehr grobmaschig sind. Evtl. können noch sehr viel höhere Selektivitäten bei Werten zwischen 3 und 3.5 erreicht werden, die hier übergangen werden. Der kompetitive Inhibitor ist also deutlich schwächer.

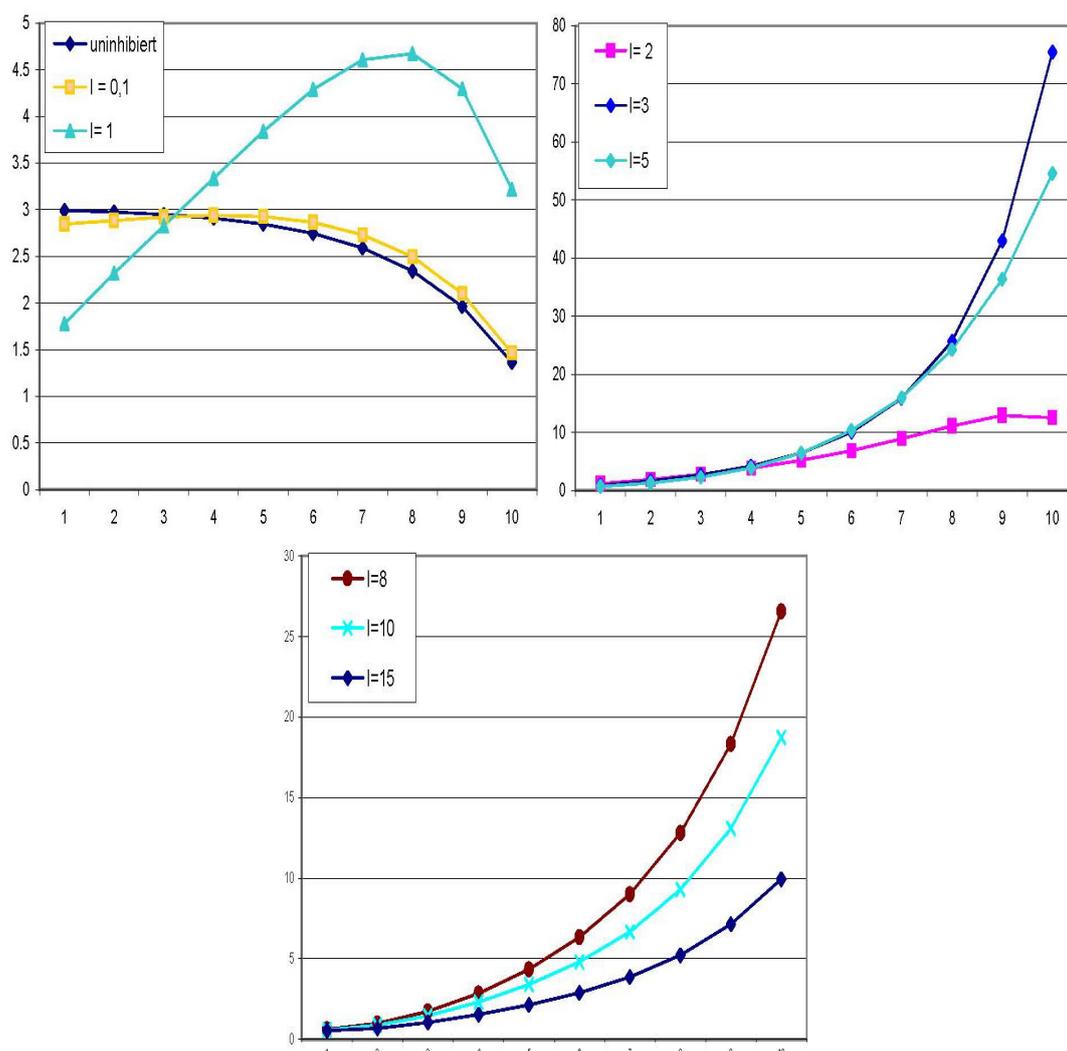


Abbildung 3.2: Selektivitäten(Nichtkomp/Komp) aufgetragen gegen die Positionen an denen gehemmt wird bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen. Pro Kurve wurde die Inhibitorkonzentration konstant gehalten.

Auch im Vergleich mit einem nichtkompetitiven Inhibitor ist der kompetitive Inhibitor unterlegen (siehe Abb. 3.2). Mit steigender Inhibitorkonzentration zeigen sich hohe Selektivitäten an hohen Positionen in der Reaktionskette. Mit steigender Inhibitorkonzentration steigt auch hier die Größenordnung der Selektivitäten. Der maximale Wert der gefunden wurde ist aber kleiner als der im Vergleich zum unkompetitiven Inhibitor. Dies kann

aber natürlich auch an der nicht lückenlosen Untersuchung liegen. Ab einer Inhibitor-konzentration von ca. 4 sinkt auch hier die Selektivität wieder aus dem gleichen Grund, der totalen Inhibition. Der Vergleich der beiden starken Inhibitoren miteinander (Abb.

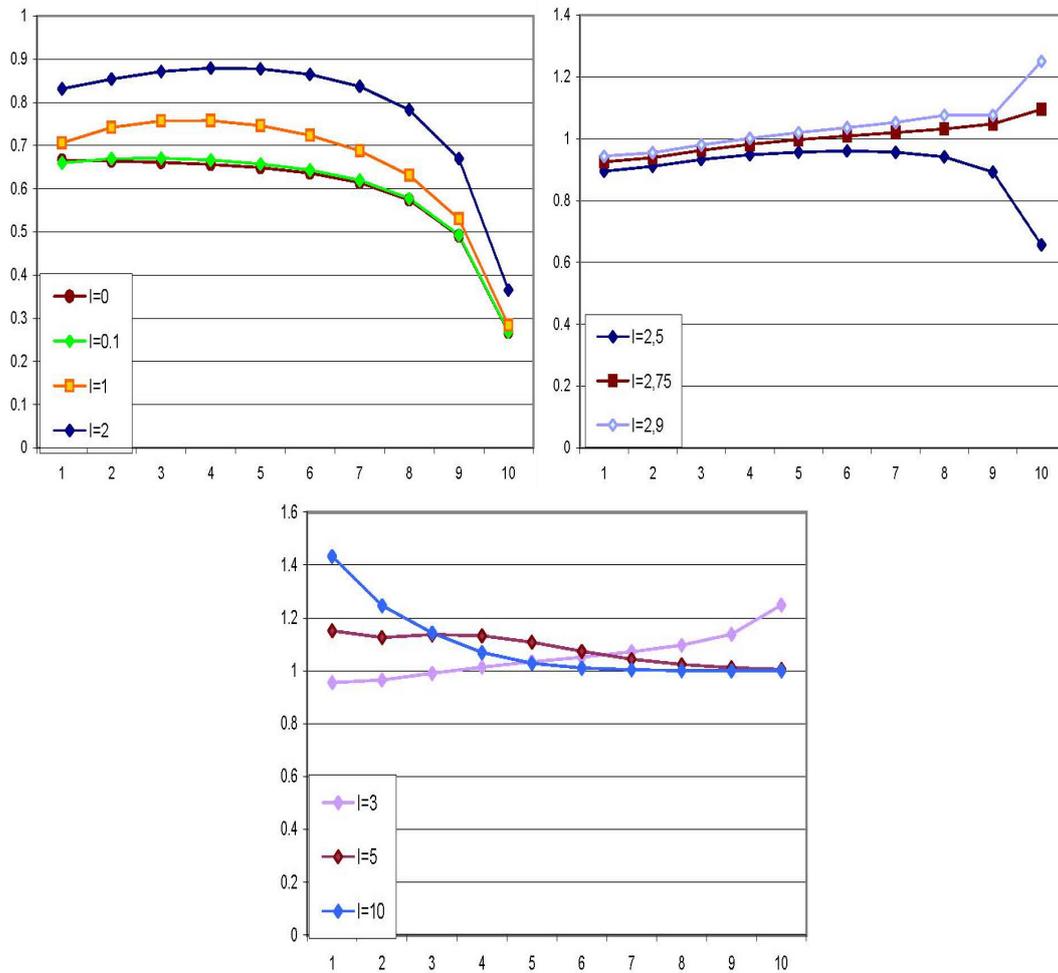


Abbildung 3.3: Selektivitäten(Unkomp/Nichtkomp) aufgetragen gegen die Positionen an denen gehemmt wird bei verschiedenen Inhibitor-konzentrationen. Pro Kurve wurde die Inhibitor-konzentration konstant gehalten.

3.3) lässt dagegen keine klare Tendenz erkennen. Bei kleinen Inhibitor-konzentrationen ist der nichtkompetitive der stärkere, besonders an den hinteren Positionen. Die Selektivität nimmt aber keine ausdrucksstarken Werte an. Bei größeren Konzentrationen (zwischen 2 und 3 ) bewegt sich die Selektivität bei Werten um 1, also wirken beide Inhibitoren in etwa gleich stark. Wird die Inhibitor-konzentration noch weiter erhöht, kann der unkompetitive Inhibitor an vorderen Positionen eine stärkere Flusserniedrigung bewirken. Da die Selektivität aber nur Werte zwischen 0.3 und 1.4 erreicht, sind die Unterschiede in der Effektivität der Inhibitoren nur sehr klein und unbedeutend.

Nun soll auf die Frage eingegangen werden ob Abhängigkeiten zwischen Konzentrationskontrollkoeffizienten und den Selektivitäten bestehen. Dazu werden die Selektivitäten für verschiedene Inhibitorkonzentrationen gegen die Anfangskonzentrationskontrollkoeffizienten der Produkte bzw. der Edukte aufgetragen (Abb.3.4). Beispielhaft wurden hier für

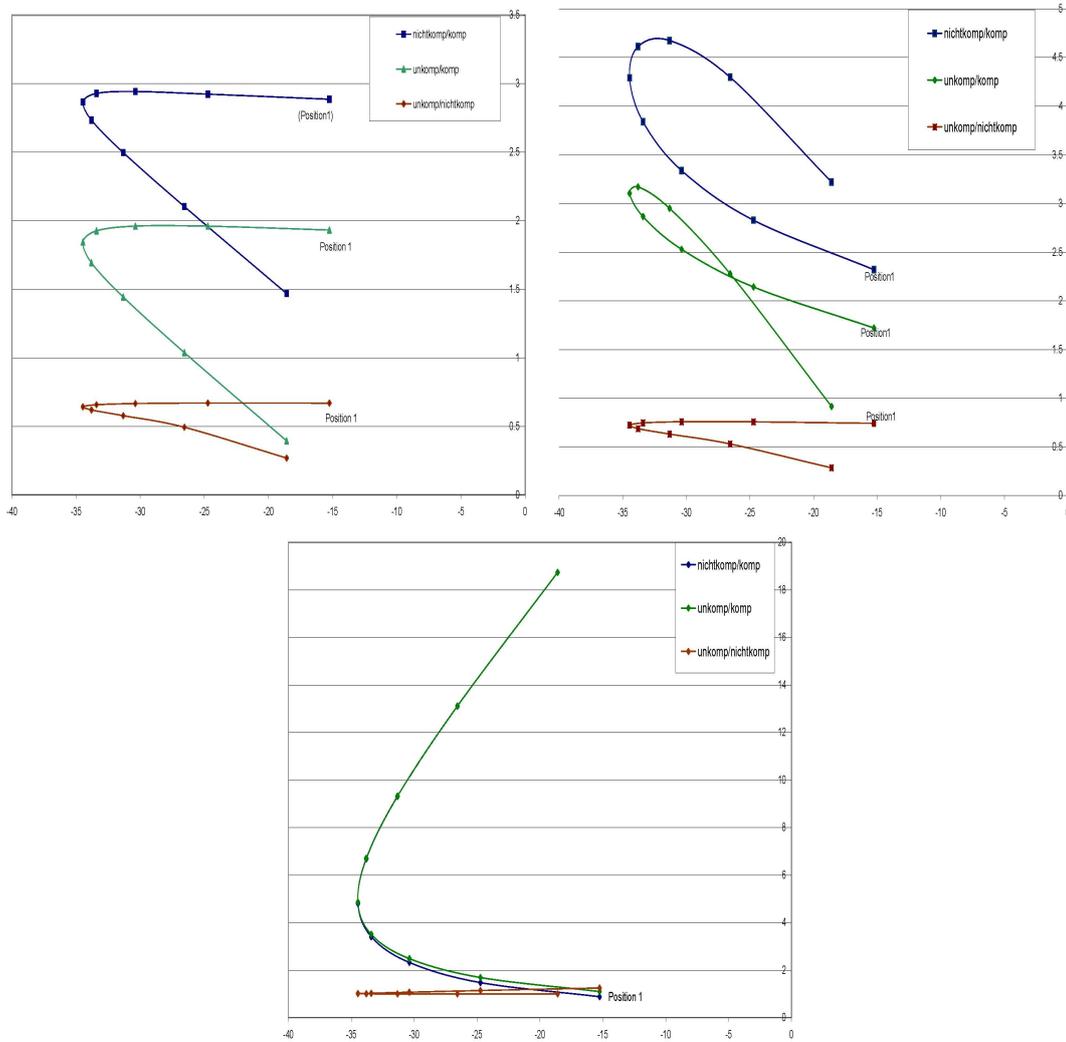


Abbildung 3.4: Selektivitäten gegen Anfangskonzentrationskontrollkoeffizienten der Edukte bei Inhibitorkonzentrationen von 0.1 (oben links); 1 (oben rechts); und 10 (unten)]. In jeder Grafik wurde nacheinander an jeder Position in der Kette einmal gehemmt. Die Selektivität die durch Hemmung an Position 1 erreicht werden kann ist jeweils markiert.

die Untersuchung drei verschiedene Inhibitorkonzentrationen gewählt: eine sehr geringe Konzentration von 0.1 eine mittlere von 1 und eine extrem große von 10.

Die Grafiken zeigen, dass die Konzentrationskontrollkoeffizienten der Edukte keine Aussage über die Größe der Selektivitäten erlauben, allerdings wird auch bei diesen Beispielen wieder deutlich dass der nichtkompetitive Inhibitor bei kleineren Inhibitorkonzentrationen der stärkste ist, während bei extrem hohen Konzentrationen nichtkompetitiver und

unkompetitiver Inhibitor in etwa gleiche Auswirkungen haben. Bei der Auftragung gegen

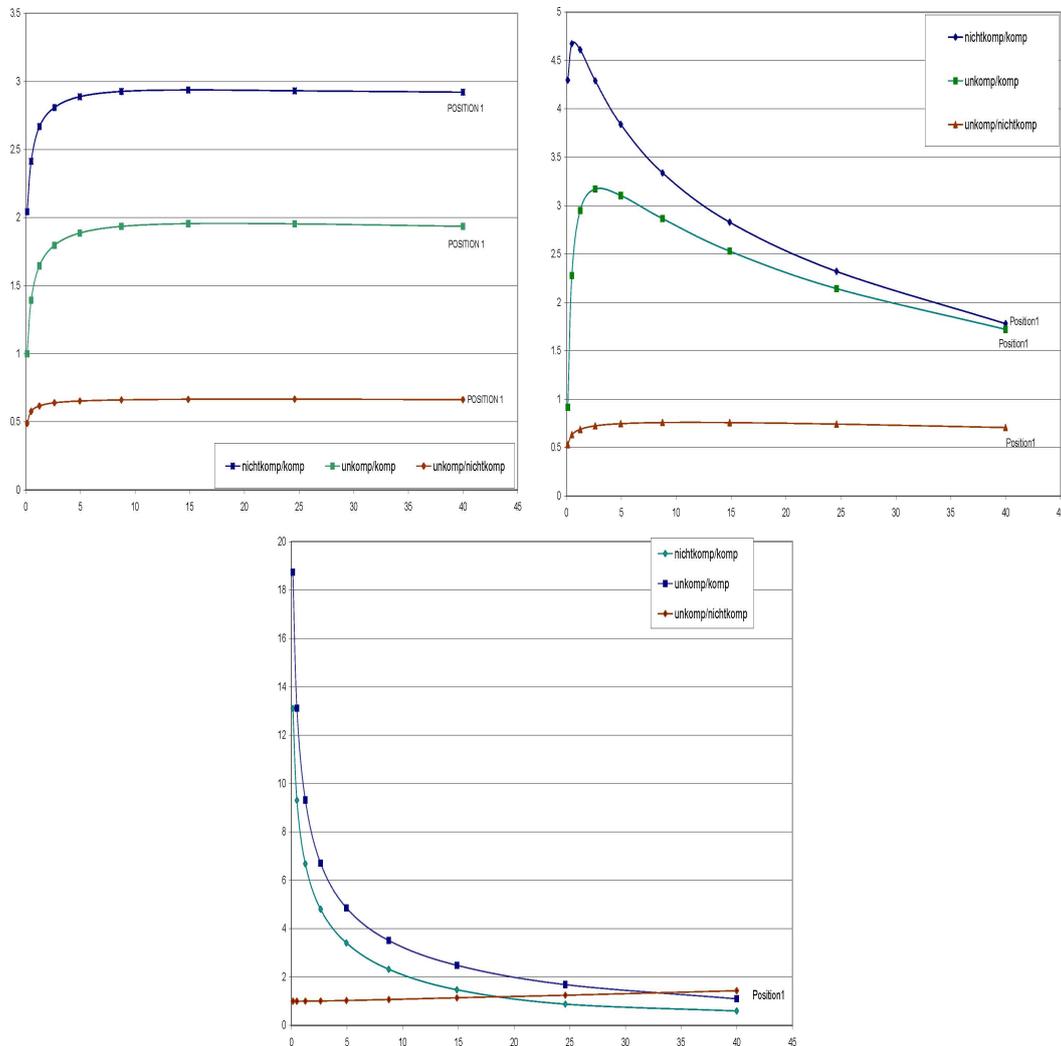


Abbildung 3.5: Selektivitäten gegen Anfangs-Konzentrationskontrollkoeffizienten der Produkte bei Inhibitorkonzentrationen von 0.1 (oben links); 1 (oben rechts); und 10 (unten links)]. In jeder Grafik wurde nacheinander an jeder Position in der Kette einmal gehemmt. Die Selektivität die durch Hemmung an Position 1 erreicht werden kann ist jeweils markiert.

die Konzentrationskontrollkoeffizienten der Produkte (Abb. 3.5) kann man folgende Aussagen festhalten: Bei geringen Inhibitorkonzentrationen steigen die Selektivitäten mit Zunahme der Konzentrationskontrollkoeffizienten. Bei sehr hohen Inhibitorkonzentrationen finden sich die hohen Selektivitäten ausschließlich bei kleinen Kontrollkoeffizienten. Dieses Verhalten ist dasselbe, was auch schon bei der Untersuchung der Abhängigkeit der Selektivität von der Position beobachtet werden konnte, und lässt sich damit erklären, dass die hinteren Positionen kleinere Konzentrationskontrollkoeffizienten besitzen. Daher ist das hier beobachtete Verhalten nur konsequent.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die auf unterschiedlichem Wege berechenbaren Selektivitäten identisch bzw. vergleichbar in Bezug auf Größenordnung und Verlauf als Funktion der Positionen sind. Dazu wurden zu verschiedenen Inhibitorkonzentrationen die

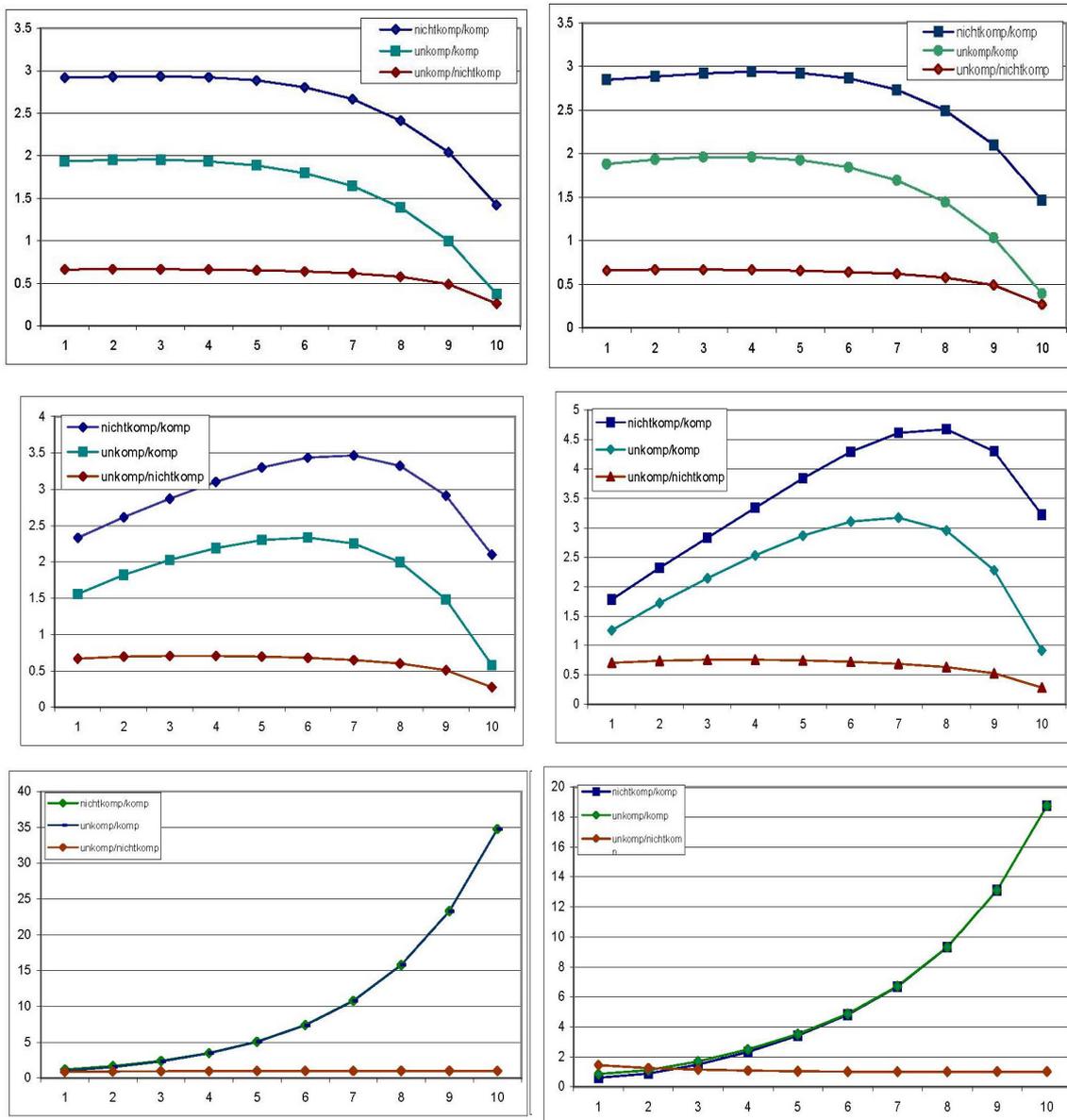


Abbildung 3.6: Selektivitäten berechnet aus den Flüssen (linke Spalte) und aus den Flusskontrollkoeffizienten (rechte Spalte) gegen die Positionen an denen gehemmt wurde bei Inhibitorkonzentrationen von 0.1 (obere Reihe); 1 (mittlere Reihe) ; und 10 (untere Reihe).

auf unterschiedliche Weise berechneten Selektivitäten gegen die Position aufgetragen und hier im Vergleich gegenübergestellt (Abb. 3.6). Man kann an Hand der Abbildungen ganz klar erkennen, dass beide Selektivitäten die absolut gleiche Tendenz haben. Für kleine Inhibitorkonzentrationen erhält man sogar fast identische Werte. Werden die Inhibitorkonzentrationen erhöht, weichen die Zahlenwerte allerdings voneinander ab.

### 3.3 Verallgemeinertes Modell

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die eben gemachten Aussagen für das spezielle Modell verallgemeinert werden können. Ausgegangen wird hierbei wieder von der lineare Kette 10 gekoppelter Reaktionen. Nun werden aber neben der InhibitorKonzentration auch die kinetischen Parameter  $K_{ms}$  und  $K_{mp}$  variiert. Als Programmiersprache wird hier Matlab verwendet. Da alles andere den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, werden hier nur folgende Punkte untersucht:

- a) Gilt die Aussage, dass die größten Selektivitäten durch Hemmung mit hoher InhibitorKonzentration an den hinteren Positionen der Kette erreicht werden können auch für andere Parameterkombinationen?
- b) Bei welchen InhibitorKombinationen und welchen Parametern kann das biologisch wichtige Inhibitionsverhältnis von

$$\frac{\text{mit Inhibitor}_1 \text{ gehemmter Fluß}}{\text{mit Inhibitor}_2 \text{ gehemmter Fluß}} = \frac{\frac{J^0 - 0.9 \cdot J^0}{J^0}}{\frac{J^0 - 0.1 \cdot J^0}{J^0}} \quad (3.4)$$

erzielt werden? (3.4) wird im Folgenden auch als Signifikanzkriterium der Flüsse bezeichnet.

Der Quellcode für dieses Programm kann unter [WWW.INF.FU-BERLIN.DE/~GERBER](http://WWW.INF.FU-BERLIN.DE/~GERBER) angesehen werden, als Ausdruck wäre er zu umfangreich.

Der prinzipielle Aufbau des Programms ist ähnlich dem Mathematica Programm [siehe Anhang]. Zur Berechnung der Nullstellen wurde das Levenberg-Marquardt-Verfahren gewählt, das unter Benutzung einer variablen Schrittweite zu gegebenen Startwerten die nächstgelegene Nullstelle findet. Die Schrittweite dieses Algorithmus hängt vom Gradienten im vorangegangenen Iterationsschritt ab: Bei kleiner Steigung ist die Schrittweite groß, bei großer Steigung jedoch klein. Auf diese Weise vermeidet man über ein lokales Minimum hinwegzugehen. ([Ger00], S.124). Dieses Verfahren wird in der Literatur als das im allgemeinen sinnvollste für nichtlineare lokale Optimierung biochemischer Stoffwechselwege angegeben. [Kel98]

Eine Implementation des Levenberg-Marquardt-Verfahrens bietet die Optimierungstoolbox von MATLAB bereits an, so daß das Verfahren nicht noch einmal realisiert werden mußte. Um zusätzliche numerische Fehler zu vermeiden, wurden die Jacobimatrix mit dem MAPLE-Kernel von MATLAB analytisch berechnet derart, dass das Simulationsprogramm in die jeweilige Formel nur noch einsetzt.

Bei der Simulation wurden diesmal Werte für  $K_{ms}$ ,  $K_{mp}$  und InhibitorKonzentration  $IK$  durch ein Monte-Carlo-Verfahren mit Bezug auf eine Gleichverteilung in den Grenzen

$$K_{ms} \in [0.001, 10]$$

$$K_{mp} \in [0.001, 10]$$

ausgewählt sowie für eine feinere Analyse

$$IK \in [0.001, 0.5] \quad \text{bzw.} \quad IK \in [1, 10]$$

Der Umfang jeder Monte-Carlo-Simulation betrug 10 000 Auswertungen. Diejenigen Parameter zu denjenigen Selektivitäten, die das Signifikanzkriterium der Selektivitäten

$$selectivity \geq 10 \tag{3.5}$$

erfüllten, wurden in einem dreidimensionalen Plot dargestellt. Darüberhinaus wurde die empirische Verteilung derjenigen Positionen aufgetragen, bei denen (3.4) erreicht wurde.

### 3.4 Simulationsergebnisse

Es wurden wieder die drei verschiedenen Inhibitorkombinationen in derselben Reihenfolge untersucht. Begonnen wird also mit Selektivitäten (Unkomp/Komp). Wie auch in dem Beispielmmodell aus Teil 3.3 zeigt, sich im Histogramm 3.13, dass bei kleinen Inhibitorkonzentrationen die hohen Selektivitäten vorzugsweise vorne zu finden sind. Auch die Aussage, dass eine Erhöhung der Inhibitorkonzentration zu einem Anstieg der Selektivitäten am Ende der Kette führt, kann hier belegt werden (Abb. 8b). Da das Intervall aber auch Inhibitorkonzentrationen von ca. 1 enthält sind natürlich auch noch viele hohe Selektivitäten an den vorderen Positionen zu finden. Um herauszufinden, an welchen Positionen die größten Selektivitäten zu finden sind, wurden aus diesen hohen Selektivitäten diejenigen herausgefiltert, die das Kriterium (3.4) erfüllen (siehe Abb. 9b). In den jeweils linken Abbildungen

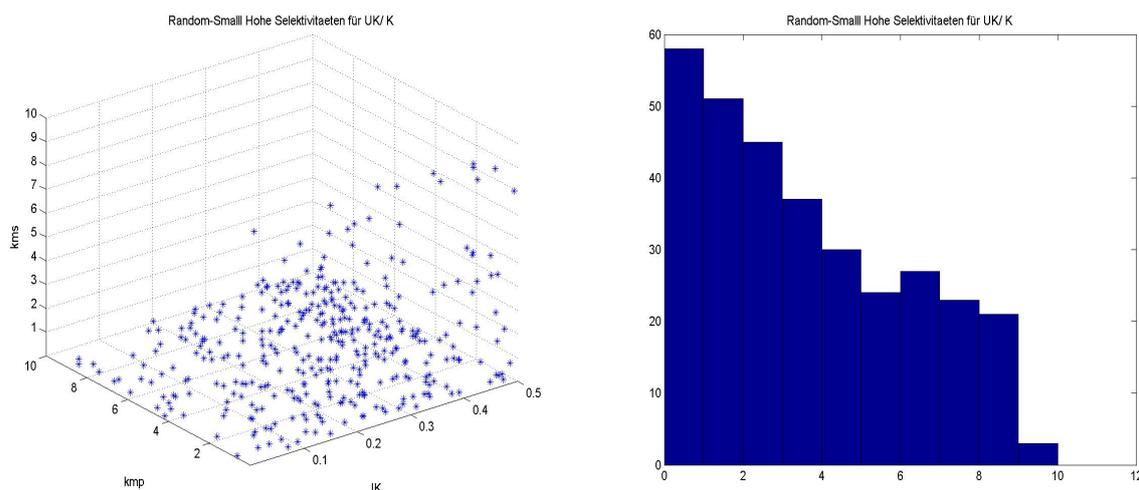


Abbildung 3.7: Die Abbildungen 7a und 7b zeigen Simulationsergebnisse mit Inhibitorkombination (Unkomp/Komp) bei geringen Inhibitorkonzentrationen.

in 3.7, 3.8 und 3.9 sind diejenigen Parameter eingetragen, die eine Selektivität größer 10 erzeugen. Die Parameter in 3.8 erfüllen zusätzlich das Kriterium (3.4). Auf der  $x$ -Achse

können die  $K_{mp}$ -Werte, auf der  $y$ -Achse die  $K_{ms}$ -Werte und auf der  $z$ -Achse die Inhibitor-konzentrationen abgelesen werden. Die jeweils rechten Grafiken in 3.7, 3.8 und 3.9 zeigen ein Histogramm dieses Simulationsexperiments. Für jede Position an der gehemmt wurde existiert ein Balken, der je nach Häufigkeit der gefundenen hohen Selektivitäten (größer 10) eine spezifische Höhe hat.

Für die in Abb. 3.9 gefundenen Selektivitäten gilt, dass der Fluss der durch den ersten Inhibitor (unkompetitiv) gehemmt wurde noch max. zu 10% vorhanden ist, und der Fluss, der durch den zweiten Inhibitor (kompetitiv) gehemmt wurde, ist noch zu min. 90% vorhanden. Hier zeigt sich im Histogramm ganz deutlich dass diese extrem hohen Selektivitäten ganz verstärkt an den Positionen 8, 9 und 10 entstehen wobei ausnahmslos der unkompetitive Inhibitor der stärkere ist Die Grafiken 3.7 und 3.8 zeigen außerdem, das unabhängig von der Inhibitor-konzentration die größten Selektivitäten fast ausschließlich bei kleinen  $K_{ms}$ -Werten gefunden wurden.

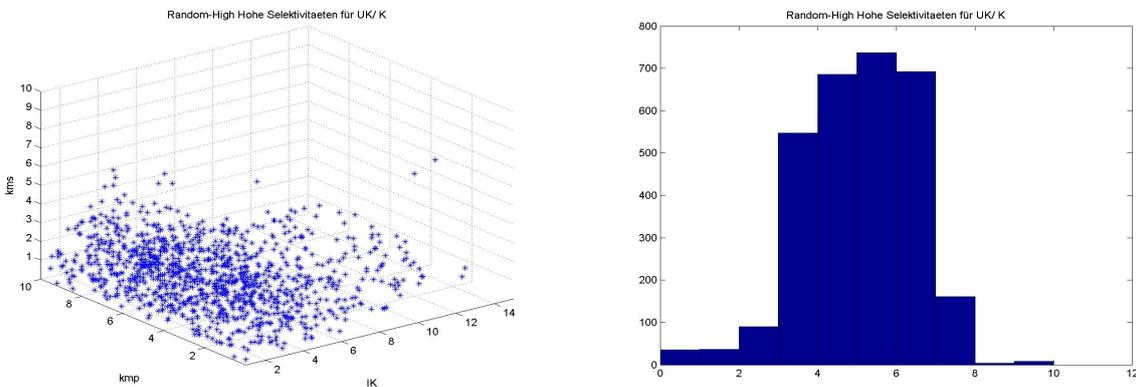


Abbildung 3.8: Die Abbildungen 8a und 8b zeigen Simulationsergebnisse mit Inhibitor-kombination (Unkomp/Komp) bei hohen Inhibitor-konzentrationen.

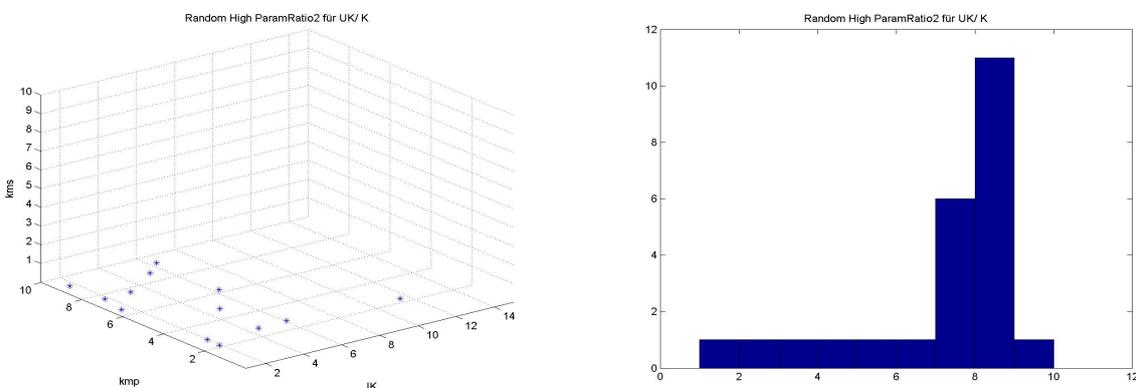


Abbildung 3.9: Die Abbildungen 9a und 9b zeigen Simulationsergebnisse mit Inhibitor-kombination (Unkomp/Komp) bei hohen Inhibitor-konzentrationen, die das Kriterium (3.5) erfüllen.

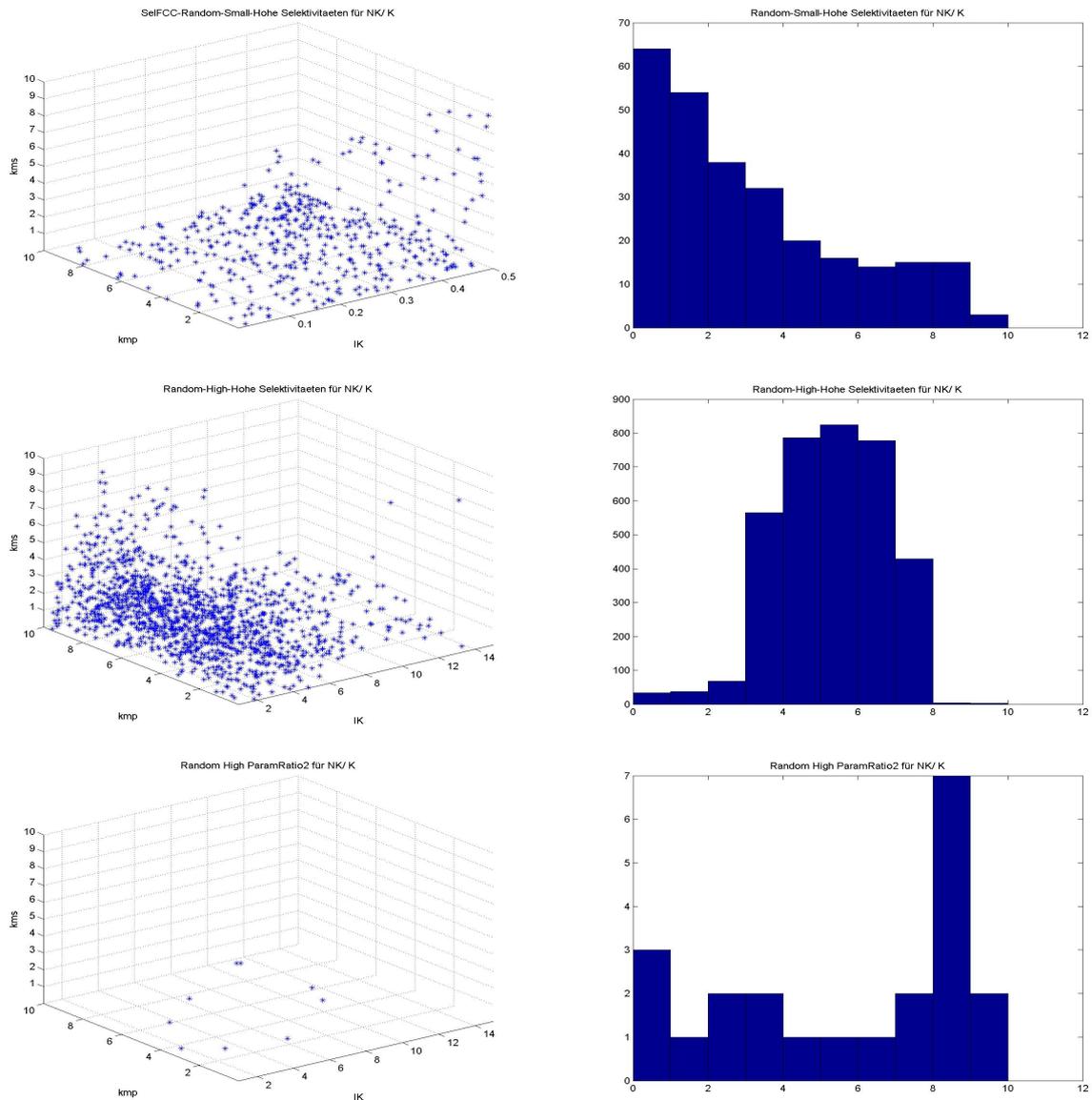


Abbildung 3.10: Simulation für Inhibition(Nichtkomp/Komp): Abb.10a und 10b zeigen Simulationsergebnisse für erfülltes Kriterium (3.5) bei geringen, Abb. 11a und 11b bei hohen Inhibitorkonzentrationen. Abb.12a und 12b zeigen Resultate für hohe Inhibitorkonzentrationen, die das Kriterium (3.4) erfüllen.

Betrachtet man die Selektivitäten (Nichtkomp/Komp) (Abb. 10-12) dann zeigt sich ein zu (Abb. 7-9) analoges Verhalten. Da die beiden Kombinationen auch im verallgemeinerten Fall in ihrem Verhalten sehr ähnlich sind, scheinen also unkompetitiver und nichtkompetitiver Inhibitor im Verhältnis zum kompetitiven Hemmer generell etwa gleichstark zu sein. Auch hier sind bei kleinen Inhibitorkonzentrationen die meisten großen Selektivitäten an den vorderen Positionen zu finden und entstehen gehäuft bei sehr kleinen  $K_{ms}$ -Werten. Bei großen Inhibitorkonzentrationen sind die größten Selektivitäten überwiegend in den hinteren Positionen zu finden.

Auch bei der letzten Inhibitor Kombination (Unkomp/Nichtkomp) zeigt sich das bereits in Teil 1 beobachtete Verhalten: Da die beiden Hemmstoffe wie gesagt in ihrer Effektivität in etwa gleich stark sind (der nichtkompetitive leicht stärker), konnten bei geringen Inhibitor Konzentrationen (Abb. 13) während der gesamten Simulation (10000 Auswertungen\* 10 Positionen) nur zwei Kombinationen gefunden werden, bei denen eine Selektivität  $\geq 10$  erreicht werden kann. Hierbei fällt auf, dass beide Werte an Position 10 gefunden wurden, im Spezialfall fielen die Selektivitäten aber bei geringer Inhibitor Konzentration an den hinteren Positionen deutlich ab. Da diese Werte aber durch ziemlich extreme Parameterkombinationen entstanden sind (Abb. 13a) können dies auch numerische Fehler sein. Selektivitäten, die das Kriterium (3.4) erfüllen, wurden nicht gefunden. Da bei den Simu-

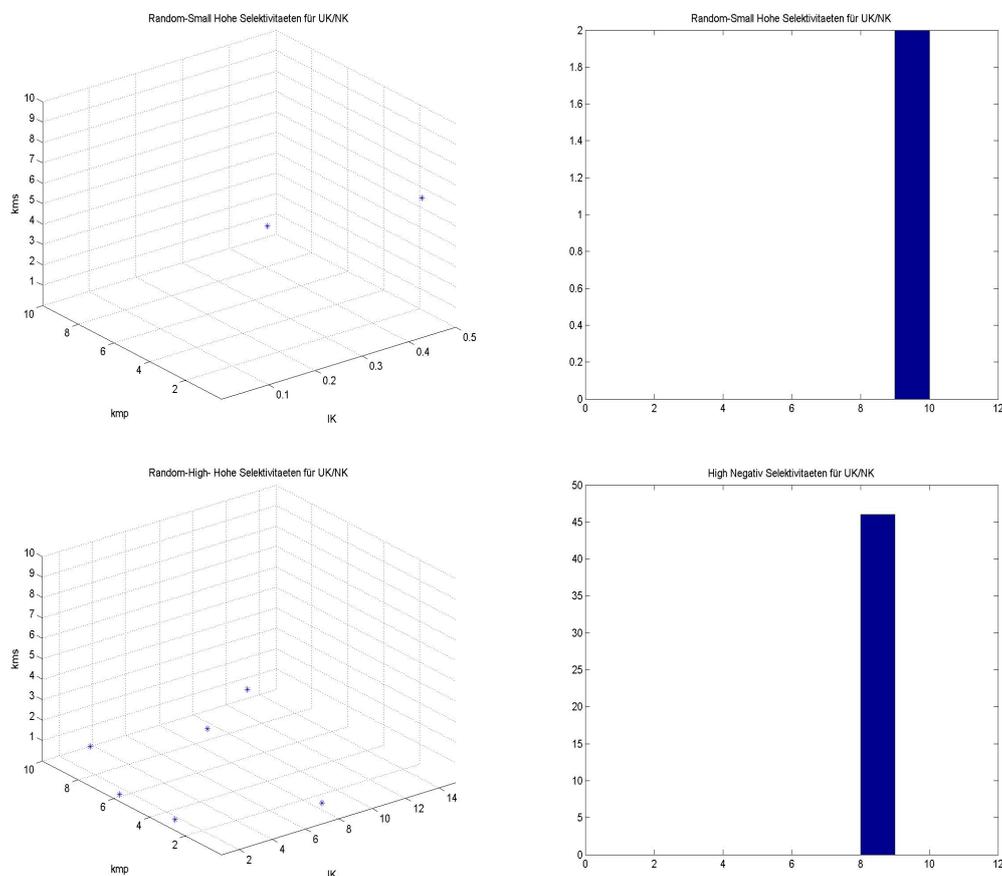


Abbildung 3.11: Abb.13a und 13b mit Inhibitor Kombination (Unkomp/Nichtkomp) zeigen Resultate bei geringen Abb. 14a und 14b bei hohen Inhibitor Konzentrationen. Daten in den linken Grafiken (13a, 14a) erfüllen das Kriterium (3.5).

lationen (Unkomp/Nichtkomp) auch sehr viele Werte zwischen 0 und 1 gefunden wurden (hier nicht gezeigt), wurde die komplette Simulationsreihe noch einmal für die umgedrehten Kombinationen ( Kehrwerte der Selektivitäten ) durchgeführt. Es werden nun also hohe Selektivitäten zugunsten des nichtkompetitiven Inhibitors gesucht. Abb. 15a und 15b zeigen , dass es davon sehr viele gefunden werden konnten, weswegen festgehalten werden

kann, dass der nichtkompetitive Inhibitor im allgemeinen sowohl bei geringen als auch bei hohen Inhibitorkonzentrationen deutlich der stärkste ist. Ausnahmslos wurden alle hohen Selektivitäten an den hinteren Positionen gefunden, es existieren allerdings auch hier aufgrund der ähnlichen Stärke der beiden Inhibitoren keine Parameterkombinationen, die das Kriterium (3.4) erfüllen. Auffällig ist bei Grafik 15a, dass nicht nur Bereiche im Parameterraum existieren, in denen gehäuft hohe Selektivitäten auftreten ( bei hohen Werten für  $K_{ms}$  und kleinen für  $K_{mp}$  ) sondern auch solche, in denen es gar keine zu geben scheint ( bei Kombination von hohen  $K_{mp}$ -Werten mit geringen  $K_{ms}$ -Werten). Bei einer Erhöhung der Inhibitorkonzentration scheinen die kinetischen Parameter etwas an Bedeutung zu verlieren und es können wesentlich weniger Kombinationen gefunden werden die die geforderten Selektivitäten größer 10 erzeugen.

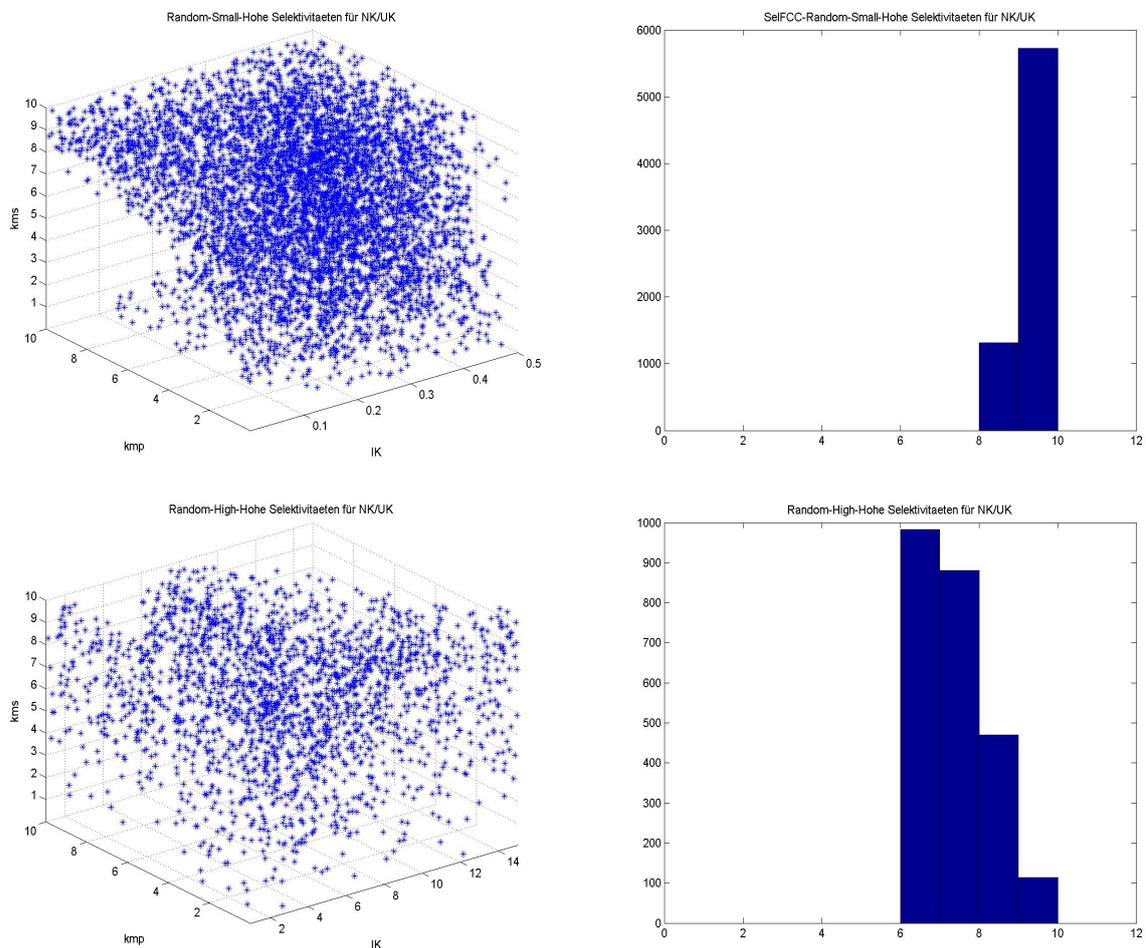


Abbildung 3.12: Simulationsergebnisse mit Inhibitor Kombination (Nichtkomp/Komp): Abb. 15 zeigt Resultate Für geringe, Abb. 16 für hohe Inhibitorkonzentrationen. In den linken Grafiken (Abb. 15a, 16a) sind jeweils die Parameter eingetragen, die Kriterium (3.5) erfüllen.

### 3.5 Einfluß der Konstanten $K_{ms}$ und $K_{mp}$

Da  $K_{ms}$ - und  $K_{mp}$ -Wert anscheinend einen sehr großen Einfluss auf die Selektivitäten haben soll in Teil 3.5 untersucht werden, welcher Zusammenhang zwischen dem Verhältnisse von  $K_{mp}$ -Wert,  $K_{ms}$ -Wert und der Größe der Selektivitäten besteht. Da die Kombinationen (Nichtkomp/Komp) und (Unkomp/Komp) wie erwartet wieder analoge Ergebnisse zeigten, wird hier stellvertretend für beide nur auf die Kombination (Nichtkomp/Komp) eingegangen. Als Parameter wurden hier folgende Werte gewählt :  $V_{\max}^{\rightarrow} = 1$ ,  $q = 5$ . Variiert wurden  $K_{ms}$  mit den Werten 0.05, 0.1, 1, 10  $K_{mp}$  mit den Werten 0.01, 0.1, 10 und Inhibitorkonzentrationen mit den Werten 0.01, 1, 10.

Abbildung 17 zeigt deutlich, dass bei geringen Inhibitorkonzentrationen  $[I] = 0.01$  mit steigendem  $K_{mp}$ -Wert die Selektivitäten vor allem an den vorderen Positionen massiv kleiner werden. Bei gleich bleibendem  $K_{mp}$  führt eine Erhöhung der  $K_{ms}$ -Werte ebenfalls zu einem generellen Absinken der Selektivitäten, aber weder  $K_{mp}$  noch  $K_{ms}$ -Werte haben einen Einfluss auf die Lage der größten Selektivitäten. Nach wie vor finden sich bei den geringen Inhibitorkonzentrationen die größten Selektivitäten an vordern Positionen. Abb. 17 und 18

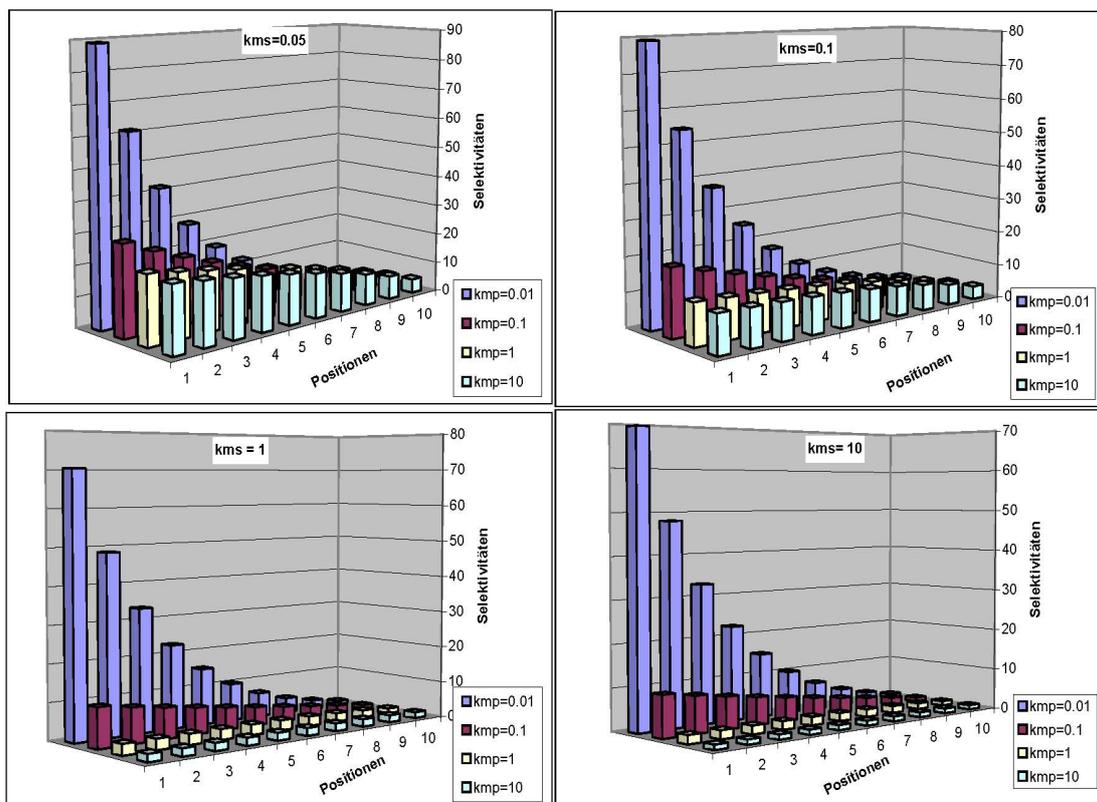


Abbildung 3.13: Aufgetragen sind die Selektivitäten (Nichtkomp/Komp) gegen die Positionen, an denen gehemmt wurde. Die Inhibitorkonzentration beträgt jeweils 0.01. Pro Grafik ist ein  $K_{ms}$ -Wert festgehalten und pro Simulationseihe werden jeweils die  $K_{mp}$ -Werte variiert.

zeigen die Ergebnisse der gleichen Simulation mit einer InhibitorKonzentration von 1 (3.13) und 10 (3.14) Bei minimalen  $K_{ms}$ - und  $K_{mp}$ -Werten ist das Verhalten noch dasselbe, wie schon bei Abb. 16 (die Selektivitäten sinken von vorne nach hinten) wobei die Selektivitäten allerdings deutlich kleiner sind als bei  $[I] = 0.01$ . Je größer nun der  $K_{mp}$ -Wert gewählt wird, desto kleiner werden die Selektivitäten am Anfang der Kette und umso größer werden sie am Ende. Eine Erhöhung des  $K_{ms}$ -Wertes (von 0.05 auf 0.1) scheint dieses Verhalten sogar noch zu verstärken: Die Selektivitäten werden an den vorderen Positionen noch kleiner, an den hinteren Positionen noch größer. Eine weitere Vergrößerung des  $K_{ms}$ -Wertes (1 oder 10) führt allerdings wieder zu kleineren Selektivitäten. Die Simulationsreihe mit  $K_{mp} = 0.01$  scheint dagegen weitgehend unbeeinflusst von einer Erhöhung des  $K_{ms}$ -Wertes zu sein. Einiges deutet auch darauf hin, das bei größeren InhibitorKonzentrationen Kombinationen bei denen der  $K_{ms}$ -Wert größer als der  $K_{mp}$ -Wert ist große Selektivitäten an den vorderen Positionen begünstigen, während  $K_{ms}$ -Werte kleiner als der  $K_{mp}$ -Wert zu großen Selektivitäten an den hinteren Positionen führen. Zusammenfassend kann man hier festhalten, dass bei geringen InhibitorKonzentrationen eine Erhöhung des  $K_{mp}$ -Wertes zu einer Erniedrigung der Selektivität führt. Auch eine Erhöhung des  $K_{ms}$ -Wertes verringert die Selektivität. Wird die InhibitorKonzentration erhöht (bei einem Wert zwischen 1 und 10) gibt es ein Selektivitäts-Maximum bei mittleren  $K_{ms}$ -Werten.

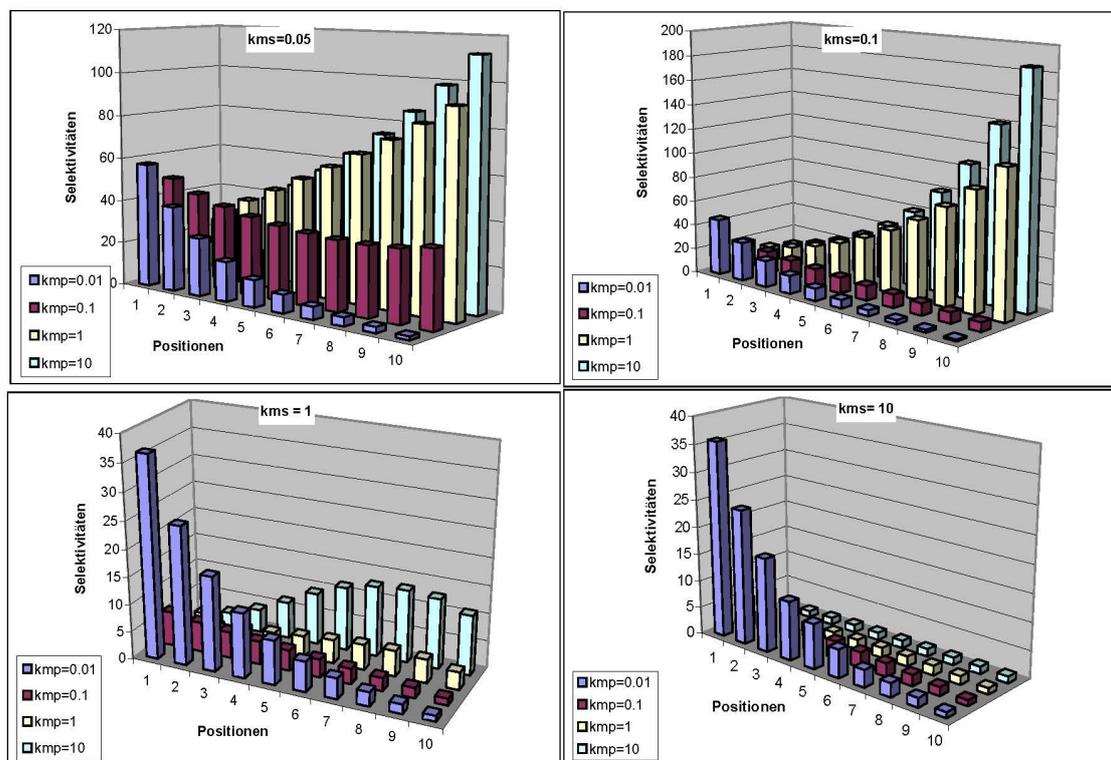


Abbildung 3.14: Aufgetragen sind die Selektivitäten (Nichtkomp/Komp) gegen die Positionen, an denen gehemmt wurde. Die InhibitorKonzentration beträgt jeweils 1. Pro Grafik ist ein  $K_{ms}$ -Wert festgehalten und pro Simulationsreihe werden jeweils die  $K_{mp}$ -Werte variiert.

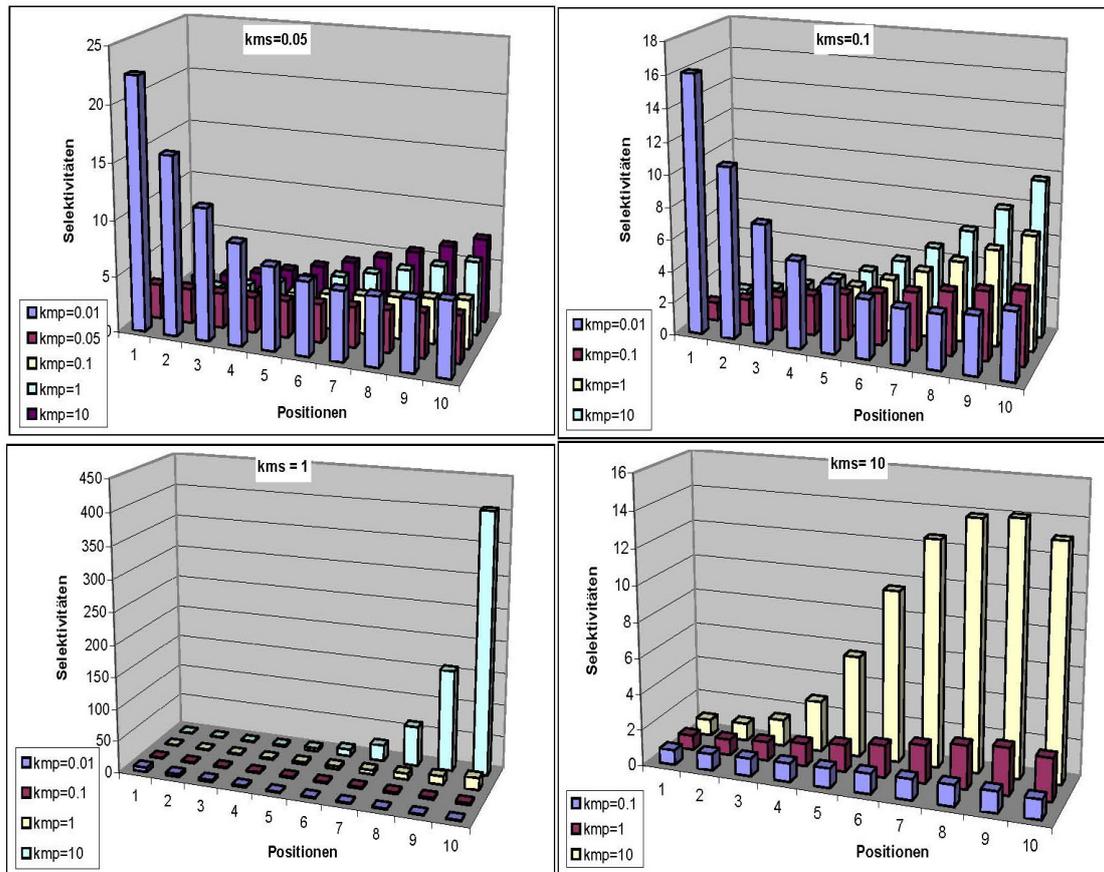


Abbildung 3.15: Aufgetragen sind die Selektivitäten (Nichtkomp/Komp) gegen die Positionen, an denen gehemmt wurde. Die Inhibitorkonzentration beträgt jeweils 10. Pro Grafik ist ein  $K_{ms}$ -Wert festgehalten und pro Simulationsreihe werden jeweils die  $K_{mp}$ -Werte variiert.

Die gleiche Simulation wurde mit der Kombination (Nichtkomp/Unkomp) durchgeführt (3.16). Exemplarisch wird eine Inhibitorkonzentration von 1 diskutiert. Eine Erniedrigung der Inhibitorkonzentration führt lediglich zu einem generellen Ansteigen der Selektivitäten und eine Erhöhung der Inhibitorkonzentration zu einem Absinken. (hier nicht gezeigt.) Eine Erhöhung des  $K_{mp}$ -Wertes führt zu deutlich kleineren Selektivitäten, während eine Erhöhung des  $K_{ms}$ -Wertes ein deutliches Ansteigen bewirkt. Damit lässt sich auch das beobachtete Verhalten in Abb.16a erklären: Je größer der  $K_{mp}$ -Wert, desto größer muß auch der  $K_{ms}$ -Wert sein um große Selektivitäten zu erzeugen. Bei hohen Inhibitorkonzentrationen bewirken beide Hemmer eine so große Störung des Systems, dass große Selektivitäten seltener werden.

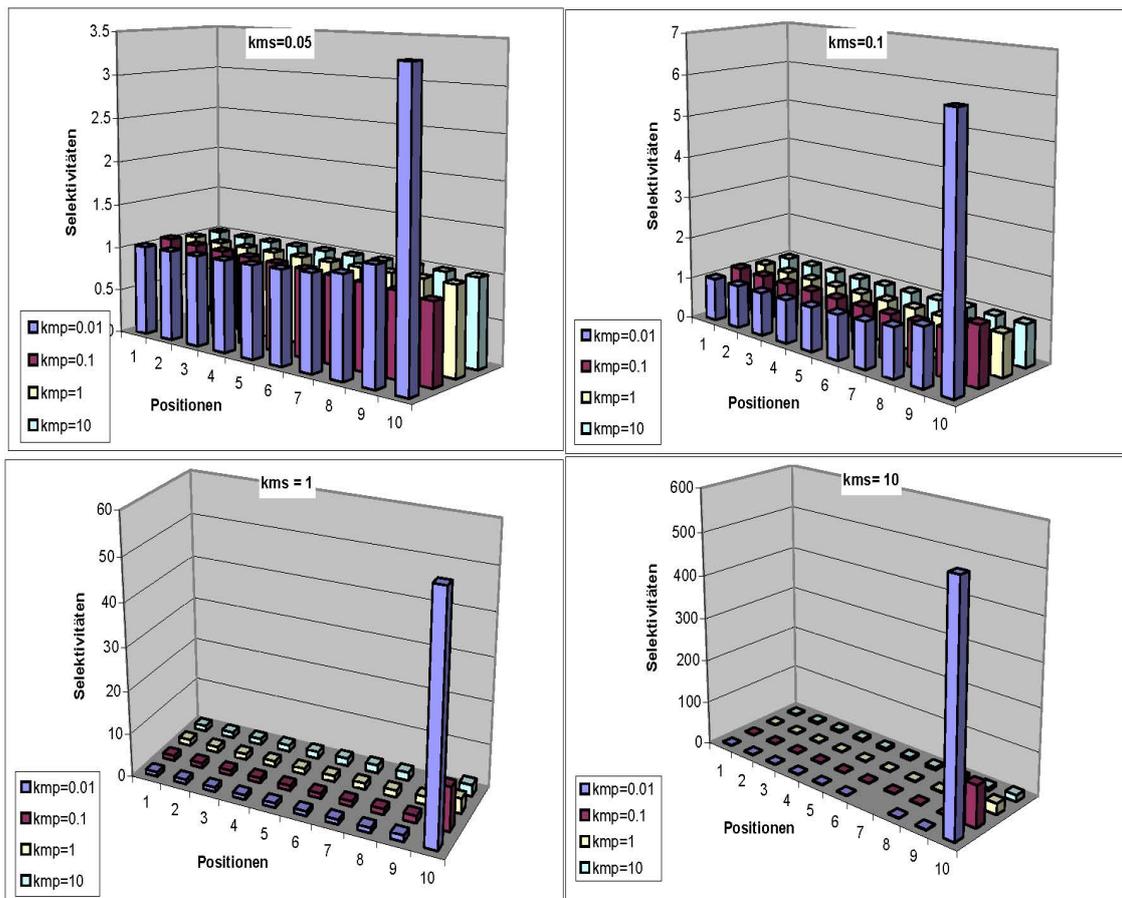


Abbildung 3.16: Aufgetragen sind die Selektivitäten (Nichtkomp/Komp) gegen die Positionen, an denen gehemmt wurde. Die Inhibitorkonzentration beträgt jeweils 10. Pro Grafik ist ein  $K_{ms}$ -Wert festgehalten und pro Simulationsreihe werden jeweils die  $K_{mp}$ -Werte variiert.



# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung

Bis auf wenige Ausnahmen ist der nichtkompetitive Inhibitor der stärkste Hemmer. Bei hohen Inhibitorkonzentrationen ist allerdings der unkompetitive etwa genauso stark. Am schwächsten ist eindeutig der kompetitive. Die Kombinationen (Nichtkomp/Komp) und (Unkomp/Komp) zeigen analoges Verhalten welches stark abhängig von der Inhibitorkonzentration ist.

#### I. Kombinationen (Nichtkomp/Komp) bzw. (Unkomp/Komp):

1. geringe Inhibitorkonzentrationen:
  - a) Die größten Selektivitäten sind an den vorderen Position zu finden.
  - b) Steigende Selektivitäten mit Zunahme der Konzentrationskontrollkoeffizienten der Produkte.
  - c) Sowohl die Verringerung der  $K_{ms}$ -Werte als auch eine Minderung der  $K_{mp}$ -Werte bewirkt einen Anstieg der Selektivitäten.
2. hohe Inhibitorkonzentrationen:
  - a) Die größten Selektivitäten treten gehäuft an den hinteren Positionen in der Kette auf.
  - b) Es existiert ein optimales Verhältnis zwischen  $K_{mp}$  und  $K_{ms}$  an dem die Selektivität ihr Maximum erreicht.
  - c) Die Selektivität steigt mit einer Abnahme der Konzentrationskontrollkoeffizienten der Produkte.

#### II. Kombination (Nichtkomp/Unkomp):

1. Die meisten und größten Selektivitäten erhält man bei geringen Inhibitorkonzentrationen.
2. Unabhängig von der Inhibitorkonzentration werden hohe Selektivitäten durch Parameterkombinationen begünstigt, bei denen der  $K_{ms}$ -Wert deutlich größer als der  $K_{mp}$ -Wert ist.

3. Parameterkombinationen, bei denen der  $K_{ms}$ -Wert sehr klein ist, können keine großen Selektivitäten hervorbringen.
4. Alle großen Selektivitäten befinden sich an den hinteren Positionen.

### III. Allgemeingültige Aussagen:

1. Die Konzentrationskontrollkoeffizienten der Edukte erlauben keine Aussage über die Größe der Selektivitäten.
2. Selektivitäten berechnet aus den Flüssen bzw. berechnet aus den Flusskontrollkoeffizienten zeigen die gleiche Tendenz. Bei kleinen Störungen haben sie fast identische Werte, je größer die Störung, desto weiter weichen die Werte voneinander ab.

## 4.2 Diskussion und Perspektiven

Um den realen Systemen wie z.B. der Glykolyse näher zu kommen soll im nächste Schritt das Modell derart erweitert werden, das nicht alle 10 Reaktionen dieselben Parameter haben, sondern bei der Randomisierung der Parameter für jede Reaktion einzeln die Parameter zufällig gemäß einer Gleichverteilung gewählt werden. So sollen im nächsten Schritt allgemeine Aussagen über Reaktionsketten mit 10 völlig unterschiedlichen Reaktionen gemacht werden, was biologischen Systemen wesentlich näher kommen würde. Das Problem hierbei ist der Unsegen der Dimensionalität. Selbst der äußerst vereinfachte Spezialfall dieser Arbeit wird durch 8 Parameter bestimmt. Sollen nun alle Reaktionen unterschiedliche Parameter erhalten, hätte man ein 73-dimensionales Optimierungsproblem zu beherrschen, was sicher nicht so ganz einfach wird. Ein weiterer Punkt, der dieses Vorhaben erschwert, ist die Tatsache, das das gebrochen rationale Polynom, von welchem bisher mit einem einfachen lokalen Optimierer die Nullstelle bestimmt wurde, nun keine eindeutige Nullstelle mehr haben muss (es sogar eher unwahrscheinlich wäre wenn diese existierte). Ob die mit einem Algorithmus aus der Klasse der Newtonverfahren errechnete Nullstelle dann eindeutig bzw. von biologischem Interesse ist, hängt folglich von den Werten der Parameter des Modells ab und kann nicht allgemein beantwortet werden.

Für das hier diskutierte Modell vereinfachte sich das Problem jedoch durch die Tatsache, daß die Parameter im uninhibierten Fall an jeder Position dieselben Werte annehmen und im inhibierten Fall die Inhibitorkonzentration nur an einer Position von Null verschieden ist. Daher kann man sich bei der Betrachtung des nicht-linearen Gleichungssystems, deren Nullstellen die neuen Flußgleichgewichte determinieren, im uninhibierten Fall auf ein Polynom 2-ten Grades und im inhibierten Fall auf zwei Polynome 2-ten Grades beschränken. Um dieses Problem zu lösen, muss man sich also Gedanken über einen für dieses Problem geeigneten globalen Optimierungsalgorithmus machen, oder gezielt nach solchen Parameterkombinationen suchen, bei denen das Polynom ein Konvexitätskriterium erfüllt, also eine eindeutige Nullstelle besitzt.

---

Ein weiteres Problem können die Rechenzeiten darstellen. Werden alle Parameter aller Reaktionen zufällig ausgewählt, dann reichen auf Grund der Vieldimensionalität die 10000 Auswertungen wie im hier betrachteten Modell auf keinen Fall aus um auch nur annähernd zuverlässige statistische Tendenzen beobachten zu können. Die numerische Nullstellenbestimmung ist nämlich sehr zeitaufwendig sein (der hier benutzten Algorithmus rechnet, z.B. so lange bis ein Minimum die Maschinengenauigkeit von MATLAB von  $10^{14}$  unterschreitet oder die maximale Anzahl von 1000 Iterationen erreicht ist und benötigt für die 10000 Auswertungen teilweise bis zu 10 Stunden) . Daher werden für zuverlässige Aussagen sicher enorme Rechenzeiten fällig. Aber trotz aller Probleme die gesehen werden können, soll hier als langfristige Perspektive die Ausweitung der Simulationen und Untersuchungen auf das bereits bestehende mathematische Modell der Glykolyse ([Wes97]) und der differentiellen Kontrollanalyse sein.



# Danksagung

Ich danke an dieser Stelle Dr. Edda Klipp für ihre große Geduld und Freundlichkeit im Verlauf der Anfertigung dieser Arbeit und die extrem schnelle Korrektur.

Berlin, April 2004



# Literaturverzeichnis

- [Bur73] Kacser / Burns. Titel. *Symp.Soc.Exp.Biologie*, 27:65–104, 1973.
- [Fel97] Fell, D. *Understanding the Control of Metabolism*. Portland Press, London, 1997.
- [Ger00] Gershenfeld, N. *The Nature of Mathematical Modelling*. Cambridge, 2000.
- [Kel98] Mendes, P. / Kell, D.B. Non-linear optimization of biochemical pathways: applications to metabolic engineering and parameter estimation. *Bioinformatics*, 14(10):869–883, 1998.
- [Kub91] Kuby, Stephen A. *Enzyme catalysis, kinetics and substrate binding. Mechanism of enzyme action*. CRC Press , Boca Raton, 1991.
- [Rap74] Heinrich, R. / Rapoport, T.A. Titel. *European Journal of Biochemistry*, 42:89–105, 1974.
- [Sch96] Heinrich, R. / Schuster. S. *The Regulation of Cellular Systems*. Chapman & Hall, New York, 1996.
- [Wes97] Bakker, B.M. / Michels, P.A.M. / Opperdoes, F.R. / Westerhoff, H.V. Titel. *Journal of Biological Chemistry*, 272(3207-325), 1997.
- [Wes02] Bakker, B.M. / Assmus, H.E. / Bruggeman, F. / Haanstra, J.R. / Klipp, E. / Westerhoff, H. Network-based selectivity of antiparaditic inhibitors. Technical report, Molecular Biology Report, 2002.