

Minimale Flussmoden als theoretisches Konzept für die funktionelle Analyse und modulare Beschreibung zellulärer Stoffwechselnetzwerke

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.
im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biotech. Sabrina Hoffmann

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:
Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hermann-Georg Holzhütter
2. Prof. Dr. Dr. h.c. Edda Klipp
3. Prof. Dr. Stefan Schuster

eingereicht am: 10.02.2011

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2011

Gewidmet all denen, die sich erlauben zu zweifeln.

Abstract

The metabolism of a cell consists of chemical transformations and transport processes. Their rates (*fluxes*) are the result of genetic, translational and metabolic control and therefore carry valuable information about the internal state of a cell. However, metabolic fluxes are hard to determine by experiment and are therefore subject of mathematical prediction methods.

In this work, a conceptually new method for the prediction of fluxes in large scale metabolic networks is developed. The method is based on the assumption of optimally evolved synthesis pathways that are regulated independently of each other. This enables organisms: (i) to quickly adapt to a varying and complex environment and (ii) to modularly organize its metabolism in order to restrict internal disturbances and damage to smaller subsystems. The core of this method is the prediction of optimal “synthesis-modules”: stationary flux modes, each of which synthesizes a single metabolite while minimizing or maximizing a so-called objective function. These so-called *minimal flux modes* (MinModes) are rapidly calculable without knowledge of enzyme kinetics. As such they are suited for the determination of the synthesis capacity and the set of blocked reactions of large networks. Linearly combined, they allow for the representation of complex metabolic tasks.

In contrast to previous approaches that optimize for the concerted accomplishment of complex metabolic tasks (e.g. biomass formation), optimizing single syntheses results in a rather suboptimal total network flux. However, with respect to available experimental data the prediction quality is comparable to previous (FBA) approaches. As major benefit, the method relies on a flexible structure that allows for the integration of diverse experimentally observed data. Here, incorporating free Gibbs-energy and metabolite concentration values enabled the prediction of thermodynamically feasible flux modes without prior restriction of flux directions.

Zusammenfassung

Der Stoffwechsel der Zelle besteht aus chemischen Reaktionen und Transportprozessen, deren Umsatzraten (*Stoffflüsse*) das Ergebnis genetischer, translationaler und metabolischer Kontrolle sind. Stoffflüsse erlauben daher wertvolle Einblicke in das interne Zellgeschehen, sind jedoch – wenn überhaupt – nur unter großem Aufwand experimentell bestimmbar. Ihre Vorhersage mittels mathematischer Modelle ist ebenfalls komplex; vereinfachend wird angenommen, der Stoffwechsel unterliege einer optimalen Regulation, wobei Optimalität vielfältig interpretiert wird.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur Flussvorhersage basiert auf der Annahme, dass sich die Synthesewege wichtiger Metabolite im Laufe der Evolution optimiert haben und unabhängig voneinander reguliert werden. Dies ermöglicht den Organismen: 1. sich einer variierenden Umgebung schnell anzupassen und 2. Störungen und Schäden auf kleinere Teilsysteme (*Module*) zu begrenzen. Kern der Methode ist die Vorhersage optimaler Synthese-Module: stationärer Flusszustände, die jeweils nur einen Metaboliten synthetisieren und dabei eine vorgegebene Zielfunktion minimieren oder maximieren. Diese minimalen Flussmoden (*MinModen*) sind schnell und ohne Kenntnis enzyspezifischer Parameter zu berechnen, womit sie sich auch zur systematischen Überprüfung der Synthesekapazität großer Netzwerke eignen.

Durch lineare Kombination der MinModen kann das Flussgeschehen komplexer Stoffwechselleistungen abgebildet werden. Hinsichtlich verfügbarer experimenteller Daten ist die Qualität der so gewonnenen Flussvorhersagen vergleichbar mit bisherigen Konzepten, und das, obwohl die Kombination optimaler Synthesen ein suboptimales Gesamtflussgeschehen ergibt. Vorteil der MinModen-Methode ist die flexible Integration zusätzlich verfügbarer Daten. So können beispielsweise durch Berücksichtigung freier Gibbs-Energien und recherchierter Metabolitkonzentrationsbereiche thermodynamisch zulässige Flusszustände vorhergesagt werden.

Vorwort

“The great ease with which molecular information can be collected on the genomes of higher organisms will tempt many. We can inevitably expect vast compendia of sequences but, without functional reference, these compendia will be uninterpretable, like an undeciphered ancient language. Many people and many computers will play games with these sequences, but we will have to find out by experiment what the sequences do and how the products they make participate in the physiology and development of the organism.” Sydney Brenner[21]

Der Begriff Systembiologie wurde erstmals im Jahr 2001 erwähnt; die Notwendigkeit, biologische Systeme ganzheitlich zu betrachten und zu verstehen, ist aber schon sehr viel länger bekannt[104]. Greifbar ist dieses Bestreben aber erst mit der Sequenzierung des Genoms und der Katalogisierung der einzelnen Systembestandteile geworden und innerhalb von 10 Jahren wurde der Begriff zum Schlagwort. Der Begriff "Systembiologie" überzeugt nicht nur – er motiviert und inspiriert auch! Denn neben der Notwendigkeit, bekräftigt er die Vision vom vollständigen Verständnis (und der vollständigen Kontrolle) über biologische Systeme.

*Schlagwort
und Vision*

All unser Wissen in den Kontext der genomischen Sequenz zu setzen, zu schauen, welchen Sequenzen wir eine Funktion zuordnen können und welchen nicht, um damit eine Grundlage zu schaffen, die es erlaubt komplexe Zusammenhänge sichtbar zu machen, war der nächste Schritt. In der funktionellen Genomannotation wurde daher in den letzten Jahren viel geleistet, um den gefundenen Genen eine entsprechende Funktion zuzuweisen[6, 7, 63]. Wie sich diese Funktion oder auch Dysfunktion auf Systemebene auswirkt, ist jedoch meist nicht klar und die Unklarheit sorgt immer wieder für Überraschungen, wie die Erfahrung auf dem Gebiet des Metabolic Engineering, der "Stoffwechselverfahrenstechnik", lehrt. In ihrem Bestreben, durch Umleiten interner Stoffwechselflüsse lebende Systeme so zu manipulieren, dass sie einen gewünschten Output liefern, sahen sich die Stoffwechselingenieure schon lange mit der Komplexität biologischer Systeme konfrontiert.

*Metabolic
Engineering als
methodischer
Vorreiter*

Da das Ziel dieser Manipulationen vornehmlich prokaryotische Nutzorganismen sind, hat deren Erforschung einen enormen Schub erfahren. Dennoch mussten die Ingenieure erkennen, dass selbst wenn alle Elemente des zellulären Netzwerks prinzipiell einer Manipulation zugänglich sind, es immer noch extrem schwierig ist einen bestimmten Stoffwechselfluss in gewünschter Weise (und dauerhaft) zu verändern. Wie Sydney Brenner, Nobelpreisträger für Physiologie und Medizin, bereits 1978 sagte, sind die perfekte Kontrolle und das Verstehen aller Einzelelemente im Netzwerk letztlich nicht ausreichend – es sind vielmehr die Interaktionen, die für den Weg vom Gen zum Genprodukt und vom Genprodukt zur Physiologie eines Organismus verantwortlich sind und die wir zusätzlich benötigen, um das System als Ganzes zu verstehen.

*Interaktionen
als Schlüssel
zum
Verständnis*

-
- Der Weg der Systembiologie* Durch groß-angelegte Datenerhebung, Datenbanken und mathematische Modelle versucht die Systembiologie diese Interaktionen herauszufinden. Entwickelt wurden daher vornehmlich neue Technologien, insbesondere Hochdurchsatzverfahren, die es erlauben, automatisiert eine große Anzahl von Messdaten zu erheben; umfangreiche Datenbanken, die das Sammeln, Verwalten und idealerweise Aufbereiten der Daten ermöglichen; und mathematische Methoden und Modelle für die Analyse und Auswertung der Daten.
- Übergeordnete Prinzipien* Um die riesige Flut an Informationen zu verarbeiten, ist die Suche nach übergeordneten Prinzipien, die es erlauben das Geschehen von einer anderen Ebene aus zu betrachten, aktueller denn je. Für das Verständnis des Stoffwechsels und das Begreifen der Bedeutung seiner einzelnen Komponenten und Interaktionen für das Gesamtgeschehen, ist es neben der Aufschlüsselung der zu erbringenden Stoffwechselleistungen daher wichtig, zu untersuchen, vor welchem Hintergrund diese Leistungen erbracht werden müssen, d.h. nicht nur was hergestellt werden muss, sondern wie dessen Synthese organisiert sein muss, welche Leitmotive und grundlegende Eigenschaften die Flüsse des Stoffwechsels dirigieren.
- Flussbilanzanalyse* Für die Analyse großer Stoffwechselnetzwerke ist man dazu übergegangen, Optimierungskriterien zur Vorhersage der Stoffwechselflüsse zu verwenden. Die Frage nach einem geeigneten Kriterium für zelluläre Optimalität berührt dabei eine Grundsatzfrage, deren Beantwortung durchaus komplex ist und nicht im Rahmen dieser naturwissenschaftlichen Dissertation liegt. In dieser Arbeit beschreibe ich vielmehr einen möglichen Weg und schildere die Aussichten, die sich dabei (auf Basis theoretischer Rechnungen) ergeben. Dabei wird die Möglichkeit einer modularen Stoffwechselorganisation berücksichtigt und die damit verbundene Existenz suboptimaler Lösungen diskutiert.
- Dank* Bevor ich nun den Leser in das erste Kapitel entlasse, gilt mein aufrichtiger Dank all den Korrektoren, die mit ihrer ehrlichen Kritik mich sehend machten, was ich zuvor übersah und damit entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Biologische Grundlagen	1
1.1.1	Die (robuste) Architektur zellulärer Reaktionsnetzwerke	1
1.1.2	Bedeutung des Stoffwechsels für physiologische Zellfunktionen	3
1.1.3	Kinetik und Thermodynamik von Reaktionsnetzwerken	4
1.1.4	Regulation des Stoffflusses durch Enzyme	7
1.2	Rekonstruktion, Analyse und Modellierung	8
1.2.1	Experimentelle Datengrundlage	10
1.2.2	Rekonstruktion metabolischer Netzwerke	12
1.2.3	Analyse, Validierung, Evaluierung	15
1.2.4	Kinetische Modelle	16
1.2.5	Strukturelle Modellierung	18
1.2.6	Die Flussbilanzanalyse	22
1.3	Zielstellung dieser Arbeit	25
2	Das Konzept minimaler Flussmoden	27
2.1	Einleitung	27
2.2	Anwendung: Wachstum von <i>M. extorquens</i> auf Methanol	29
2.3	Ergebnisse	34
2.4	Diskussion	39
3	Einbeziehung thermodynamischer Informationen in die Flussvorhersage	43
3.1	Einleitung	43
3.1.1	Abschätzung der Standard-Gibbs-Energie	43
3.1.2	Berücksichtigung der Thermodynamik in der Flussvorhersage	44
3.1.3	Konzept der TR-Flussminimierung	45
3.2	Anwendung: Wachstum von <i>E.coli</i> auf Glucose	48
3.2.1	Aufstellen des FBA-Modells	52
3.3	Ergebnisse	57
3.3.1	Effektive Reversibilitätseinschränkungen	57
3.3.2	Evaluation unterschiedlicher Flussvorhersagen	60
3.3.3	Varianz berechneter Metabolitkonzentrationen	63
3.4	Diskussion	67
4	Funktionelle Netzwerkbeschreibung und Netzwerkkonsistenz	71
4.1	Einleitung	71
4.2	Anwendung: Wachstum von <i>Escherichia coli</i> auf verschiedenen Medien	73
4.3	Ergebnisse	75
4.4	Diskussion	78

5 Vorhersage von Flussänderungen	81
5.1 Einleitung	81
5.1.1 Beispiel optimaler Enzymkonzentrationsänderung	82
5.1.2 Lösungsansatz	84
5.2 Anwendung: Wachstum von <i>E.coli</i> auf Glucose	87
5.2.1 Annahmen zur Einbindung der experimentellen Daten	89
5.3 Ergebnisse	91
5.4 Diskussion	95
6 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	103
Zusatzinformationen	109
1 Theoretische Grundlagen	109
1.1 Das Lösen von Optimierungsproblemen	109
1.2 Geschichte der Flussbilanzanalyse	110
2 Hintergrundinformationen zum 3.Kapitel	111
2.1 Erweiterung des <i>E.coli</i> -Modells von Schütz <i>et al.</i>	111
2.2 Annahmen im Modell von Ishii <i>et al.</i>	114
2.3 Gibbs-Energie von protonengetriebenen Membranprozessen	115
3 Erstellung des im 4.Kapitel verwendeten <i>E.coli</i> -Modells	116
4 Implementierung der Korrelationsmaximierung (5.Kapitel)	118
Zusätzliche Tabellen	121
Glossary	147
Literaturverzeichnis	148
Danksagung	170
Selbstständigkeitserklärung	172

Abbildungsverzeichnis

1.1	Beispiel für das intelligente Umschalten zwischen optimalen Zuständen	2
1.2	Architektur eines robusten Systems	3
1.3	Illustration von Stofffluss, Energiefluss und Informationsfluss	4
1.4	Änderung der Gibbs-Energie in Abhängigkeit der Reaktionslaufzahl ξ	6
1.5	Zusammenhang: Enzymmenge, Substratkonzentration und Stofffluss	9
1.6	Bestimmbarkeit interner Stoffflüsse mittels MFA	10
1.7	Experimentelle Bestimmung von systembiologisch wichtigen Größen.	13
1.8	Iterativer Modellierungsprozess	16
1.9	Illustration der Michaelis-Menten-Kinetik	17
1.10	Modellierungsstrategie: Beschränken und Auswählen	20
1.11	Vergleich: Elementarmode, Extreme Pathway und Generierende Mode	21
2.1	Schematische Darstellung des Stoffwechselmodells von <i>M. extorquens</i>	35
2.2	Zerlegung der globalen, flussminimierten Lösung in 21 Elementarmoden	35
2.3	Glycin-MinMode mit entsprechenden Flusswerten für aktive Flüsse	36
2.4	Häufigkeit von Reaktionen in den 17 MinModen	37
2.5	Vergleich: globale Optimierung und MinModen-Kombination	38
2.6	Vergleich der Flussvorhersagen mit experimentell bestimmten Flüssen	38
2.7	Beispielnetzwerke zur Veranschaulichung des Netzwerkeffektes	41
3.1	Prinzip der Berücksichtigung von Metabolitkonzentrationen	47
3.2	Metabolitkonzentrationen in Abhängigkeit der Durchflussgeschwindigkeit	49
3.3	Experimentell bestimmte Flussverteilung (Ishii <i>et al.</i>)	50
3.4	Anzahl reversibler Reaktionen innerhalb der MinModen-Berechnungen	58
3.5	Definition von Flussverhältnissen an Verzweigungspunkten	61
3.6	Vergleich von vorhergesagten mit experimentellen Flussverhältnissen	62
3.7	Vergleich der Austauschrate: Vorhersagen vs. Experiment	63
3.8	Vorhersagen für Metabolitkonzentrationen in einzelnen Minimalmoden	64
3.9	Illustration des TR-Algorithmus	66
4.1	Blockierte Reaktionen und Eigenschaften der beteiligten Metabolite	73
4.2	Synthetisierbarkeit von Metaboliten (Annahme: Komplexmedium)	76
4.3	Charakteristika der 18 reduzierten Flussmodelle	77
5.1	Minimalmodell zur Veranschaulichung optimaler Stoffwechselregulation	82
5.2	Vorteil optimal angepasster Enzymkonzentration bei erhöhtem Bedarf	83
5.3	Anpassung der Enzymkonzentration	84
5.4	Interpretation von Flussdifferenzen	85
5.5	Der Korrelationskoeffizient in Abhängigkeit der Wahl des Parameters φ	93
5.6	Vergleich experimenteller und vorhergesagter Flussdifferenzen	96
5.7	Syntheseraten der Zielmetabolite und verwendete α_i	97
5.8	Häufigkeit des Glykolyse-Anteils in den einzelnen MinModen-Sets	100
5.9	Vergleich: Flussdifferenzen und Enzymkonzentrationsänderungen	102

1	Mögliche Anzahl optimaler Lösungen	109
2	Geometrische Lösung eines 2D Optimierungsproblems	110

Tabellenverzeichnis

1.1	Mögliche Optimierungskriterien	24
2.1	Das Zentralstoffwechselmodell von <i>M. extorquens</i>	31
3.1	Untersuchte Einflussgrößen und Rechnungsvarianten	51
3.2	Zusätzliche Nebenbedingungen bei globaler Optimierung	51
3.3	Reaktionsschema des reduzierten E.coli-Modells	54
3.4	Vergleich von Richtungseinschränkungen: Literatur vs. TR-Konzept . .	59
3.5	Vergleich von Metabolitkonzentrationen: Vorhersage vs. Experiment . .	65
4.1	Anzahl blockierter Reaktionen in den 18 Flussmodellen	75
5.1	Durchgeführte Testrechnungen und untersuchte Einflussfaktoren	91
5.2	Anzahl repräsentativer MinModen versus gesamter MinModen	91
5.3	Korrelation von Flussänderungen: Vorhersage vs. Experiment	94
1	Zielmetabolite im Modell von E.coli	115
2	Zulässige Metabolitkonzentrationsbereiche (hard bounds, 4.Kapitel) . .	121
3	MinModen im Stoffwechselmodell von <i>M. extorquens</i> (Kapitel 2)	124
4	Änderung und Anpassung des Modells von Schütz <i>et al.</i>	125
5	Überarbeitete Genzuordnung des Modells von Schütz <i>et al.</i>	126
6	Reaktionsschema des Gesamtmodells (3.Kapitel)	129
7	Metabolite im Gesamtmodell (4.Kapitel)	131
8	Genzuweisungen im reduzierten Modell (3.Kapitel)	132
9	Zulässige Konzentrationsbereiche (hard bounds) (3.Kapitel)	133
10	Tolerierte Konzentrationen (soft bounds) und Sollwerte (Ishii <i>et al.</i>) . .	134
11	MinModen der Metabolite 3pg, accoa und akg	135
12	MinModen der Metabolite e4p und f6p	136
13	MinModen der Metabolite pep, pyr und oaa	137
14	MinModen der Metabolite g6p und nadph	138
15	MinModen der Metabolite g3p und r5p	139
16	Linearkombination flussminimierter MinModen (GR03, 3.Kapitel) . . .	140
17	Linearkombination zielwertmaximierter MinModen (GR03, 3.Kapitel) .	141
18	Linearkombination flussminimierter MinModen (GR04, 3.Kapitel) . . .	142
19	Linearkombination zielwertmaximierter MinModen (GR04, 3.Kapitel) .	143
20	Gemessene Enzymkonzentrationen aus der Arbeit von Ishii <i>et al</i>	144
21	Verwendete Quotienten der Enzymkonzentrationsänderungen	145
22	Flussvorhersagen für MinModen-Set M, Feist-Irreversibilitäten Fst . . .	146

Abkürzungsverzeichnis

Metabolite

13dpg	3-Phospho-D-glyceroyl-phosphat
2pg	D-Glycerat-2-phosphat
3pg	3-Phospho-D-glycerat
6pgc	6-Phospho-D-gluconat
6pgl	6-phospho-D-glucono-1,5-lacton
ac	Acetate
acald	Acetaldehyd
accoa	Acetyl-CoA
acon_C	cis-Aconitat
adp	Adenosin-di-phosphat
akg	2-Oxoglutarat
amp	Adenosinmono-phosphat
atp	Adenosintri-phosphat
cit	Citrate
co2	Kohlendioxid
coa	Coenzym A
dhap	Dihydroxyacetone-phosphat
e4p	D-Erythrose-4-phosphat
etoh	Ethanol
f6p	D-Fructose-6-phosphat
fdp	D-Fructose-1,6-bisphosphat
for	Format (Essigsäure)
fum	Fumarat (Ameisensäure)
g3p	Glyceraldehyd-3-phosphat
g6p	D-Glucose-6-Phosphat
glc-D	D-Glucose
glx	Glyoxylat
h	Intrazelluläres Proton, Teil des Protonengradienten
h2o	Wasser
h_e	Extrazelluläres Proton, Teil des Protonengradienten
hp	Plasmaproton
icit	Isocitrat
lac-D	D-Lactat
lac-L	L-Lactat
mal-L	L-Malat
nad	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
nadh	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
nadp	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphate
nadph	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphate (reduzierte Form)
o2	Molekularer Sauerstoff
oaa	Oxalacetat
pep	Phosphoenolpyruvat
pi	Phosphat
pyr	Pyruvat
q8	Ubiquinone-8
q8h2	Ubiquinol-8
r5p	alpha-D-Ribose-5-phosphat
ru5p-D	D-Ribulose-5-phosphat
s7p	Sedoheptulose-7-phosphat
succ	Succinat
xu5p-D	D-Xylulose-5-phosphat

Sonstige

FBA	Flussbilanzanalyse
FVA	Flux variability analysis
GR	Growth Rate (Wachstumsratenexperimente)
i.d.R.	in der Regel
KO	Knock-out (Mutante)
MFA	Metabolic flux analysis
RF	Referenz

1 Einleitung

1.1 Biologische Grundlagen

1.1.1 Die (robuste) Architektur zellulärer Reaktionsnetzwerke

“Robustness is the ability of a system to maintain its functionality across a wide range of operational conditions.” P. Hammerstein[74]

Gemeinhin werden drei zelluläre Organisationsebenen unterschieden: die Gen-Ebene (DNS) zur Speicherung, die mRNS-Ebene zur Vervielfältigung und die Protein-Ebene zur Umsetzung genomischer Information. Die Proteine, in aktiver oder inaktiver Form, üben vielfältige Aufgaben aus und erst durch ihr faszinierendes und logistisch hoch anspruchsvolles Zusammenspiel wird die fortlaufende Funktion der komplexen Zellmaschinerie ermöglicht. Angesichts der Tatsache, dass jeden Augenblick in den rund 40 Billionen Zellen unseres Körpers vielschichtige molekulare Prozesse stattfinden, ist es verwunderlich, dass das “Krank-sein” eine Ausnahme und nicht die Regel ist. Die Fehlfunktionen zellulärer Prozesse sind i.d.R. so gering, dass der Gesamtorganismus nicht merklich darunter leidet. Da evolutionäre Entwicklung nur möglich ist, wenn das System genügend Flexibilität besitzt, unterschiedliche, lebensfähige Phänotypen zu erzeugen, ist eine gewisse Fehlerquote sogar Teil des Systems!

*Robuste
Funktion trotz
provozierter
Fehlerraten*

Robustheit ist, laut de Visser[209], eine den biologischen Systemen innewohnende Eigenschaft, die durch die Evolution stark begünstigt wurde. Sie ermöglicht das Überleben eines Organismus in unvorhersehbaren Umgebungen und unter Verwendung unzuverlässiger Komponenten[105]. Dabei bedeutet Robustheit eines Systems nicht, unter allen Umständen einen bestimmten Zustand beizubehalten[74], sondern intelligent und den gegebenen Bedingungen entsprechend in einen geeigneteren Zustand umzuschalten (siehe Beispiel in Abbildung 1.1). Mit dem Ziel, entsprechend robuste Technik zu entwickeln, haben Ingenieure in Zusammenarbeit mit Biowissenschaftlern intensiv geforscht, welche Mechanismen und Aspekte ein solches Verhalten ermöglichen. Einige Wichtige sind: *Kanalisation*, *Rückkopplungsmechanismen*, *Graceful Degradation* (würdevoller Abgang), *Ausfallschutz* und *Modularität* (siehe Kitano[105]). Auf die letzten zwei Konzepte möchten wir etwas näher eingehen, da sie für die strukturelle Ausbildung des Stoffwechselnetzwerks sicherlich von Bedeutung waren.

*Definition von
Robustheit*

Ausfallschutz im Ingenieurwesen bedeutet häufig die Verwendung redundanter Komponenten. Dies ist jedoch ein vielfach unwirksames (da einseitiges) Mittel, um Robustheit zu erreichen! Nach Krakauer und Plotkin[115] würden identische Gene (d.h. gleiche Funktion und Regulation) sich in biologischen Systemen nicht durchsetzen können. Die Natur verwendet vielmehr Komponenten, die in ihrer Funktion überlappen oder diese auf unterschiedlichem Wege ausüben. Diese Strategie sehen wir beispielsweise in der ATP-Produktion, die sowohl über die Glykolyse als auch über die oxidative

*Redundanz ist
zu ineffizient*

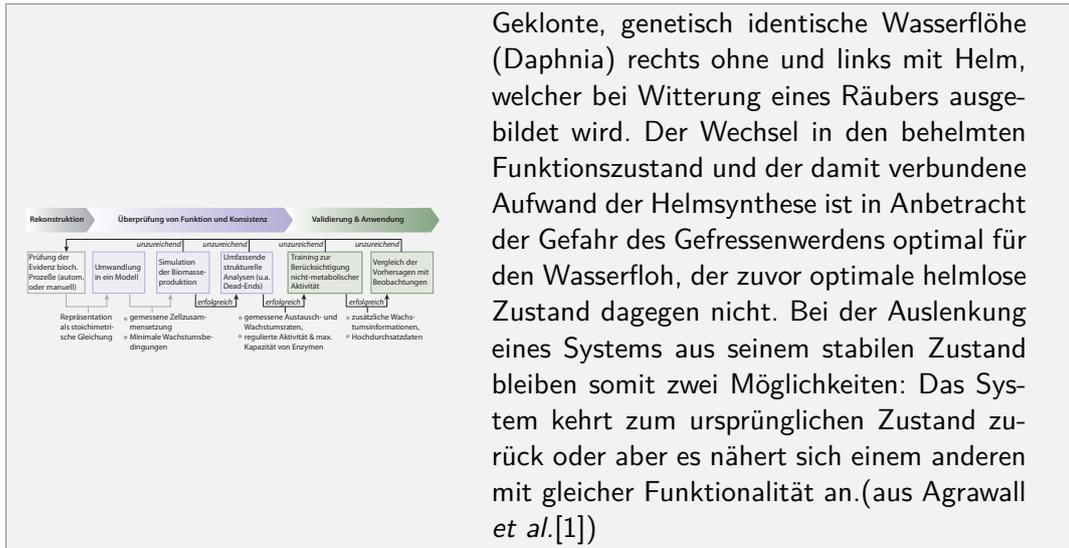


Abbildung 1.1: Beispiel für das intelligente Umschalten zwischen optimalen Zuständen

Phosphorylierung erfolgen kann.

Konzept der Modularität

Um mit wenigen Mutationen neue, lebensfähige Phänotypen erzielen zu können, muss die Anzahl letaler Mutationen möglichst gering gehalten werden. Eine solche Variabilität bei gleichzeitiger Stabilität wird allgemein durch eine modulare Struktur gewährleistet, wie sie in verschiedenen biologischen Netzwerken gefunden wurde (in Stoffwechselnetzwerken[160], Protein-Protein-Interaktionsnetzwerken[165], Genregulatorischen Netzwerken[189, 89] und integrierenden Netzwerken[199]). Der Vorteil dieser Struktur ist die unabhängige Entwicklung einzelner Module durch Mutationen, deren Neuordnung zu neuen Phänotypen führt. Modularität erlaubt somit einigen Teilen eines komplexen Systems, sich zu ändern, ohne mit anderen Teilen zu interferieren bzw. ohne dass Störungen in der Umwelt sich auf das gesamte System auswirken.

Definition eines Moduls

Die einzelnen Module können nach unterschiedlichen Gesichtspunkten definiert sein: Es gibt einfach zu identifizierende physische Module (z.B. die Zelle), aber auch funktionelle, räumliche, zeitliche oder logische Module, die weniger offensichtlich sind. Meist sind sie hierarchisch organisiert. Für Situationen, in denen die Einteilung in starre Module nicht befriedigend ist, gibt es flexiblere Konzepte, in denen Komponente auch mehrfach[76] oder dynamisch in verschiedenen Modulen[75] auftreten können. Eine einheitliche Definition eines Moduls fällt daher schwer. In einem Review von Mitchell [132] wird folgende Definition als Schnittmenge existierender Definitionen angegeben: "A modul is a component that operates in an integrated and relatively autonomous manner in the production of the properties of the system of which it is a part (while not all parts of the system are modules)."

Robuste Netzwerk-Architektur

Eine Organisationsform, die die Robustheit unter verschiedenen Aspekten unterstützt, ist laut Kitano[105] die sogenannte *Bow-Tie-Architecture*. Dabei sorgen eine Reihe von variablen Modulen für die Verarbeitung unterschiedlicher Eingangssignale, deren Ausgabe an hoch-konservierte Kernprozesse (= Knoten) weitergeleitet wird. Diese sprechen ihrerseits wiederum variable Module an, die unterschiedliche Ausgangssignale erzeugen (bow-tie = Halsbinde/Fliege, siehe Abbildung 1.2). Voraussetzung dafür sind konstante Schnittstellen (Steckverbindungen), die sich nicht oder nur geringfügig wei-

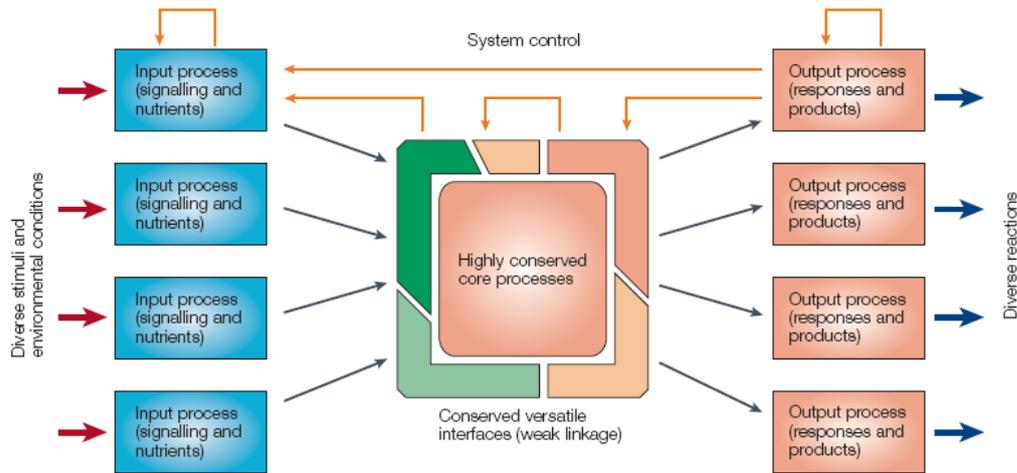


Abbildung 1.2: Architektur eines robusten Systems (aus der Arbeit von H.Kitano[105])

terentwickeln und die Kommunikation der sich variablen Komponenten gewährleisten. Ein Beispiel ist die Transkriptionsmaschinerie: Während die Sequenz sich ändern kann und zur Variabilität des Systems beiträgt, ist der Prozess der Transkription konserviert und universell.

Robuste Systeme sind gekennzeichnet durch intelligentes Ausbalancieren von v.a. Effizienz (z.B. Alternativwege sind kostspielig), Sicherheit (z.B. Alternativwege schützen vor Ausfall) und Anpassung (schränkt die Flexibilität bzgl. wechselnder Umgebungsbedingungen ein). Nach Csete und Doyle[35] ist das Verhältnis von Robustheit (im Sinne von Sicherheit und Stabilität) zu Anfälligkeit zudem konstant und jeder Zugewinn an Robustheit verursacht eine erhöhte Anfälligkeit an anderer Stelle. Eine hohe Robustheit gegenüber allgemeinen Störungen geht daher einher mit einer hohen Anfälligkeit für seltene Störungen. Strukturell wird sowohl Variabilität als auch Stabilität des Stoffwechsels durch eine modulare Organisation flexibler (mutationsanfälliger) und starrer (hoch konservierter) Teilstrukturen gewährleistet.

Fazit

1.1.2 Bedeutung des Stoffwechsels für physiologische Zellfunktionen

Nur ein Teil aller Proteine wird für die Umsetzung von Stoffen benötigt (siehe Abbildung 1.3). Unter dem Einfluss dieser als Enzyme bezeichneten Proteine laufen Reaktionen um ein Vielfaches schneller ab, als in freier Lösung (siehe Seite 7). Durch die effektive Ausnutzung der in den Bindungen enthaltenen chemischen Energie können notwendige Bausteine für die Synthese z.B. von Zellmembran, DNS und weiteren Proteinen hergestellt werden. Der Überschuss an Energie, der für die Bausteinsynthese nicht gebraucht wird, kann - meist in Form von energiereichen Phosphatbindungen, wie im ATP - zwischengespeichert werden. Der Stoffwechsel besitzt somit, verglichen mit anderen zellulären Ebenen, die einzigartige Fähigkeit, durch die Aufnahme energetisch hochwertiger Substrate und die Abgabe energetisch niedrigwertigerer Produkte, chemische Energie umzuwandeln und zu speichern.

Transformation von Energie

Welche Proteine gerade am aktuellen zellulären Geschehen und somit auch am Stoffwechsel teilnehmen, wird durch deren endliche Lebensdauer, die verfügbaren Ressour-

Dienstleister

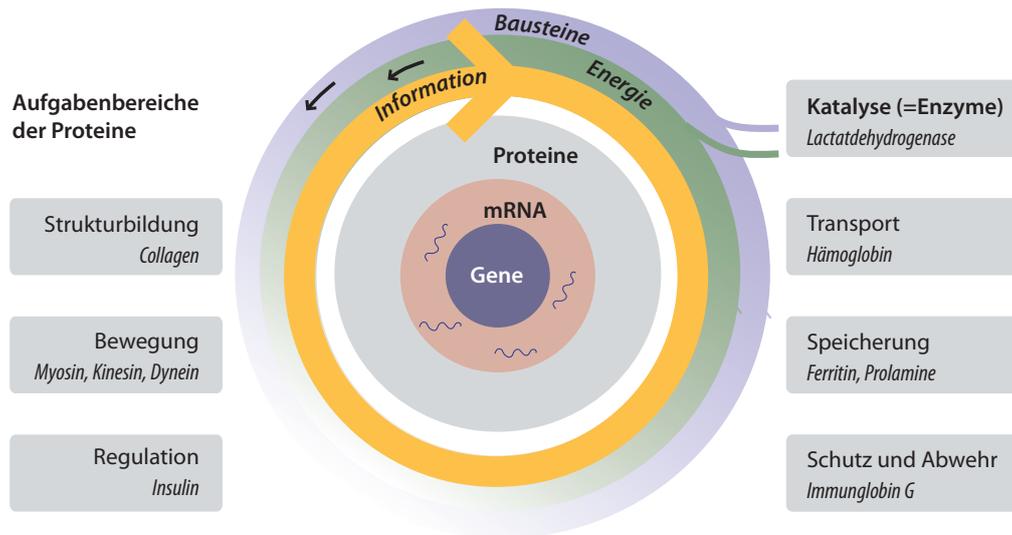


Abbildung 1.3: Illustration von Stofffluss, Energiefluss und Informationsfluss als verbindende Elemente zellulärer Aktivitäten. In den grauen Boxen sind die vielfältigen Aufgabenbereiche der Proteine dargestellt inkl. einiger prominenter Vertreter.

cen für deren Neusynthese, vor allem aber dem momentanen Bedarf ihrer Leistung bestimmt. Ob es einen Mehrbedarf gibt oder Proteine nicht mehr benötigt werden, ergibt sich dabei aufgrund eingehender Signale (in Form von Hormonen, Informationen über wechselnde Umgebungsbedingungen und das Nährstoffangebot), sowie der internen zellulären Situation (z.B. Enzym defekte, Verfügbarkeit notwendiger Bausteine). Das alle zellulären Bereiche verbindende Element ist daher der Fluss von Informationen. Der Stoffwechsel stellt die dafür notwendige Energie und die stofflichen Bausteine zur Verfügung. Er besitzt und beeinflusst somit drei Aspekte: den Stofffluss, den Informationsfluss und den Energiefluss (siehe Abbildung 1.3).

Fazit Ob ein Organismus trotz provozierte Mutation wächst, welche Stoffwechsel- und -nebenprodukte entstehen oder welche Nährstoffe er verbraucht, basiert auf dem Stofffluss. Im Vergleich zum lenkenden Informations- und antreibenden Energiefluss bestimmt der Stofffluss den physiologischen Phänotyp eines Organismus. Als das Ergebnis genetischer, transkriptioneller und metabolischer Kontrolle sind Stoffflüsse daher äußerst aufschlussreich, wenn es um den internen Zustand der Zelle geht.

1.1.3 Kinetik und Thermodynamik von Reaktionsnetzwerken

“The most important thing about these reactions is that they provide the means to carry out the oxidation of organic matter in a sequence of steps that store energy that is needed for the synthesis of organic molecules, mechanical work, and other functions required for life.” R. Alberty[2]

Thermodynamik ist die Lehre der Umwandlung von Energie. Sie beschreibt die Beziehungen zwischen verschiedenen Energieformen und beantwortet, ob, unter welchen Bedingungen und in welcher Zeit die Umsetzung von Stoffen abläuft. Für die Betrachtung biochemischer Stoffumwandlungen spielt die Thermodynamik daher eine große

Rolle.

In offenen Systemen, zu denen biologische Systeme zählen, erfolgt ein rascher Ausgleich mit dem Atmosphärendruck und der Umgebungstemperatur und es kann ein konstanter Druck (isobar) und eine konstante Temperatur (isotherm) angenommen werden. Die Bedingungen, unter denen in diesem Fall eine chemische Reaktion freiwillig ablaufen kann, lassen sich auf die Änderung von zwei entscheidenden Größen zurückführen, der Entropie S und der Enthalpie H . Die Enthalpie H , auch als Wärmeinhalt bezeichnet, ist ein Maß für die Energie eines thermodynamischen Systems (unter konstantem Druck). Die Entropie S dagegen gilt als Maß für die thermodynamische Wahrscheinlichkeit eines Zustandes (wobei der geordnete Zustand i.d.R. sehr unwahrscheinlich ist). Der Zusammenhang beider Größen, in Abhängigkeit der absoluten Temperatur T (in Kelvin), wird durch folgende Gleichung beschrieben:

*Entropie &
Enthalpie*

$$dS \geq \frac{dH}{T} \quad (1.1)$$

Die Anteile beider Terme entscheiden über die Art des Prozesses: Nimmt die Enthalpie im System zu ($dH > 0$) weil die Entropie der Umgebung kleiner wird ($dS' = -dH/T$) und Wärme aus der Umgebung aufgenommen wird ($dH' < 0$), spricht man von einem endothermen Prozess. Freiwillig ablaufende Prozesse beruhen auf einer Zunahme der Entropie der Umgebung ($dS' > 0$), d.h. bei freiwillig ablaufenden, endothermen Reaktionen übertrifft die Zunahme an Entropie im System, die Zunahme an Enthalpie ($dS > dH$). Mit Hilfe der sogenannten Gibbs-Energie (auch Freie Enthalpie genannt) werden diese Bedingungen zusammengefasst:

*Freiwillig
ablaufende
Prozesse*

$$G = H - TS \quad (\text{allgemein}), \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{für } T=\text{konst.}) \quad (1.2)$$

Die Gibbs-Energie kann als Funktion der *Reaktionslaufzahl* ξ dargestellt werden, um den Punkt der Umsetzung zu bestimmen, an welchem sich das thermodynamische Gleichgewicht einstellt (siehe Abbildung 1.4). Bei fortschreitender Reaktion (d.h. steigender Reaktionslaufzahl) ändert sich die Steigung der Kurve und damit die Gibbs-Energie ($\Delta_R G$): für $\Delta_R G < 0$ fällt die Kurve und Substrat wird in Produkt umgesetzt; im Gleichgewicht ist die Steigung gleich Null (Minimum) und für $\Delta_R G > 0$ steigt die Kurve und die Treibkraft treibt zurück in Richtung Minimum, d.h. Produkt wird zurück zu Substrat umgesetzt.

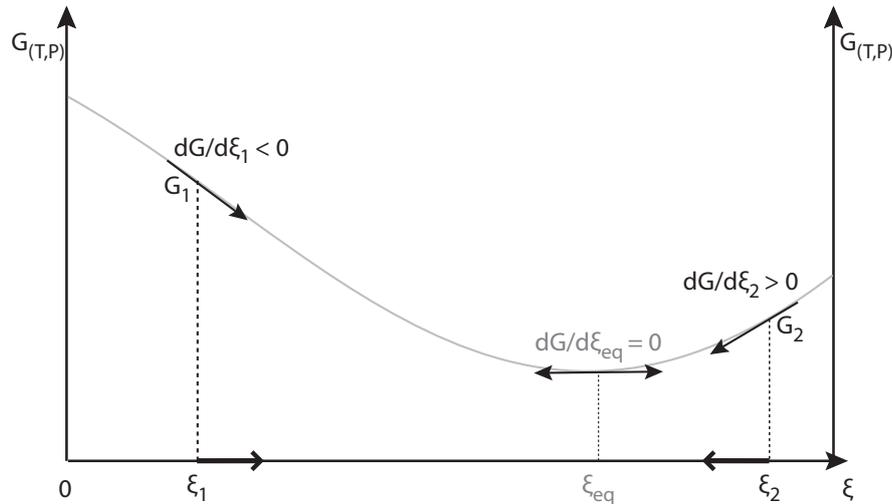
Gibbs-Energie

Die Bestimmung der Gibbs-Energie anhand der Größen in Gleichung 1.2 ist experimentell sehr aufwändig. Da die Gibbs-Energie einer Folge von Reaktionen jedoch gleich der Summe der Gibbs-Energien ihrer Einzelreaktionen ist und die Bildung einer Verbindung auch als Folge von Reaktionen betrachtet werden kann, kann Gibbs-Energie der Bildung eines Stoffes aufsummiert werden. Diese Größe wird als Gibbs-Bildungsenergie $\Delta_B G$ bezeichnet.

*Gibbs-
Bildungsenergie
 $\Delta_B G$*

Um die Vergleichbarkeit der $\Delta_B G$ -Werte zu gewährleisten, wurden Standardbedingungen eingeführt (Index°). In der Biochemie sind dies: ein äußerer Druck von 1 bar (etwa Atmosphärendruck), eine Temperatur von 25°C, ein pH-Wert von 7,0 und eine Konzentration (oder genauer, eine Aktivität) der Reaktanten und Produkte von jeweils 1M. Die Gibbs-Standardbildungsenergie, $\Delta_B G^\circ$ der chemischen Elemente in ihrem stabilsten Zustand (H_2 , He, Li, ...) ist per Definition auf 0 kJ/mol festgesetzt. Für eine in

*Standard-
bedingungen*

Abbildung 1.4: Änderung der Gibbs-Energie in Abhängigkeit der Reaktionslaufzahl ξ

einfache Bausteine zerlegte Reaktion wird die Änderung der Standard-Gibbs-Energie $\Delta_R G^\circ$ wie folgt bestimmt:

$$\Delta_R G^\circ = \sum_J v_J \Delta_B G^\circ(J) \quad (1.3)$$

Gibbs-Reaktionsenergie $\Delta_R G$ Die Gibbs-Energie einer Verbindung $\Delta_B G^\circ$ entspricht der Änderung der Gibbs-Energie bei der Bildung von 1 Mol dieser Verbindung aus den entsprechenden Elementen im Standardzustand. Dieser Wert ist für viele biochemisch relevante Verbindungen bestimmt und tabellarisch erfasst worden. Das $\Delta_R G^\circ$ einiger Reaktionen im Zentralstoffwechsel kann deshalb relativ einfach berechnet werden. Die tatsächliche, absolute Gibbs-Energie einer Substanz ist jedoch von ihrer aktuellen Konzentration¹ und der Temperatur abhängig. Werden *Stöchiometrische Koeffizienten* v_J verwendet, ergibt sich die absolute Gibbs-Reaktionsenergie $\Delta_R G$ als:

$$\Delta_R G = \Delta_R G^\circ + RT \ln \prod_J [C_J]^{v_J} \quad (1.4)$$

Gleichgewichtskonstante, k Im Gleichgewicht ($\Delta_R G = 0$) sind die Geschwindigkeiten der Hin- und Rückreaktion identisch und die Konzentrationen der Edukte und Produkte ändern sich nicht. Nach dem Massenwirkungsgesetz steht das Produkt der Produktkonzentrationen (in mol/l) in diesem Zustand in einem konstanten Verhältnis zum Produkt der Eduktkonzentrationen. Dieses Verhältnis wird durch die Gleichgewichtskonstante k ausgedrückt. Für die Berechnung von $\Delta_R G$ gilt damit:

$$\Delta_R G = \Delta_R G^\circ + RT \ln k \quad (1.5)$$

¹genauer ihrer Aktivität, die in der Praxis jedoch näherungsweise durch ihre Konzentration ersetzt wird

Der $\Delta_R G$ -Wert gibt an, in welche Richtung eine Reaktion freiwillig abläuft, wie das Reaktionsgemisch im Gleichgewicht zusammengesetzt ist und welche "netto"-Energiebilanz sich ergibt (siehe Gleichung 1.3) – über den Reaktionsweg erlaubt er jedoch keine Aussage! Die Kinetik entscheidet, ob es einen Weg gibt, auf dem das thermodynamische Gleichgewicht in endlicher Zeit erreicht werden kann. Die grundlegende Größe der Kinetik ist die Reaktionsgeschwindigkeit v . Sie gibt an, wie viele Teilchen pro Zeit in einer chemischen Reaktion umgesetzt werden (Angabe in $\frac{\text{mol}}{\text{ls}}$).

Bedeutung der Kinetik

Der Reaktionsweg verläuft i.d.R. über einen energetisch ungünstigeren Übergangszustand. Um reagieren zu können benötigen Substrate daher meist eine Mindestenergie (Aktivierungsenergie), die sie in diesen Zustand bringt. Wärmeenergie und Stoßenergie sind zwei Möglichkeiten die Aktivierungsenergie zu erreichen; die Erhöhung von Substratkonzentration und Temperatur beschleunigt die Reaktion also. Wesentlich effektiver sind jedoch Katalysatoren: Durch Stabilisierung des Zwischenproduktes (z.B. über eine vorübergehende Bindung) ermöglichen sie einen energetisch günstigeren Übergangszustand und erlauben somit einen alternativen Reaktionsweg mit geringerer Aktivierungsenergie.

Aktivierungsenergie

Enzyme sind außerordentlich wirksame Katalysatoren, die die Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion oft auf das 10^{12} -fache (oder mehr) erhöhen. Ihre Wirkung basiert auf mehreren katalytischen Effekten: die Annäherung und Orientierung der Substrate, das Entfernen der Hydrathülle der Reaktanten (sprich Wasserausschluss), die Übertragung von chemischen Gruppen; der hauptsächliche Effekt ist jedoch die Stabilisierung des Übergangszustandes. Die katalytische Wirkung eines Enzyms, die *Enzymatische Aktivität* (in kat oder $\frac{\text{mol}}{\text{s}}$), bestimmt sich aus der Zunahme der Geschwindigkeit gegenüber der unkatalysierten Reaktion.

Enzymatische Katalyse

Die Richtung in die eine Umsetzung freiwillig stattfindet, lässt sich vom $\Delta_R G$ -Wert ableiten, welcher von der Standard-Gibbs-Energie $\Delta_R G^\circ$ und dem momentanen Konzentrationsgefälle abhängt. Ist das Konzentrationsgefälle vernachlässigbar, liefert $\Delta_R G^\circ$ bzw. die Gleichgewichtskonstante k einen Hinweis auf die Reaktionsrichtung. Die Geschwindigkeit der Umsetzung (und somit der Stofffluss) wird jedoch von der Reaktionskinetik bestimmt, welche maßgeblich beeinflusst wird durch die Anwesenheit eines Katalysators, bzw. für biochemische Prozesse von der Aktivität eines entsprechenden Enzyms.

Fazit

1.1.4 Regulation des Stoffflusses durch Enzyme

Um Bildung und Abbau der Metabolite den physiologischen Erfordernissen anzupassen, werden die Stoffwechselaktivitäten kontrolliert und reguliert. Der Metabolit-Fluss (=Umsatzrate) durch einen Stoffwechselweg wird vor allem von den Aktivitäten der beteiligten Enzyme bestimmt.

Im Allgemeinen sind Enzyme in der Lage, schwankende Substratkonzentrationen auszugleichen, d.h. ihre Tätigkeit dem Angebot an Substrat anzupassen. Die Ausnahme bilden Situationen, in denen das Enzym bereits mit Substrat gesättigt ist und mit maximaler Umsatzrate arbeitet (siehe Abbildung 1.5). Dies ist jedoch laut Fendt *et al.*[56] eher selten. Zur Steuerung eines Stoffwechselweges genügt es daher, die Aktivität einiger weniger Enzyme zu regulieren, während der Stofffluss durch die anderen Enzyme durch die Verfügbarkeit von Substraten und Coenzymen automatisch reguliert wird.

Regulation der Enzymaktivität

Die Aktivität der sogenannten “Schlüsselenzyme” wird auf drei unabhängigen Ebenen kontrolliert:

Transkriptionskontrolle Im “einfachsten“ Fall lässt sich die Menge aktiven Enzyms über die Enzymkonzentration regulieren. “Einfach” bezieht sich dabei auf unser Verständnis - für die Zelle ist die Biosynthese von Enzymen alles andere als einfach: Es ist ein komplexer, für zelluläre Verhältnisse sehr langsamer Prozess (mehrere Minuten bis Stunden), der von der Verfügbarkeit entsprechender Aminosäuren und ausreichend Energie (bzw. ATP)¹ abhängt. Dabei wird in erster Linie die Synthese einer entsprechenden mRNA mittels von Transkriptionsfaktoren kontrolliert, die ihrerseits wiederum der Kontrolle durch Hormone oder andere Metabolite unterliegen. Die Regulation des Enzymabbaus durch Proteasen ist eine von Ressourcen unabhängige Alternative, die aber sehr langsam vor sich geht.

Interkonversion Erheblich schneller (wenige Sekunden) wirkt die Interkonversion von Schlüsselenzymen. In diesem Fall ist das Enzym zwar vorhanden und in geringem Maße auch aktiv, aber seine Aktivität kann durch ein aktivierendes Enzym noch um ein Vielfaches gesteigert werden. Durch ein inaktivierendes Enzym kann es bei Bedarf wieder in den “inaktiven Ruhezustand“ zurückversetzt werden. Die Interkonversion erfolgt häufig durch das gezielte (ATP-abhängige) Anbringen einer Phosphatgruppe (durch eine sogenannte Proteinkinase) bzw. dessen Abspaltung (durch eine Phosphatase).

Allosterische Effekte Häufig wird die Stoffwechselaktivität durch Liganden (Substrate, Produkte, Coenzyme, andere Effektoren) kontrolliert, die als allosterische Effektoren nicht am aktiven Zentrum selbst, sondern an einem anderen Ort des Enzyms binden und dadurch die Enzymaktivität modulieren. Von großer Bedeutung ist dabei die *feedback*-Hemmung, bei der entweder Vorstufen oder das Endprodukt eines Stoffwechselfades als allosterische Effektoren die eigene Verwertung oder Synthese stimulieren oder inhibieren.

Fazit Nicht jede Flussänderung lässt sich durch Enzymkonzentrationsänderungen begründen - diese Korrelation gilt nur für annähernd gesättigte Enzyme, deren Aktivitäten nicht auf schnellem Wege über allosterische Effekte oder Interkonversion reguliert werden. Sowohl allosterische Effekte, als auch die Interkonversion sind zeitlich sehr präzise Mechanismen zur kurzzeitigen Regulation. Im Gegensatz zur Biosynthese sind sie nicht sehr dauerhaft und damit experimentell nicht gut erfassbar, weshalb die Menge an aktivem Enzym meist durch die leichter zu messenden Enzymkonzentrationen angenähert wird.

1.2 Rekonstruktion, Analyse und Modellierung von Stoffwechselnetzwerken

Ziel der Modellierung

Allgemein gesprochen wird die Modellierung verwendet, um Phänomene zu untersuchen, die innerhalb von komplexen Zusammenhängen auftreten und die experimentell nicht ausreichend erfasst werden können. Dabei wird das System auf die für das Phäno-

¹Die Proteinsynthese macht etwa 40% des gesamten ATP-Bedarfs aus.

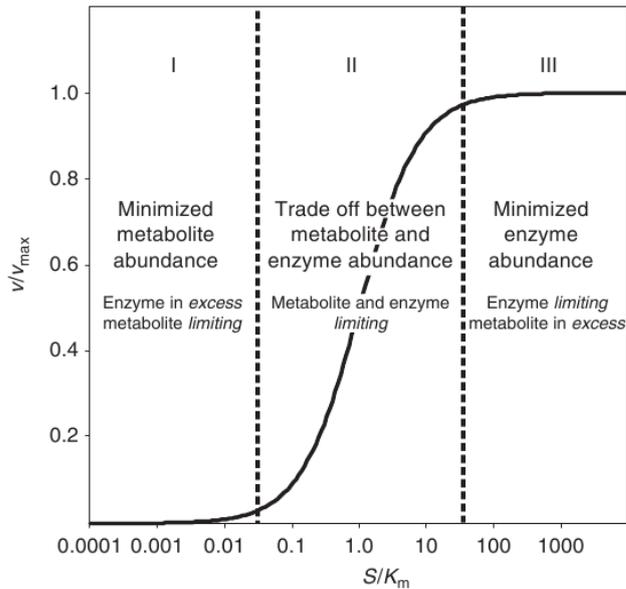


Abbildung 1.5: Einflussmöglichkeiten der Menge an aktivem Enzym auf den Stofffluss in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (jeweils relativ zur maximalen Umsatzrate v_{max} und der Substratkonzentration bei halb-maximaler Umsatzrate, K_m , siehe S.16): I) Substrat ist limitierend (Enzym ohne Einfluss), II) Substrat und Enzym sind limitierend, III) Enzym ist limitierend (aus Fendt et al. [56])

men relevanten Komponenten reduziert. Ein Modell stellt somit immer eine Vereinfachung der Wirklichkeit dar. Die Kunst in der Modellierung besteht darin, die richtigen Komponenten auszuwählen und keine darüber hinaus. D.h. gerade genug, um das zu untersuchende Phänomen beschreiben zu können, ohne dass das System so komplex und unübersichtlich wird, dass der Erkenntnisprozess darunter leidet.

Mit Hilfe der Stoffwechselmodellierung soll das Systemverhalten bei Störung seines Ruhezustandes untersucht werden. Typische Fragestellungen sind: Wie schafft es die Zelle trotz wechselnder Umgebungsbedingungen und interner Störungen, wie natürlichen Mutationen oder künstlichen Gen-Knock-outs, den für alle zellulären Bereiche so notwendigen Stoff- und Energiefluss aufrecht zu erhalten? Welche internen Umstrukturierungen sind dafür notwendig? Erfordert die neue Situation eine Änderung der Enzymausstattung oder reicht die Kapazität der momentan arbeitenden Enzyme für die veränderten Anforderungen aus?

Mögliche Fragestellungen

Für die Beantwortung dieser Fragen, d.h. um zelluläres Verhalten analysieren, interpretieren und vorhersagen zu können, kommen häufig drei unterschiedliche Modellierungsansätze zur Anwendung: 1. kinetische Modellierung, 2. strukturelle Modellierung, und 3. Flussbilanzanalyse. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der benötigten biochemischen Details (und damit der zugrunde liegenden Annahmen) und erlauben daher die Beantwortung unterschiedlicher Fragestellungen.

Verwendete Analysemethoden

Grundlage aller drei Modellierungsansätze ist die Beschreibung jedes einzelnen Schrittes im betrachteten biochemischen Netzwerk, also die (virtuelle) Rekonstruktion des Stoffwechselnetzwerks auf Basis experimenteller Beobachtungen. Der Prozess der Rekonstruktion und Validierung eines Stoffwechselnetzwerks wird den Erläuterungen der einzelnen Methoden daher vorangestellt. Wir unterscheiden dabei in dieser Arbeit zwischen universellen Stoffwechselnetzwerken und davon abgeleiteten, auf spezifische Fragestellungen (und Methoden) angepassten Stoffwechselmodellen. Da für die Wahl wie auch für die Weiterentwicklung einer geeigneten Methode, entscheidend ist, welche Daten dem Modellierer zur Verfügung stehen, wird die experimentelle Datengrundlage vorweg erläutert.

Grundlage: Netzwerk-Rekonstruktion

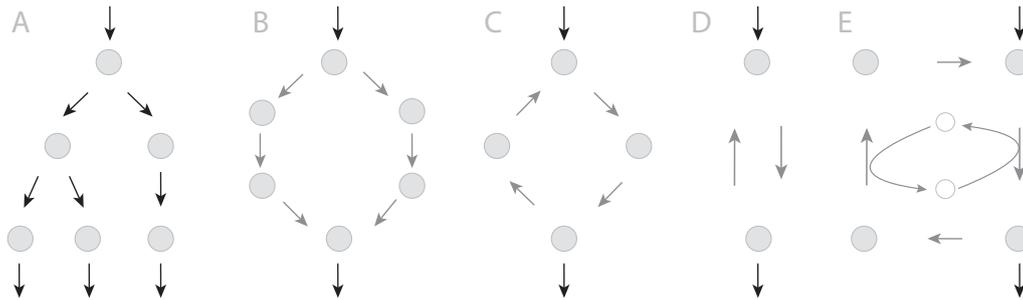


Abbildung 1.6: Bestimmbarkeit interner Stoffflüsse mittels MFA. A) Alle Flüsse sind bestimmbar (schwarze Pfeile), B) Für parallele Stoffwechselwege sind interne Flüsse nicht bestimmbar (graue Pfeile). Gleiches gilt für C) Zyklen, D) Bidirektionale Reaktionschritte (reversible Reaktionen), E) Flüsse, die an Energiemetaboliten, wie ATP gekoppelt sind. Diese erfordern eine genaue Bilanzierung der Energiemetaboliten, d.h. alle involvierten Umwandlungsprozesse müssen bekannt sein (weshalb Futile Cycles ein Problem darstellen, Darstellung in Anlehnung an Wiechert, 2001[214]).

1.2.1 Experimentelle Datengrundlage

Flussbestimmung, nicht-messung

Die wertvollste Information in der Stoffwechselmodellierung ist der Stofffluss selbst. Es liegt jedoch in der Natur des Flusses, dass man ihn nicht direkt messen, sondern immer nur indirekt bestimmen kann, d.h. man misst die Menge des transportierten, verbrauchten oder neu produzierten Stoffes innerhalb einer bestimmten Zeiteinheit (wir sprechen daher von Flussbestimmung statt Flussmessung). Dabei sind die Daten umso genauer, je kürzer die Zeiteinheit ist. Am genauesten ist daher die Bestimmung von Flüssen, deren Stoffumsatz instantan gemessen werden kann, während die Zelle lebt, wächst und reagiert - ein selten erfülltes Ideal.

Austauschflüsse & MFA

Für die Konzentrationsbestimmung von Sauerstoff, CO_2 und einzelner externer Metaboliten, wie Glucose, sind instantane Messungen im Medium tatsächlich möglich ("online"-Messung). Andere extrazelluläre Stoffkonzentrationen (verfügbare Substrate, abgegebene Stoffwechselendprodukte) können durch regelmäßige Probenentnahme und anschließende Analyse bestimmt werden. Zumindest für das Wachstum von einzelligen (im Bioreaktor) kann auf diese Weise relativ unkompliziert die Substrataufnahme, Produkt- und Nebenproduktsynthese, CO_2 -Abgabe und analog dazu der Sauerstoffverbrauch verfolgt und entsprechende Raten bestimmt werden. Zusätzlich kann über die Zelldichte im Medium die Wachstumsrate bestimmt werden. Werden diese Austauschflüsse auf ein einfaches Stoffwechselnetzwerk projiziert, kann in begrenztem Maße auf interne Flüsse (des Zentralstoffwechsels) rückgeschlossen werden. Dieses Verfahren wird als Metabolic Flux Analysis (MFA)[208] bezeichnet.

Interne Stoffflüsse

Für einige recht typische Netzwerkstrukturen ist eine eindeutige Zuordnung und damit eine eindeutige Flussbestimmung via MFA jedoch nicht möglich (siehe Abb.1.6). Hier verwendet man Substrate mit radioaktiv-markierten Atomen (z.B. $^{13}\text{C}_6$ -Glucose), die in verschiedenen Stoffwechselprodukten nachgewiesen und deren Wege anhand bekannter Umsetzungen rekonstruiert werden können. Grundlage dafür ist die *Stöchiometrische Matrix* und *Atomübergangsmatrizen* [225, 61], aus welchen ein Isotopomeretzwerk erstellt wird. Damit und mit den gemessenen Isotopomerfraktionen kann auf die relative interne Flussverteilung rückgeschlossen werden – ein sehr aufwändiges

Experiment. Im Gegensatz zur Messung von Metaboliten, Proteinen oder Transkripten verlangt die experimentelle Flussbestimmung einen Modellierungsschritt und ist daher genau-genommen eine Flussvorhersage. In Kombination mit gemessenen Austauschflüssen können in einem integrativen Ansatz (da physiologische und markierte Daten zusammenfließen) absolute intrazelluläre Flüsse bestimmt werden.

In Analogie zum Genom wird häufig von der Bestimmung des *Fluxoms*[169, 216] gesprochen – ein Begriff, der eine umfassende Bestimmung interner Flüsse suggeriert. Tatsache ist jedoch, dass nur ein relativ kleiner Teil der internen Stoffflüsse bestimmbar ist. In Ishii *et al.* sind es beispielsweise knapp 50 Flüsse des Zentralstoffwechsels[93]. Für eukaryotische Zellen ist die Flussbestimmung für verschiedene subzelluläre Kompartimente zudem eine große Herausforderung. Ein nicht zu unterschätzender Aspekt ist weiterhin die Abhängigkeit der Ergebnisse von der verwendeten Netzwerktopologie: Zum einen können unzulässig vernachlässigte Reaktionen oder ignorierte *Metabolit-Kanalisation* [218] Ursachen für Berechnungsfehler sein, zum anderen kann der Vergleich von Flussvorhersagen mit experimentell bestimmten Flüssen ausschließlich vor dem Hintergrund des verwendeten Isotopomernetzwerkes erfolgen.

*Schwierigkeiten
der Fluss-
bestimmung*

Zweit-wichtigste Informationsquelle neben dem Stofffluss ist die Aktivität des katalysierenden Enzyms. Diese wird traditionell spektrophotometrisch über die Zunahme oder Abnahme des durch Cofaktoren (NADH, NADPH) emittierten Lichts verfolgt. Die Messung beschränkt sich daher auf Umsetzungen, deren Katalyse entweder direkt cofaktorabhängig ist oder die einer cofaktorabhängigen Umsetzung unmittelbar vorausgehen. Arbeitet man mit einem Zellaufschluss, ist die Sensitivität der Methode zudem nicht sehr hoch. Eine vorausgehende Proteinaufreinigung (unter Beibehaltung der Aktivität) ist sehr aufwändig – wenn überhaupt möglich.

Enzymaktivität

Eine Alternative ist die Proteomanalyse („Proteomics“). Ihr Ziel ist die qualitative und quantitative Bestimmung aller Proteinkonzentrationen in einer Zelle (oder einem anderen biologischen System) zu einem bestimmten Zeitpunkt[98]. Im Gegensatz zum Genom, der Gesamtheit aller Gene, ist das Proteom deutlich komplexer. Zum einen gibt es mehr Proteine als Gene, da durch alternatives Spleißen (nicht bei Bakterien) und posttranslationale Modifikationen aus einem Gen verschiedene Proteine entstehen können, zum anderen besitzen Proteine eine weitaus größere chemische Diversität und treten in enorm unterschiedlichen Konzentrationen auf. Die Analyse ist daher sehr aufwändig. Niedrig konzentrierte, sehr hydrophobe, saure oder basische Proteine können oft nicht detektiert werden.

Proteom

Die Bestimmung aller Metabolitkonzentrationen ist Gegenstand der Metabolomanalyse. Der Begriff Metabolom wurde erstmals 1998 von Oliver *et al.*[142] verwendet. Seitdem versuchen Forscher weltweit, die Extraktion von Metaboliten für verschiedene Organismen zu optimieren, um möglichst viele Metabolite zu identifizieren und quantifizieren. Derzeit liegen in der Human Metabolome Database[220, 219] für 294 von 6828 Metaboliten, die in menschlichen Zellen vorkommen, *GC/MS* -Referenzspektren vor – eine Zahl, die die momentane Größenordnung quantifizierbarer Metabolite wiedergibt. Da die Konzentrationen innerhalb der Zelle sehr gering sind (meist unter 1mM), das intrazelluläre Volumen unter 3% des Probevolumens liegt[24] und sich die chemische Struktur der Metabolite mitunter nur um ein Atom unterscheidet, bedarf es einer guten Auftrennung der Substanzen und einer sehr sensitiven Nachweis- und Quantifizierungsmethode. Darüber hinaus benötigt eine absolute Quantifizierung einzelner Metabolite die Aufnahme einer Kalibrationskurve. Neben dem Mehraufwand setzt dies

Metabolom

voraus, dass der zu messende Metabolit aufgereinigt zu beziehen ist.

Transkriptom Die Menge und Änderung der Gen-Transkripte (mRNS-Moleküle) kann Aufschluss über tatsächlich abgelesene genetische Information und somit über potentiell exprimierte Proteine geben[40]. Durch die Entwicklung von Microarrays (z.B. seit 1994 durch die Firma Affymetrix), hat die Transkriptomanalyse rasant zugenommen und sich mittlerweile als Standardverfahren etabliert. Der große Vorteil der Transkriptomanalyse ist, dass sie sehr leicht genomweit durchgeführt werden kann. Allerdings ist die Normalisierung der detektierten Signale eine komplexe Angelegenheit, mit welcher sich ein ganzer Zweig der Bioinformatik beschäftigt. Prozesse, die nach der Translation ablaufen (z.B. post-translationale Modifikationen) können jedoch nicht erfasst werden.

Fazit Im Hinblick auf die Untersuchung von Stoffwechselflüssen steht die Verfügbarkeit biochemischer Daten meist im Widerspruch zu dem Wert, den diese Daten für diese Untersuchung haben: die aussage-kräftigsten und aufschlussreichsten Daten sind, wenn überhaupt, nur unter hohem Aufwand zu erheben; die gut verfügbaren Daten am schwierigsten sinnvoll in die Analyse zu integrieren (d.h. es bedarf vieler Annahmen). Ein guter Kompromiss zwischen Verfügbarkeit und informativem Wert der benötigten Daten bietet die Verwendung von Enzym- und Metabolitkonzentrationen (siehe Abbildung 1.7). Letztere sind sowohl für die kinetische, als auch thermodynamische Charakterisierung biochemischer Prozesse von Bedeutung.

1.2.2 Rekonstruktion metabolischer Netzwerke

“The reaction network should be complete, fully covering the metabolic capabilities that are to be modeled, coherent, containing no gaps or dead ends, and correct, faithfully representing the metabolic phenotype of the organism.” M.DeJongh et al.[39]

Komplexes Stoffwechselnetzwerk Obwohl die Anzahl der möglichen chemischen Umwandlungen, die von einem Enzym an einem Substrat katalysiert werden können, überschaubar ist¹ (es werden lediglich 6 EC-Hauptklassen unterschieden), ergeben sich durch die kombinatorische Vielfalt der daraus resultierenden Verbindungen vielfältige Stoffwechselwege. In ihrer Gesamtheit fügen sie sich zu einem komplexen Stoffwechselnetzwerk von mehreren tausend unterschiedlichen biochemischen Reaktionen zusammen. Die einzelnen Schritte der Rekonstruktion mikrobieller, genomweiter Stoffwechselmodelle und die entsprechenden Datenquellen werden in mehreren Reviews[62, 161, 53, 201] detailliert beschrieben. Die folgenden Abschnitte geben einen groben Einblick in den Rekonstruktionsprozess und verweisen auf einige wichtige Aspekte.

Automatische Rekonstruktion Um ein Stoffwechselnetzwerk zu rekonstruieren, geht man i.d.R. von der genomischen Sequenz aus und versucht die darin kodierten Funktionen nach und nach in Zusammenhang zu bringen. Dazu wird zunächst in Datenbanken, wie GenBank(NCBI)² oder dem *Gene-Index-Project*³ (vormals TIGR), nach Ähnlichkeiten zu Sequenzen anderer Spezies gesucht, denen bereits ein Gen mit enzymatischer Funktion zugeordnet wurde. Die enzymatische Aktivität der gefundenen Kandidatengene wird anschließend in

¹z.B. durch Anheften und Abspaltung von Wasser oder diversen funktionellen Gruppen

²<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

³<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>

Transkriptom: Beim sogenannten "Microarray" werden kurze, einzelsträngige, bekannte DNS-Sequenzen auf einer Plastikoberfläche (dem Chip) fixiert und die aufgereinigte Menge an zu untersuchender mRNA vervielfältigt, wobei jeder sogenannten cDNA ein Fluoreszenzmarker angeheftet wird. Die gebundenen Anteile lassen sich optisch detektieren und über die Position und der Strahlungsintensität kann auf die Sequenz und Menge der mRNA rückgeschlossen werden.

Metabolom: Die am häufigsten verwendete Methode ist GC/MS, eine Kopplung von Gaschromatographie an ein Massenspektrometer und damit die Kopplung einer etablierten Methode zur Auftrennung von Substanzen an eine sehr sensitive Nachweis- und Quantifizierungsmethode. Alternativ wird für die Auftrennung die Flüssigkeitschromatographie (LC) in Kombination mit einem 2. Massenspektrographen (LC-MS/MS) oder die Kapillar-Elektrophorese (CE) und Detektion, nicht nur der Masse des Moleküls, sondern auch der Ladung (durch Time-Of-Flight-Massenspektroskopie, CE-TOFMS) verwendet.

Proteom: Die Standardmethode zur Analyse des Proteoms ist die zweidimensionale Gel-Elektrophorese (2DGE). Dabei werden die Proteine in einer Richtung nach ihrer Ladung, und senkrecht dazu nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Proteine werden anschließend angefärbt und die entsprechenden Punkte aus dem Gel ausgestochen. Die enthaltenen Proteine werden dann enzymatisch in kurz-kettige Peptide zerlegt (tryptisch verdaut), die per Massenspektroskopie analysiert und identifiziert werden. Alternativ kann die Auftrennung auch gelfrei über Flüssigkeitschromatographie erfolgen (LC-MS/MS).

Fluxom: Die Messung von Isotopomerverteilungen hat lange Tradition. Klassische Messungen mit ^{14}C gab es etwa seit 1910. Die Verwendung von ^{13}C und Protonen-NMR-Messungen in Kombination mit MFA knüpfte daran an[181]. Man macht sich dabei die stereospezifische Katalysefähigkeit der Enzyme zu nutze, d.h. die Tatsache, dass die aufgenommenen Substrate nicht spiegelsymmetrisch sind und die hinzugefügten oder entfernten Atome bzw. Atomgruppen je nach Enzym sich an einer charakteristischen Position wiederfinden. Da jedes Atom markiert oder nicht-markiert vorliegen kann, besitzt ein radioaktiv markiertes Molekül mit n Kohlenstoffatomen, 2^n mögliche Markierungszustände, die als Isotopomere¹ bezeichnet werden. Die Markierungsdaten können für den Vergleich zweier Zustände oder Mutationen[3] oder zur Bestimmung von Flussverhältnissen verwendet werden[59]. Seit 1998 erlauben zweidimensionale NMR-Spektren, die die Verteilung von sowohl ^1H als auch ^{13}C messen, eine weitaus höhere Auflösung (sogenannte 2D-COSY-NMR). Im Laufe der technischen Weiterentwicklung wurde 1999 die Massenspektroskopie (MS) für die Isotopenbestimmung erstmals verwendet und 2001 eine Kombination von NMR und MS vorgeschlagen[38]. Die Zukunft scheint allerdings bei GC-MS oder MALDI-TOF MS zu liegen (analog der Metabolommessung), da nur die Massenspektroskopie aufgrund ihrer außergewöhnlichen Empfindlichkeit, Geschwindigkeit und den relativ geringen Kosten, das Potential für Hochdurchsatzanalysen im $\mu\text{molaren}$ Bereich besitzt[222, 170].

Abbildung 1.7: *Experimentelle Bestimmung von systembiologisch wichtigen Größen.*

Datenbanken wie BRENDA⁴, MetaCyc⁵, TransportDB⁶, etc. sowie in der Literatur recherchiert und die Enzyme gegebenenfalls in die Rekonstruktion übernommen. In einem weiteren Schritt wird die Stöchiometrie der katalysierten Reaktionen anhand metabolischer Datenbanken, wie KEGG⁷ oder MetaCyc recherchiert und gegebenenfalls die Massenbilanz im Netzwerk korrigiert. Die Schritte können zum Großteil durch raffinierte Algorithmen und Methoden der Bioinformatik automatisiert erfolgen[10, 53] und ein Rohentwurf der Rekonstruktion aus Datenbanken, wie der KEGG, heruntergeladen werden.

Risiken der automat. Erstellung Die Sequenz als einzigen Bezugspunkt zu verwenden, birgt einige Risiken: Die Enzym-Gen-Zuordnung kann falsch oder die Expression einiger Gene durch DNS-Methylierung unterbunden sein; Enzyme können andere Reaktionen als die für verwandte Zelltypen bereits berichteten katalysieren oder wichtige Gene des Stoffwechsels können aufgrund zu großer Sequenzunterschiede bei der Identifizierung übersehen werden. Entsprechend gering ist die Zuverlässigkeit ausschließlich genombasierter Netzwerke. Sie werden hauptsächlich für statistische Analysen verwendet[48, 128, 153].

Manuelle Überarbeitung Der qualitative Anspruch an Modelle, mit denen Stoffwechselflüsse vorhergesagt werden ist weitaus höher[47, 77, 67] und erfordert eine manuelle Überarbeitung des Netzwerks auf inhaltlicher Ebene (z.B. durch Hinzufügen organismus-spezifischer Reaktionen) und auf struktureller Ebene (z.B. durch Entfernen von Inkonsistenzen der Reaktions- und Metabolitbezeichner). Für die inhaltlicher Überarbeitung bieten Datenbanken wie BRENDA und ENZYME¹ eine wertvolle Unterstützung. Sie enthalten Informationen zu den von Enzymen bevorzugten Substraten und Cofaktoren, ihrer subzellulären Lokalisation, Stöchiometrien und der Umkehrbarkeit von Reaktionsrichtungen.

Notwendigkeit der Abgrenzung Wichtig für eine angemessene Repräsentation der zu modellierenden Stoffwechselfunktionen ist die Auseinandersetzung mit den Grenzen des Systems. Mit diesen Grenzen sieht man sich konfrontiert bei Prozessen:

- die im Detail noch nicht bekannt sind (wie z.B. die Herkunft der Schwefelatome in der Biotinsynthese[122]),
- deren detaillierte Betrachtung durch die kombinatorische Vielfalt der beteiligten Metabolite den Rahmen des Modells sprengen würden (z.B. die Fettsäuresynthese),
- deren Funktion sich anhand der Stöchiometrie nur schwer beschreiben lässt (z.B. der Elektronentransport in der Photosynthese) oder aber
- die der eigentlichen Definition einer Stoffwechselreaktion nicht ganz entsprechen, dennoch einen wichtigen Einfluss auf den Stoffwechsel haben und somit der doch recht willkürlichen und artifiziellen Beschränkung des modellierten Zellgeschehens auf den Stoffwechsel geschuldet sind. So einleuchtend und einfach die Unterteilung in Stoffwechsel und Nicht-Stoffwechsel zunächst scheint, so schwierig ist sie in Grenzfällen zu realisieren. Das prominenteste Beispiel hierfür ist die

⁴<http://www.brenda-enzymes.org/>

⁵<http://metacyc.org/>

⁶<http://www.membranetransport.org/>

⁷<http://www.genome.jp/kegg/>

¹<http://expasy.org/enzyme/>

Proteinsynthese und die Frage: Ist ein Protein ein Metabolit?

In den anfänglichen Modellen wurden komplexe Prozesse oftmals formal in einer einzigen Reaktionsgleichung zusammengefasst. In der Analyse erwies sich diese Vereinfachung jedoch oftmals von Nachteil, eine detaillierte Modellierung wird deshalb immer häufiger angestrebt[52]. Obwohl eine angemessene Art und Weise, einen zellulären Prozess im Modell abzubilden sich teilweise nur im Kontext einer spezifischen Fragestellung sinnvoll entscheiden lässt, werden die Systemgrenzen bereits im Rekonstruktionsprozess festgelegt. Die in der Literatur veröffentlichten (manuell überarbeiteten) Modelle sind daher immer auf die Beantwortung einer spezifischen Fragestellung ausgerichtet (meist die Produktion von Biomasse[52] oder die Erfüllung unterschiedlicher Stoffwechselziele[67]). Ihre Anwendung auf andere Fragestellungen bedarf somit einer erneuten Validierung und Anpassung.

*Modellieren
braucht Fragen*

Die detaillierte Rekonstruktion von Stoffwechselnetzwerken ist je nach Wissenstand und qualitativem Anspruch eine langwierige und aufwändige Arbeit. Durch gute Algorithmen und zunehmend komfortableren Datenbanken kann die Arbeit in großen Teilen automatisiert werden - zum Teil jedoch auf Kosten der Konsistenz und Verlässlichkeit der Daten. Die Überprüfung und Ergänzung der gesammelten Informationen ist daher von entscheidender Bedeutung, insbesondere bei der Definition der Systemgrenzen. Überarbeitete Modelle aus der Literatur sind daher wesentlich konsistenter, aber angepasst auf bestimmte Fragestellungen; die Anwendung auf andere Fragestellungen bedarf einer erneuter Überprüfung und Anpassung dieser Modelle.

Fazit

1.2.3 Analyse, Validierung, Evaluierung

Mögliche Ursachen für eine mangelhafte Repräsentation des Stoffwechsels gibt es viele: semi-automatische Erstellung des Grundgerüsts, unzureichende biochemische Charakterisierung einzelner Enzyme und Stoffwechselwege, Syntaxfehler, doppelte Bezeichnungen gleicher Metabolite oder fehlende Reaktionen. Dabei ist prinzipiell zwischen mangelnder Konsistenz und mangelnder Validität des Modells zu unterscheiden: ein konsistentes Modell ist in sich stimmig, kann aber Stoffwechselwege enthalten, die in Realität in der Zelle nicht vorkommen oder nicht benutzt werden. Ein valides Modell hingegen ist in sich stimmig und enthält (soweit möglich) nur nachweislich aktive Prozesse. Für die Validierung eines Modells ist somit viel biochemisches Wissen und der Abgleich mit experimentellen Daten notwendig, während Inkonsistenzen hauptsächlich durch strukturelle Analysen aufgedeckt werden.

*Unterschied:
Konsistenz &
Validität*

Im Zuge umfangreicher Rekonstruktionen (die überhaupt diese Bezeichnung erst rechtfertigen) ist man dazu übergegangen, in der Modellierung 3 (bis 4) Arbeitsschritte zu unterscheiden: Rekonstruktion, Validierung und Analyse. Diese Unterscheidung ist in der Praxis oft schwierig, da inhaltliche Unstimmigkeiten sich meist erst beim Abgleich späterer Analyseergebnisse mit experimentellen Beobachtungen zeigen, und nach jeder Änderung der Rekonstruktion die einzelnen Schritte erneut durchlaufen werden müssen. Darüber hinaus erfolgt die Validierung meist über die Modellierung. Der iterative Modellierungsprozess ist in Abbildung 1.8 dargestellt.

*Iterative
Modell-
erstellung*

So unterschiedlich die Quellen von Inkonsistenz und Invalidität, so unterschiedlich sind die Ansätze zu deren Bereinigung. Wir unterscheiden hier drei grundsätzliche Vorgehensweisen:

*Existierende
Konzepte*

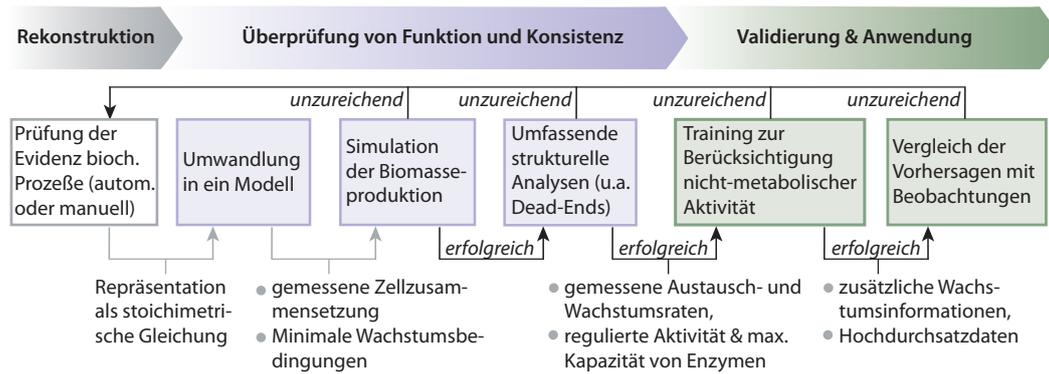


Abbildung 1.8: Iterativer Modellierungsprozess

Genombasiert Unter den Genen, denen noch keine Funktion zugeordnet wurde, wird über Sequenzhomologie zu funktionell bereits annotierten Genen nach enzymatischen Funktionen gesucht[71]. Alternativ werden Kandidatengene vorgeschlagen und anhand unterschiedlicher biochemischer Daten¹ die Wahrscheinlichkeit bestimmt, dass diese im jeweils betrachteten Organismus vorkommen[117].

Wissensbasiert Inkonsistenzen werden durch den Vergleich von *in silico*-Modellvorhersagen mit *in vivo* beobachteten Phänotypen aufgedeckt. Anschließend wird nach einer minimalen Anzahl von Reaktionen gesucht, die die Diskrepanz maximal verringern[161].

Topologiebasiert Zunächst werden Stellen im Netzwerk gesucht, an denen die Synthesewege unterbrochen sind. Dazu werden Reaktionen identifiziert, die keinen Fluss tragen können ("blockiert" sind). In einem mehrstufigen Algorithmus werden diese "Lücken" gefüllt, indem zusätzliche Reaktionsrichtungen erlaubt, neue Reaktionen einer Reaktionsdatenbank hinzugefügt oder betroffene Metabolite direkt importiert werden[117].

Fazit Um ein konsistentes und valides Modell zu erstellen, wurden Konzepte mit unterschiedlichem Fokus entwickelt. Auf Basis bekannten und digitalisierten Wissens wird das Hinzunehmen oder Entfernen einzelner Reaktionen (bzw. Enzyme) vorgeschlagen. Das sich jedoch alle Inkonsistenzen auf diese Weise "bereinigen" lassen ist unwahrscheinlich. Es sind vornehmlich Einzelfälle die den Prozess enorm verzögern – Fälle, die aufwändig recherchiert werden müssen, u.U. auf Lücken im derzeitigen Wissensstand verweisen und für die geeignete Annahmen getroffen werden müssen. Der Weg vom Rohentwurf zum validen Modell ist daher ein sehr zeitaufwändiger, iterativer Prozess – wenngleich nicht ohne Erkenntniswert.

1.2.4 Kinetische Modelle

*Trad. Modell-
erstellung:
Reaktion für
Reaktion*

Traditionelle, kinetische Stoffwechselmodellierung beginnt mit der Zusammenstellung von biochemischen Reaktionen, die für eine wohl definierte, konkrete Fragestellung relevant zu sein scheinen, nebst der entsprechend notwendigen Enzyme. Eine typische zu untersuchende Fragestellung wäre z.B. der Einfluss einer Pyruvatkinasedefizienz

¹z.B. mRNS-Co-Expression, Phylogenetische Profile, Analyse von Genclustern auf Chromosomen

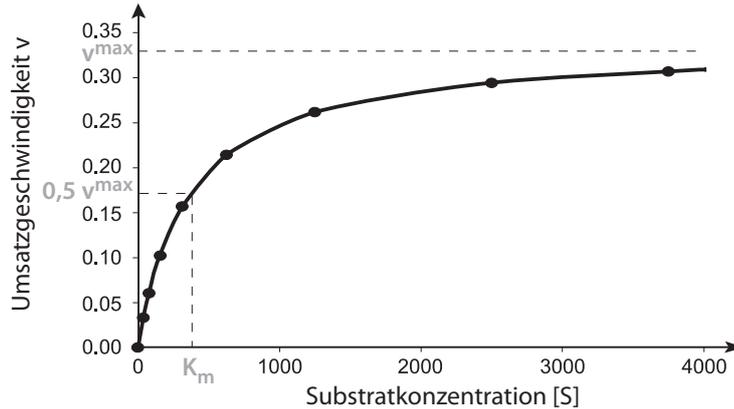


Abbildung 1.9: Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der Substratkonzentration laut Michaelis-Menten-Kinetik; die Michaelis-Menten-Konstante, K_m markiert die Substratkonzentration bei der das Enzym halbmaximal arbeitet.

auf den Energiestoffwechsel roter Blutkörperchen[82]. Für die katalysierenden Enzyme werden, je nach Verfügbarkeit, vereinfachte oder komplexe Gleichungen definiert, die die Kinetik der enzymatischen Katalyse beschreiben. Die dazu verwendete Umsatzrate ist definiert als Stoffumsatz pro Zeiteinheit. Sie ist abhängig von der Gesamtaktivität der katalysierenden Enzyme und von Metabolitkonzentrationen, insbesondere denen der Substrate.

Im einfachsten Fall werden Umsatzraten durch sogenannte irreversible Massenwirkungskinetiken beschrieben, die ausschließlich die Substratkonzentration berücksichtigen. Etwas komplexer (aber immer noch vergleichsweise einfach) ist die Michaelis-Menten-Kinetik¹. Sie beschreibt das Phänomen der Sättigung: bei sehr hohen Substratkonzentrationen $[S]$ kann die Umsatzgeschwindigkeit v nicht weiter gesteigert werden und es wird ein Maximalwert v_{max} erreicht:

$$v = k_{cat}[E] \frac{[S]}{K_m + [S]} = v_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (1.6)$$

Die Konstante K_m wird als Michaelis-Menten-Konstante bezeichnet. Sie entspricht der Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit gerade die Hälfte des Maximalwertes erreicht. Abbildung 1.9 veranschaulicht diesen Zusammenhang. Die Auswahl an Reaktionen und die verwendeten Enzymkinetiken werden korrigiert und fein justiert, bis die Simulation einen Ausgangspunkt zufriedenstellend abbilden kann.

Vernachlässigt man räumliche Verteilungseffekte, lässt sich die zeitliche Änderung der Konzentration eines Metaboliten $[M_i]$ anhand folgender Gleichung beschreiben:

$$\frac{d[M_i]}{dt} = \sum_{j=1}^n S_{ij} v_j - b_i, \quad (1.7)$$

Dabei werden die Flüsse aller in der *Stöchiometrischen Matrix* verzeichneten Reaktionen entsprechend ihrer Stöchiometrie bilanziert, d.h. verbrauchende Flüsse werden subtrahiert, synthetisierende Flüsse addiert. Der Anteil b_i repräsentiert dabei einen

¹eine 1913 von Leonor Michaelis und Maud Menten entwickelte spezifische Enzymkinetik

*Mathematische
Beschreibung
der Umsatzrate*

*Änderung der
Metabolit-
konzentration*

nicht näher spezifizierten Verbrauch eines Metaboliten M_i (falls $b_i > 0$) oder dessen Bildung (falls $b_i < 0$) außerhalb des betrachteten Systems.

Fließgleichgewicht & Stationarität

Unter relativ konstanten äußeren und internen Bedingungen, d.h. in Phasen, in denen die Zelle ungestört ihre Stoffwechselleistung erbringen kann (z.B. bei konstantem Zellwachstum in der exponentiellen Phase), sind die Schwankungen der internen Metabolikonzentrationen gering und die Abhängigkeit des Stoffumsatzes von der Metabolikonzentration ist vernachlässigbar. Um einen effizienten Stoffumsatz zu erzielen, ist anzunehmen, dass in solch einer Situation, Synthese und Verbrauch eines Stoffes sich in etwa entsprechen (*Fließgleichgewicht*), die Konzentration somit konstant bleibt und deshalb gilt:

$$\sum_j S_{ij}v_j - b_i = 0 \quad \forall i \in \mathbb{N}_m \quad (1.8)$$

Diese Annahme ist Grundlage verschiedener methodischer Ansätze und notwendige Vereinfachung für die Analyse mittlerer und großer Stoffwechselnetzwerke. Sie gilt immer dann, wenn die Zeit der Änderung eines geforderten Systemoutputs (oder eines möglichen Systeminputs) größer ist, als die Zeit bis zur eigentlichen Erfüllung dieser Stoffwechselleistung. Da die Zeit für die Beschreibung der Stoffwechselvorgänge unter dieser Annahme nicht mehr von Bedeutung ist und somit ein quasi stationärer Systemzustand beschrieben wird, bezeichnet man diese Annahme auch als Stationaritätsannahme (*steady-state*).

Anwendungen

Mit Hilfe der kinetischen Modellierung können dynamische Effekte untersucht werden: Simuliert und studiert werden können beispielsweise die durch Rückkopplungsmechanismen verursachten Oszillationen glykolytischer Intermediate[66], die Anhäufung von Metaboliten als Reaktion auf innere oder äußere Störungen oder das “Umschalten“ auf eine andere Substratquelle. Darüber hinaus ermöglicht die Suche nach und Untersuchung von stationären Zuständen ein Kennenlernen und Charakterisieren des modellierten Systems.

Fazit

Das Kinetische Modell erlaubt die Vorhersage stationärer und zeitabhängiger Netzwerkzustände bei variierenden internen und externen Bedingungen. Das Modell wird zielgerichtet und manuell, Reaktion für Reaktion, erstellt und verfeinert. Mit dem Anspruch an Genauigkeit wächst i.d.R. die Komplexität der Umsatzratengleichungen: Werden die Umkehr der Reaktionsrichtung oder inhibierende (oder aktivierende) Effekte durch andere Stoffe berücksichtigt, ist die Beschreibung der Enzymkinetik sehr aufwändig, und erfordert viele, oft unbekannte und schwer bestimmbare Parameter – für kleine und stark vereinfachte Systeme ist dies jedoch möglich und lohnend, wie zahlreiche erfolgreiche Simulationen zeigen[82, 183, 159].

1.2.5 Strukturelle (topologische) Stoffwechselmodellierung

Annahme der Stationarität

Im Gegensatz zur kinetischen Modellierung geht man bei der strukturellen Stoffwechselmodellierung ausschließlich vom stationären Zustand und einem Fließgleichgewicht aus. Es werden somit Umsatzraten vorhergesagt, die der Stationaritätsannahme in Gleichung 1.8 entsprechen. Während mit der kinetischen Modellierung zeitliche Prozesse beschrieben werden (ähnlich einem Videofilm), geben die hier berechneten stationären Flusszustände eine Momentaufnahme (Foto) des Stoffwechsels wieder. Als Konsequenz orientieren sich die Fragestellungen bei der Analyse großer Netzwerke eher an

den Unterschieden zwischen stationären Flusszuständen bei unterschiedlichen äußeren oder inneren Bedingungen. So können beispielsweise die Konsequenzen veränderter Enzymaktivität, die durch gezielte genetische Veränderungen oder entsprechende Enzyminhibitoren provoziert wurde, studiert werden oder experimentell überprüfbare Hypothesen, wie die Vorhersage des Überlebens genetisch veränderter Mikroorganismen für verschiedene Nährstoffangebote, generiert werden.

Die Anzahl der zur Beschreibung eines Systemzustandes verwendeten Gleichungen entscheidet über die *Bestimmtheit* des Systems. In der Mathematik unterscheidet man *überbestimmte Systeme*, bei denen die Anzahl unbekannter Variablen kleiner ist als die sie eingrenzenden (unabhängigen) Ungleichungen, und *unterbestimmte Systeme*, bei denen die Anzahl unbekannter Variablen die Anzahl an Ungleichungen übersteigt. Während das Gleichungssystem überbestimmter Systeme u.U. Inkonsistenzen enthält und nicht gelöst werden kann, können in unterbestimmten Systemen die Variablen nicht eindeutig bestimmt werden. Da im kinetischen Modell pro Reaktion eine Raten-gleichung formuliert wird und im Stoffwechselnetzwerk i.d.R. mehr Reaktionen als Metabolite enthalten sind, handelt es sich in der kinetischen Modellierung meist um überbestimmte Systeme. In stationären Modellen dagegen entspricht die Anzahl der Annahmen einer konstanten Metabolitkonzentration der Anzahl an Metaboliten, und die Systeme sind unterbestimmt.

Über- oder unterbestimmte Systeme

Der Vielzahl möglicher Lösungen unterbestimmter Systeme wird durch Verwendung eines Auswahlkriteriums begegnet (i.d.R. ein Kriterium optimaler Stoffwechselfunktion, siehe Abschnitt 1.2.6), oder die Lösungen werden explizit als Raum möglicher Stoffwechselaktivitäten betrachtet. Die strukturelle Netzwerkanalyse arbeitet mit diesem Lösungsraum: Sie beschreibt ihn durch repräsentative Vertreter (Flussvektoren bzw. -moden) und charakterisiert und vergleicht diese unter verschiedenen Bedingungen. Die Bestimmung repräsentativer Vertreter erfolgt durch Berechnung des sogenannten *right-null-space*, die im Folgenden erläutert wird.

Inhalt und Ziel

Vernachlässigt man die zusätzliche Verwendung oder Bildung von Metaboliten außerhalb der Systemgrenze, reduziert sich die Stationaritätsannahme (Gleichung 1.8) in Vektorschreibweise zu:

Right Null Space

$$SR = 0 \tag{1.9}$$

Für eine räumliche Vorstellung können die Zeilen der *Stöchiometrischen Matrix* S als Hyperebenen im Raum interpretiert werden, deren Schnittmenge den sogenannten "right null space", R , bildet. Dieser Raum wird aufgespannt durch unabhängige Flussvektoren (Spalten in R). Er beschreibt alle möglichen stationären Flusslösungen und erlaubt daher die Zerlegung jeder beliebigen stationären Flussverteilung als gewichtete Summe (Linearkombination) dieser unabhängigen Vektoren.

Sofern alle Reaktionen im Netzwerk nur in eine Richtung fließen (d.h. $v_i \geq 0$), entspricht der Lösungsraum der Schnittmenge des Raumes nicht-negativer Flüsse mit R und bildet einen vielfächigen Kegel (*flux cone*, siehe Abbildung 1.10). Enthält das Modell reversible Reaktionen, können diese in Vorwärts- und Rückwärtsfluss unterteilt werden, wobei sich die Anzahl der Dimensionen des Raumes entsprechend erhöht. Damit die Annahmen zur Irreversibilität ($v_i \geq 0$) innerhalb der linear kombinierten Flusslösung ihre Gültigkeit behalten, dürfen ausschließlich positive Wichtungsfaktoren für die Linearkombination verwendet werden. Vorteil der Arbeit im nicht-negativen (konvexen) Raum ist, dass die biologisch schwer zu interpretierenden negativen Wich-

Konvexer Raum: flux cone

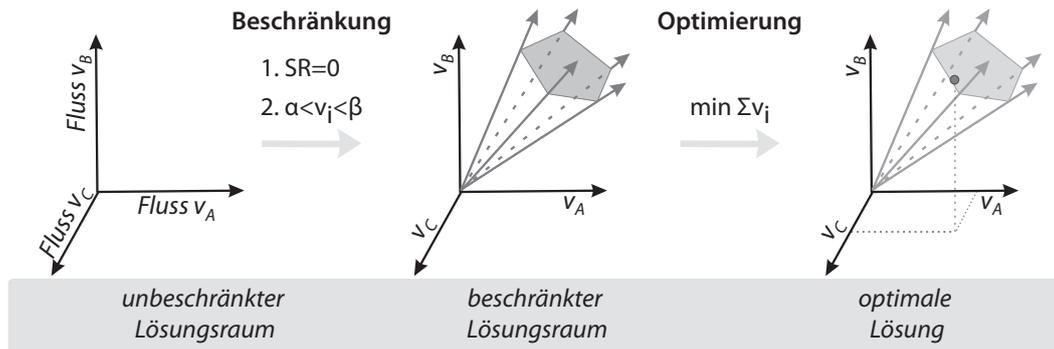


Abbildung 1.10: Eingrenzen möglicher Lösungen im nicht-negativen Raum durch Nebenbedingungen und Auswahl einer optimalen Lösung (siehe Optimierungsrechnung S.22)

tungen umgangen werden. Nachteil ist, dass die unabhängigen Vektoren der konvexen Basis nicht eindeutig bestimmbar, die Methoden der konvexen Analyse[32] nicht gut erforscht und die Probleme u.U. in endlicher Zeit nicht berechenbar sind (NP-Problem).

Konzepte unabhängiger Vektoren

Die Konzepte zur eindeutigen Bestimmung repräsentativer Vertreter unterscheiden sich voneinander im Umgang mit reversiblen Reaktionen und in der biologischen Interpretation der jeweils bestimmten Flussmoden. Die bekanntesten Konzepte sind: Elementarmoden[184, 186], Extreme pathways[177, 147] und Extreme currents[32]. Weitere mathematisch eindeutige Vektoren, wie das Set Generierender Moden[210]¹, sind aus Sicht biologischer Interpretation eher unvorteilhaft. Die einzelnen Konzepte (einschließlich ihrer mathematischen Grundlagen) werden in Schilling *et al.*[179] erläutert.

Elementarmoden & Extreme Pathways

Eine Elementarmode ist ein Fließgleichgewichtszustand, an dem ein minimaler Satz von Enzymen beteiligt ist. Minimal bedeutet in diesem Zusammenhang, dass – falls einzig diese Enzyme im Netzwerk aktiv wären – die vollständige Inhibition eines dieser Enzyme das Fließgleichgewicht zum Erliegen bringt. Elementarmoden können als alternative und objektive Definitionen von Stoffwechselwegen aufgefasst werden[185]. Die beiden anderen Modenkonzepte, *Extreme Pathways* und *Extreme Currents*, haben ein ähnliches Anliegen, behandeln reversible Flussrichtungen jedoch etwas anders[210]. Abbildung 1.11 veranschaulicht die Unterschiede von Elementarmoden, Extreme Pathways und Generierenden Moden.

Anwendungen

Sowohl Elementarmoden als auch Extreme Pathways fanden zahlreiche Anwendungen. Es wurden z.B.: i) die Bedeutung der Netzwerkstruktur für das Überleben eines Organismus bei genetisch bedingten Enzymdeletionen untersucht[195], ii) bekannte und unbekannte Stoffwechselwege analysiert[187], iii) Reaktionshäufigkeiten bestimmt und auf deren Bedeutung für den Stoffwechsel rückgeschlossen[145], iv) Inkonsistenzen des Netzwerks in Form unvollständiger (fehlender) Moden[36] oder unzulässiger Moden (thermodynamisch unmöglicher Zyklen)[156, 13] aufgedeckt, v) korrelierte Reaktionen bestimmt[111, 26] und vi) minimale Enzymsets bestimmt, deren vollständige Inhibition jeweils eine bestimmte Stoffwechselfunktion unterbindet (*minimal cut sets*)[107, 106]. Einen Überblick über Anwendungen von *Elementarmoden* und *Extreme Pathways* ge-

¹Generierende Moden sind eindeutig, sofern es sich um einen spitzen Kegel (pointed flux cone) handelt.

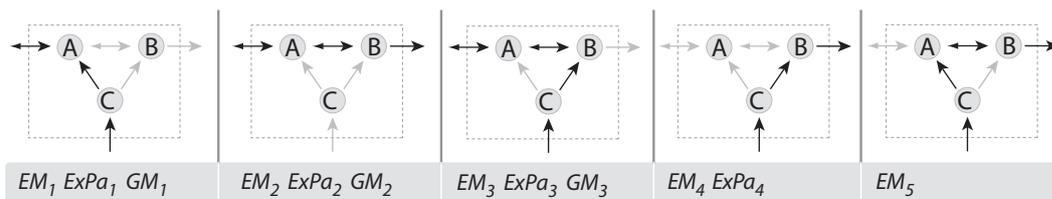


Abbildung 1.11: Illustration von EM - Elementarmode, ExPa - Extreme Pathway und GM - Generierende Mode. Die EM-Analyse unterscheidet zwischen Vorwärts- und Rückwärtsrichtung (d.h. Zufluss zu und Abfluss von A sind 2 Flüsse), EM_1 und EM_2 können daher EM_5 nicht darstellen. Die ExPa-Analyse trifft diese Unterscheidung nur für interne Flüsse, Austauschflüsse bleiben reversibel. $ExPa_1$ und $ExPa_2$ können somit EM_5 darstellen, während eine Darstellung von $ExPa_4$ aus $ExPa_2$ und $ExPa_3$ nicht möglich ist.

ben Papin *et al.*[146].

Durch die kombinatorische Explosion steigt die Anzahl notwendiger Einzelrechnungen und berechneter Elementarmoden mit der Netzwerkgröße stark an. Schwachpunkt der Elementarmoden und Extreme Pathways sind daher die Laufzeiten ihrer Berechnungen[110], die nötige Speicherkapazität und die Vielzahl der berechneten Moden. Die Parallelisierung und Entwicklung neuer Algorithmen beschleunigte die Berechnung merklich[65, 204, 200]. Die Anzahl der Moden ist meist gewaltig: z.B. gibt es für ein Stoffwechselmodell von 106 Reaktionen (bei 1 Substrat und 5 Produkten) bereits 27 100 Elementarmoden. Das Hinzufügen von 3 weiteren Substraten erhöht diese Zahl auf 507 632[65]. Für genomweite Netzwerke bewegt sich die Anzahl im Millionenbereich[200]. Als Konsequenz wird häufig Statistik "betrieben" mit entsprechend mageren, weil inhaltlich begrenzten Ergebnissen. Alternativ wird versucht die Moden unter physiologischen Gesichtspunkten zu filtern[34, 188]. Dabei wird aus den Moden, die das Bewertungskriterium (z.B. eine Mindestbiomasseausbeute) erfüllen, ein Unterraum aufgespannt, der der Beantwortung einer spezifischen Fragestellung dient[184, 186, 116].

*Schwachpunkt:
Rechenzeiten &
Vielzahl*

Ein weiterer Anwendungsbereich der strukturellen Analyse ist die Erhaltung molekularer Teilstrukturen: Da im stationären Zustand die Metabolite im System nicht abfließen oder sich anhäufen können, müssen molekulare Teilstrukturen, die nicht den aufgenommenen Substraten entstammen (z.B. Schwefelgruppen, die nicht in der Glucose enthalten sind) im System verbleiben, werden somit lediglich von einem Metabolit zum nächsten weitergereicht[172]. Ein typisches Beispiel sind die Adeninnukleotide: Kann der Adeninrest im Netzwerk nicht *de-novo* synthetisiert werden, so können weder ATP, noch ADP oder AMP *de-novo* synthetisiert, sondern ausschließlich ineinander umgewandelt werden. Die Summe ihrer Konzentrationen ist daher immer konstant.

Stofferrhaltung

Die Menge der Metabolite, die an solch einem Kreislauf beteiligt sind, bezeichnet man als "conserved moiety" oder Erhaltungsbedingung. Sie sind von Interesse, wenn es um Inkonsistenzen und die Synthesekapazität eines Netzwerks geht: Die Erhaltung von Teilstrukturen innerhalb der Mitglieder einer solchen Bedingung weist auf das Unvermögen des Netzwerks diese zu synthetisieren hin. Anwendung finden Erhaltungsbedingungen daher z.B. in der Bestimmung minimaler Medienzusammensetzungen. So berechneten Imielinski *et al.*[91] sogenannte "extreme semipositive conservation relations" (ESCR), deren Kenntnis es erlaubt, eine minimale Anzahl von Substraten zu

Bedeutung

bestimmen, die für die Synthese wichtiger Metabolite mindestens im Medium enthalten sein müssen.

Berechnung: Die Bestimmung der Erhaltungssätze erfolgt über die Analyse des sogenannten “left null space”:
Left null space

$$LS = 0 \tag{1.10}$$

Diese Analyse ergibt Metabolitkombinationen, deren Konzentrationen in der Gesamtsumme jeweils konstant bleibt und die unterschieden werden können in Erhaltungsbedingungen einzelner chemischer Elemente, chemischer Gruppen oder ganzer Moleküle bzw. Cofaktoren[51]. Ähnlich zur Analyse des “right null space” ist auch hier durch kombinatorische Explosion die Berechnung für genomweite Netzwerke kaum möglich. Bestimmte Algorithmen vermögen dies zum Teil zu beheben[205]. Alternativ kann die Optimierungsrechnung verwendet werden. Einen entsprechenden Ansatz, “metabolite concentration coupling analysis“ (MCCA), haben Nikolaev *et al.*[139] vorgeschlagen.

Fazit Die Vielzahl an möglichen Stoffwechselleistungen lassen sich mit Methoden der *Strukturellen Modellierung* vollständig beschreiben. Einfach gesagt zeigen diese Methoden alle fundamentalen Pfade auf, entlang derer Stoffe ineinander umgewandelt werden können. Als Linearkombination sind sie in der Lage, jeden möglichen stationären Flusszustand (vielfach) zu beschreiben. Durch die kombinatorische Vielfalt ist die Anzahl dieser Moden selbst für ein mittelgroßes Netzwerk jedoch bereits enorm[110] und für Reaktionsnetzwerke von mehreren hundert Reaktionen in akzeptabler Zeit kaum berechenbar[65]. Verbesserte Algorithmen kommen der Berechenbarkeit und Rechenzeit zwar zunehmend entgegen[200], ersparen dem Nutzer aber nicht die Durchsicht und Interpretation dieser Vielzahl von Flusslösungen (bis zu 5 Mio.), zumal den wenigsten dieser Moden eindeutig eine spezifische Funktion zugewiesen werden kann.

1.2.6 Die Flussbilanzanalyse

Björn und Peter sollen als Organisatoren eines Jugendzeltlagers Zelte kaufen. Zwei Zeltypen sind im Angebot: ein 10-Personen Zelt für 200,-Euro, wovon es allerdings nur noch 5 Stück vorrätig gibt, und ein 15-Personen Zelt für 400,-Euro, allerdings sind nur noch 4 Stück vorrätig. Insgesamt stehen 1800,-Euro zur Verfügung und es sollen möglichst viele Kinder untergebracht werden. Wie viele Zelte von welchem Typ sollten Björn und Peter jeweils kaufen?

Anwendung Aufgaben dieser Art – mit klaren Beschränkungen (hier: das zur Verfügung stehende Geld und die vorrätigen Zelte), mit Variablen (Anzahl der von jedem Typ zu kaufenden Zelte) und einer Angabe, unter welchem Gesichtspunkt diese Variablen im optimalen Fall besetzt werden sollten (die Anzahl der Kinder, die darin maximal untergebracht werden sollen) – lassen sich gut als (lineare) Optimierungsprobleme formulieren. Entdeckt wurde die Optimierungsrechnung 1939 durch den sowjetischen Mathematiker Leonid Witaljewitsch Kantorovich[101] im Zuge der Optimierung militärischer Strategien. Nach dem 2. Weltkrieg, als die Ressourcen knapp waren, wurde sie vorrangig zur Gewinnoptimierung in der Wirtschaft eingesetzt und weiterentwickelt.

Ziel Ziel aller Optimierungsverfahren ist es, unter Berücksichtigung vorgegebener Einschränkungen die beste Lösung und somit den besten Kompromiss zwischen mehreren

(z.T. sich widersprechenden) Anforderungen zu finden[11]. Für die Beschreibung eines Optimierungsproblems sind daher folgende Komponenten notwendig: i) Variablen, die während der Suche verschiedene (kontinuierliche oder diskrete) Werte annehmen können, ii) Gleichungen und Ungleichungen, die die Lösung des Problems beschränken, und iii) eine Zielwertfunktion, die es erlaubt, die Qualität einer gefundenen Lösung quantitativ zu bewerten. Dabei kann die Maximierung des Zielwertes durch Multiplikation der Zielfunktion mit -1 in eine Minimierung umgewandelt werden.

Das oben genannte Beispielproblem lässt sich mit den ganzzahligen Variablen x (Anzahl der 10-Personenzelte) und y (Anzahl der 15-Personenzelte) wie folgt als lineares Optimierungsproblem formulieren:

Mathematische Formulierung des Problems

$$\begin{array}{ll} \text{maximize} & 10x + 15y \\ \text{subject to} & 200x + 400y \leq 1800 \\ & x \leq 5 \\ & y \leq 4 \end{array}$$

Zur Lösung linearer Optimierungsprobleme stehen kommerzielle und nicht-kommerzielle Solver zur Verfügung, die Algorithmen der Innere-Punkt-Methode oder des Simplex-Algorithmus verwenden (für Details siehe Seite 109). In der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich der Simplex-Algorithmus zweier kommerzieller Solver angewendet: Lineare Optimierungsprobleme werden mit dem CPLEX Optimizer (Version 10.0) von ILOG/IBM¹, Quadratische Optimierungsprobleme mit der LINDO API 5.0² gelöst.

Verwendete Solver

Erstmals dokumentiert sind Anwendungen der linearen Optimierung auf Stoffwechselprozesse 1984 durch M.R. Watson[212]. Grundlage war die Annahme, die zelluläre Stoffwechselregulation strebe nach einem möglichst effizienten Einsatz der verfügbaren chemischen Energie[9]. Gerechtfertigt wird diese Annahme angesichts der beeindruckenden morphologischen, als auch stoffwechselregulatorischen Anpassungsfähigkeit von Organismen an ihre Umgebung³, die nahe legen, dass sich das interne zelluläre Geschehen im Laufe der Zeit ebenfalls optimiert hat. Damit verbunden ist eine zelluläre Organisation, die die optimale Anpassung der Aktivität von Stoffwechsellzymen an das momentane Nährstoffangebot und der aktuell benötigten Zelleistung gewährleistet.

Anwendung auf biologische Systeme

Um die Stoffflüsse mit Optimierungsverfahren vorherzusagen benötigt man: i) die *Stöchiometrische Matrix*, ii) die Definition externer Metabolite, die der Stationaritätsbedingung nicht unterliegen, bzw. für die $b_i < 0$ oder $b_i > 0$ gilt, iii) Zielmetabolite, d.h. Metabolite, die einzelne Stoffwechselfunktionen beschreiben, sowie optional iv) Informationen zur Umkehrbarkeit von Reaktionen und schließlich v) das Optimierungskriterium. Im Gegensatz zu vielen anderen Anwendungen der Optimierungsrechnung ist das Optimierungskriterium, nach dem sich der Stoffwechsel reguliert, der Wissenschaft nicht bekannt. Für die Vorhersage von Stoffwechselflüssen in biologischen Systemen bleibt also der inverse Weg: verschiedene Kriterien zu testen, um unter Anwendung

Benötigte Informationen

¹<http://www-01.ibm.com/software/integration/optimization/cplex-optimizer/>

²<http://www.lindo.com/>

³Beispiele: der Waldfrosch (*Rana sylvatica*), dessen Körperflüssigkeiten für Tage oder Wochen bis zu 70% gefroren sein können[46], Tibeter, die genetisch bedingt einen niedrigeren Hämoglobinspiegel aufweisen[194], oder die Darwinfinken, deren Schnabelgröße über knackbare Körner entscheidet und den am besten angepassten Artgenossen das Überleben sichert[17]

Maximierung der Metabolitsynthese	Varma <i>et al.</i> , 1993[206]
Maximierung der ATP-Produktion	Majewski <i>et al.</i> , 1990[125], Ramakrishna <i>et al.</i> , 2001[158]
Minimierung der Summe aller Flüsse	Bonarius <i>et al.</i> , 1996[20], Holzhütter, 2004[83]
Minimierung der Substrataufnahme	Savinell <i>et al.</i> , 1992[173]
Minimierung der NADH-Produktion	Savinell <i>et al.</i> , 1992[173]
Minimierung der ATP-Produktion	Savinell <i>et al.</i> , 1992[173]

Tabelle 1.1: Mögliche Optimierungskriterien

der Optimierungsrechnung Stoffwechselflüsse vorherzusagen, die mit den experimentellen Ergebnissen möglichst übereinstimmen.

Flussbilanzanalyse (FBA) In den 80er Jahren wurde die Gültigkeit der Stationaritätsbedingung durch den Vergleich mit Ergebnissen kinetischer Modelle kritisch untersucht[143, 144]. Aufbauend auf diese Arbeiten veröffentlichten Savinell und Palsson 1992 den mathematischen Formalismus[173], der kurze Zeit später in der Arbeit von Varma *et al.*[207] als “flux balance analysis“, als Flussbilanzanalyse, kurz FBA, bekannt wurde. Das verwendete Optimierungskriterium variiert dabei je nach Fragestellung. Einige Kriterien linearer Optimierungsprobleme sind in Tabelle 1.1 aufgelistet, wobei in dieser Arbeit hauptsächlich das Kriterium der Flussminimierung nach Holzhütter[83] verwendet wird.

Flussminimierung Das Prinzip der Flussminimierung basiert auf der Annahme, dass in frühen Phasen der evolutionären Entwicklung der Wettbewerb um begrenzte externe Ressourcen diejenigen Organismen begünstigt hat, die alle lebenswichtigen Funktionen (z.B. Wachstum, DNS-Reparatur, Abwehr toxischer Stoffe) mit minimalem Aufwand erfüllen konnten. Unter minimalem Aufwand wird dabei eine möglichst geringe Anzahl beteiligter Enzyme und eine möglichst geringe Umsatzrate verstanden. Unter Vorgabe einer Anzahl zu erfüllender Flüsse $v_z > 0$, die eine spezifische Stoffwechselfunktion der Zelle widerspiegeln, wird daher ein stationärer Zustand gesucht, in dem die Summe aller Flüsse minimal wird. Validiert wurde dieses Kriterium anhand experimenteller Messwerte und Simulationen eines gut validierten kinetischen Modells[83]. Ein Vorteil dieses Kriteriums ist die flexible Erweiterbarkeit: Varianten dieser Methode berücksichtigen begrenzte Flusskapazitäten, die Katalyse mehrerer Reaktionen durch ein und dasselbe Enzym sowie die vollständige oder partielle Enzyminhibition[85, 84]. Für die Berücksichtigung thermodynamischer Prinzipien wurde die Kombination mit dem Konzept der *Thermodynamischen Realisierbarkeit* (TR) vorgeschlagen[87].

Biomassemaximierung Das Optimierungskriterium, das nach wie vor häufig gewählt wird und deshalb oftmals mit FBA in Zusammenhang gebracht wird, ist die Maximierung der zellulären Wachstumsrate[177, 180]. Begründet wird dieses Kriterium damit, dass im Wettbewerb um Ressourcen in der Natur und unter Laborbedingungen schnell-wachsende Organismen einen Selektionsvorteil erfahren[4]. Dies gilt laut Almaas *et al.*[4] jedoch nur unter folgenden Bedingungen:

1. der Organismus arbeitet optimal, d.h. seine Funktion ist nicht beeinträchtigt von den Folgen interner Störungen,
2. der Organismus befindet sich in der exponentiellen Wachstumsphase, d.h. die Zellpopulation verdoppelt sich in regelmäßigen Abständen,

3. die Umgebung ändert sich nicht.

Dem Organismus wird dabei unterstellt, dass er jederzeit einen optimalen Kompromiss der Synthese einzelner Stoffe zugunsten der Gesamtsynthese findet. Bei konstanten Umgebungsbedingungen (Labor!) mag das sinnvoll sein, weshalb Wachstumsraten für verschiedene Substrate erfolgreich vorhergesagt werden konnten[49]. Ändern sich jedoch die äußeren Bedingungen (z.B. das Substratangebot) und mit ihnen der Bedarf einzelner Stoffe, würde die Abhängigkeit der einzelnen Stoffsynthesen voneinander u.U. eine Neuorganisation des gesamten Flussgeschehens bedeuten, damit sich ein optimaler Gesamtzustand wieder einstellt. Da Mikroorganismen meist einer komplexen und variablen Umgebung ausgesetzt sind, ist eine unabhängige Regulation und Kontrolle einzelner Stoffsynthesen, zumindest in Teilen, wahrscheinlicher.

Kritik

Verlässt man den Bereich der linearen Programmierung und erlaubt zum einen ganzzahlige Variablen, zum anderen quadratische Terme in Zielfunktion und Nebenbedingungen, erhält man Optimierungsprobleme, die weitaus schwieriger zu lösen sind (MILP und QP-Probleme, siehe Seite 109), die aber andererseits vielfältige Möglichkeiten bieten, biochemische Sachverhalte in der Vorhersage zu berücksichtigen. Die Kreativität, die die Wissenschaftler dabei entfalten, spiegelt sich in der vielseitigen Anwendung wieder. Die Vorhersage umfasst daher neben Stoffwechselfläüssen ebenso Genexpressionsänderungen[193], Änderungen des Stoffflusses nach Gen-Knock-out[190, 192], Wirkstoffziele (d.h. zu blockierender Gene bzw. zu inhibierender Enzyme, um die Synthese relevanter Biomassevorläufermetabolite möglichst effektiv zu unterbinden)[148, 25, 151] sowie minimale Korrekturen der Netzwerkstruktur, um Flussvorhersagen in bessere Übereinstimmung mit experimentellen Ergebnissen zu bringen[80]. Einen Überblick über FBA-Varianten bietet der Review von Kim *et al.*[103].

FBA

Anwendungen

Die schnelle Berechenbarkeit und die Flexibilität, mit der verfügbare Daten in die Rechnung integriert werden können, machen die Flussbilanzanalyse für die Analyse großer Stoffwechselnetzwerke besonders attraktiv. Die Wahl des Optimierungskriteriums erfolgt jedoch intuitiv und die Vorhersagen sind daher sehr hypothetisch. Die mit Hilfe der FBA insbesondere für Mikroorganismen häufig simulierte Stoffwechselfunktion ist die Biomasseproduktion. Dafür wird i.d.R. eine Flussverteilung bestimmt, die die optimale Synthese aller für das Wachstum benötigten Metabolite beschreibt. Die dieser Rechnung zugrunde liegende Abhängigkeit einzelner Stoffsynthesen voneinander ist angesichts variierender Umgebungsbedingungen nicht unbedingt gerechtfertigt.

Fazit

1.3 Zielstellung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die optimierungsbasierte Vorhersage von Stoffwechselfläüssen unter Berücksichtigung einer modularen Stoffwechselorganisation. Dazu wird angenommen, dass jede Flussverteilung das Ergebnis einer überlagerten Aktivität einzelner Module ist. Eine mögliche Definition solcher Module im Hinblick auf den Stoffwechsel ist die Bestimmung einer Menge von Enzymen, die zur Synthese eines Stoffes beitragen, ein "Synthese-Modul". Dies ist in zweierlei Hinsicht von Vorteil: 1. ermöglicht es eine unabhängige Regulation und Kontrolle einzelner Stoffsynthesen, 2. betreffen Störungen und Schäden im Syntheseprozess nur einzelne Metabolite.

Die Module sollen einfach zu implementieren, schnell zu berechnen und gut erweiterbar sein, um gegebenenfalls zusätzlich verfügbare Daten leicht integrieren zu können. Als Grundmodell dienen daher stationäre Flusslösungen, die die Synthese eines einzigen Metaboliten beschreiben. Sie sind minimal hinsichtlich ihrer Stoffwechsellistung und werden als minimale Flussmoden (MinModen) bezeichnet. Als universelles und flexibles Optimierungskriterium eignet sich die von Holzhütter vorgeschlagene Flussminimierung[83]. Je nach aktuellem Bedarf einzelner Stoffe können diese Module unabhängig voneinander linear kombiniert werden, um eine komplexe Stoffwechselfunktion (z.B. zelluläres Wachstum) zu realisieren.

Neben alternativen Optimierungskriterien, sollen unterschiedliche Arten der Berücksichtigung thermodynamischer Prinzipien und die Integration verfügbarer Messdaten in die MinModen-Berechnung untersucht werden. Die Vorhersagen sollen mit bisherigen Konzepten verglichen und anhand experimentell bestimmter Stoffflüsse evaluiert werden. Weiterhin soll untersucht werden, welchen Beitrag die Bestimmung verfügbarer Synthese-Module für die strukturelle Analyse großer Stoffwechselnetzwerke leisten kann.

Ein wesentlicher Fokus der Betrachtungen liegt aber auf dem geänderten Bedarf einzelner Synthese-Module und damit auf dem geänderten Bedarf einzelner (Vorläufer-)Metabolite. Über deren Vorhersage erhoffen wir uns Hinweise auf zelluläre Strategien beim Übergang von einem in den anderen Zustand. Dazu soll untersucht werden, inwieweit sich Flussänderungen anhand von Enzymkonzentrationsänderungen vorhersagen lassen und wie sich die zellulären Bedürfnisse dabei ändern.

2 Das Konzept minimaler Flussmoden

Hoffmann S, Hoppe A and Holzhütter HG. (2006) *Composition of Metabolic Flux Distributions by Functionally Interpretable Minimal Flux Modes (MinModes)* Genome Informatics, 17(1), 195-207.

2.1 Einleitung

Die Systembiologie möchte Verbindungen zwischen den biologischen Komponenten herstellen, um diese in ihrem Zusammenwirken zu begreifen¹. Bezogen auf den Stoffwechsel interessiert dabei, wie die verschiedenen Stoffwechselwege ineinander greifen und wie durch ihr konzertantes Wirken eine komplexe Stoffwechselleistung, wie die Vervielfältigung einer Zelle, hervorgebracht werden kann. Da die kinetische Modellierung als die genaueste und am zufriedenstellendste Methode auf größere, komplexe Netzwerke nicht anwendbar ist (siehe Seite 16), stehen zur Beantwortung dieser Frage derzeit zwei Methoden mit unterschiedlichem Fokus zur Verfügung: die strukturelle Stoffwechsellmodellierung und die Flussbilanzanalyse.

Ziel

Die Vielzahl an möglichen Stoffwechselleistungen lassen sich mit Methoden der Strukturellen Modellierung vollständig beschreiben. Durch die kombinatorische Vielfalt ist die Anzahl der häufig zur Lösungsraumbeschreibung verwendeten Elementarmoden oder Extreme Pathways selbst für ein mittelgroßes Netzwerk enorm groß und für Reaktionsnetzwerke von mehreren hundert Reaktionen u.U. nicht mehr berechenbar[109]. Darüber hinaus ist ihre Berechnung schwer kombinierbar mit zusätzlichen biochemischen oder biophysikalischen Einschränkungen oder Stoffwechselzielvorgaben. Dem gegenüber bestimmt die Flussbilanzanalyse (FBA) innerhalb des Lösungsraumes einen Weg, entlang welchem ein optimal regulierter Stoffwechselfluss fließen sollte. Statt einem Lösungsraum liefert diese Methode nur eine einzige Lösung, deren Aussagekraft maßgeblich vom Ausschließen unphysiologischer Lösungen durch geeignete Nebenbedingungen und der Wahl eines geeigneten Kriteriums zur Bestimmung von Optimalität abhängt. Eine kompakte, flexible und gleichzeitig physiologisch-interpretierbare Beschreibung der Vielzahl von Stoffwechselleistungen großer Netzwerke ist weder durch Moden- noch durch FBA-Konzepte möglich.

Problem

In dieser Dissertation wird die Idee verfolgt, beide Ansätze zu kombinieren: es werden mehrere optimal regulierte Flussverteilungen vorhergesagt und mit diesen ein verkleinerter Lösungsraum beschrieben. Dieser enthält ausschließlich Lösungen, die dem Bewertungskriterium entsprechen und die idealerweise physiologisch sinnvoll und mit experimentell beobachteten Flüssen in Übereinstimmung sind. Aber selbst wenn nicht,

Idee

¹Diese Komponenten können sowohl verschiedene Zelltypen, Proteine verschiedener Informationsebenen oder, wie in diesem Fall, verschiedene Stoffwechselwege repräsentieren

ermöglicht der begrenzte und noch übersichtliche Raum uns vielleicht, Erkenntnisse über grundlegende Prinzipien zu erhalten.

Ansatz Die optimalen Flussverteilungen beschreiben jeweils die optimale Synthese eines Zielmetaboliten, welcher Teil eines komplexen Stoffwechselzieles (z.B. Produktion von Biomasse) ist. Wir bezeichnen eine solche Flussverteilung aufgrund ihrer minimalen Stoffwechselleistung als “minimal flux mode”, kurz *MinMode*. Sie ist wie folgt definiert:

*Eine **MinMode** ist eine stationäre Flussverteilung, die als einziges Stoffwechselziel eine vorgegebene Zielreaktion mit einem Fluss von eins umsetzt. Handelt es sich bei der Zielreaktion um eine, einen Metaboliten aus dem System abführende Reaktion, beschreibt die stationäre Flussverteilung somit die Synthese eines einzigen Metaboliten, sprechen wir von einer Metabolit-MinMode (MetabMinMode).*

Im Folgenden wird ausschließlich mit MetabMinModen gearbeitet, wobei wir uns auf die Bezeichnung MinMode beschränken.

Formulierung bei Verwendung der Flussminimierung

Obwohl die Verwendung anderer Optimierungskriterien nicht ausgeschlossen ist, wird in diesem Kapitel ausschließlich das Prinzip der Flussminimierung nach Holzhütter[83] angewendet. Dabei werden Flussverteilungen bestimmt, die jeweils nur einen Zielfluss erfüllen ($v_z = 1$), während alle anderen Zielflüsse keinen Fluss tragen dürfen. Um ausschließlich mit positiven Flusswerten rechnen zu können, wird zwischen dem Fluss in Vorwärts-, v_j^+ , und Rückwärtsrichtung, v_j^- , unterschieden. Dabei gilt, dass die Reaktionen in Richtung freiwerdender Gibbs-Energie notiert ist, d.h. $\Delta_R G^\circ < 0$ bzw. $k_i \geq 1$. Die Umkehrbarkeit der Reaktionen wird anhand der Gleichgewichtskonstanten bestimmt. Dazu wird angenommen, dass Konzentrationsgefälle oberhalb einer festgelegten Grenze nicht auftreten, d.h. Reaktionen mit einer Gleichgewichtskonstante $k > k^{max}$ gelten als irreversibel. Unterhalb dieser Grenze wird durch die Gewichtung des Rückflusses mit der Gleichgewichtskonstanten die thermodynamisch unwahrscheinlichere Reaktionsumkehr ”bestraft“. Das Optimierungsproblem lautet daher wie folgt:

$$\begin{aligned} \text{minimize} \quad & \sum_i v_j^+ + k_j v_j^- \\ \text{subject to} \quad & \sum_{j=1}^n S_{ij}(v_j^+ - v_j^-) \quad \forall i \in \mathbb{N}_m \\ & v_z = 1 \end{aligned} \tag{2.1}$$

Durch Hinzufügen weiterer Nebenbedingungen ($v_j = 0$) kann die Aufnahme nicht verfügbarer Substrate bzw. die Synthese anderer Zielmetabolite oder Nebenprodukte unterbunden und der Lösungsraum weiter eingeschränkt werden.

MinModen-Kombination kontra Globale Optimierung

Statt einer gleichzeitigen Optimierung aller Stoffwechselsynthesen, im Folgenden als *globale Optimierung* bezeichnet, nehmen wir die unabhängige Optimierung einzelner Stoffwechselziele an. Damit verbinden wir die Möglichkeit des Organismus, Stoffsynthesen unabhängig voneinander regulieren zu können. Die MinModen (ihre Anzahl entspricht der Zahl der definierten Stoffwechselziele) spannen einen Lösungsraum auf innerhalb dessen durch gewichtetes Aufsummieren die Flussverteilung einer komplexen Syntheseleistung dargestellt werden kann, die sogenannte *MinModen-Kombination*. Da die Menge der MinModen im Allgemeinen kleiner ist, als die Vektoren der konvexen

Basis (oder des Vektorraumes), ist der von ihnen aufgespannte Lösungsraum ebenfalls kleiner als der durch stationäre Bedingungen und Netzwerkstöchiometrie definierte Raum.

2.2 Anwendung: Wachstum von *M. extorquens* auf Methanol

Die Schwierigkeit bei der Entwicklung von Methoden zur Flussvorhersage ist deren Validierung. Während sich die FBA-Analyse aufgrund ihres recht bescheidenen Bedarfs an biochemischem Vorwissen (Stöchiometrie ist ausreichend) und dem vergleichsweise geringem Rechenaufwand für die Analyse großer Netzwerke (mit über 1000 Reaktionen) eignet, kann der radioaktiv markierte Kohlenstoff in den aufgenommenen Substraten nur bis zu einem gewissen Grad im Netzwerk verfolgt werden: Der Verdünnungseffekt und die Detektionsgrenze begrenzen die experimentelle Flussabschätzung auf eine weitaus geringere Anzahl von 20 bis 50 Reaktionen[45, 50, 59, 93].

Das Konzept minimaler Flussmoden wird daher auf das mittelgroße Stoffwechselmodell von *Methylobacterium extorquens* angewendet. Es werden Flussvorhersagen berechnet, die die Synthese wachstumsnotwendiger Zielmetabolite sowohl global als auch einzeln optimieren. Die Vorhersagen durch *globale Optimierung* und *MinModen-Kombination* werden anschließend miteinander verglichen.

Das pink-pigmentierte *Methylobacterium extorquens* gehört zu den methylotrophen Organismen, d.h. es ist in der Lage, Substrate ohne C-C-Bindung als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwerten[29]. Methanol ist ein solches Substrat. Es ist relativ leicht zugänglich und macht damit das Bakterium für die Entwicklung umweltfreundlicher mikrobieller Katalysen von Methanol in andere Produkte, wie Aminosäuren, Vitamin B12 oder Coenzym Q10, für Biotechnologen interessant¹.

*Der
Organismus*

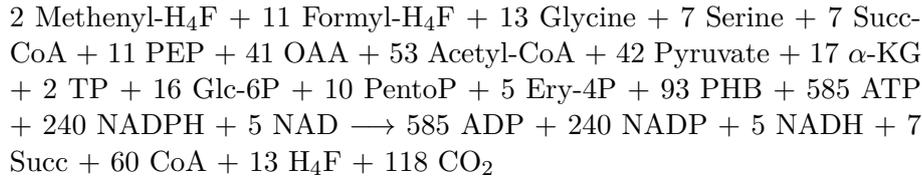
Das hier verwendete Modell wurde ursprünglich von Van Dien *et al.*[43, 45] entwickelt und von uns, basierend auf neueren Erkenntnissen bezüglich der Verbindung zwischen dem H₄MPT- und dem H₄F-Zyklus im Formaldehyd-Stoffwechsel[152], leicht modifiziert[83, 42]. Das Modell besteht aus 68 biochemischen Reaktionen verschiedener Stoffwechselwege (Zitratzyklus, Glykolyse, Glukoneogenese, Pentosephosphat-Stoffwechsel, poly- β -hydroxy-butyrat-Synthese, Oxidative Phosphorylierung, Serin-Biosynthese, Formaldehyd-Stoffwechsel, sowie Serinzyklus), 48 davon werden als reversibel angenommen. Acht Transportreaktionen erlauben den Austausch von Methanol, CO₂, Ameisensäure, Glycin, Formaldehyd, Pyruvat, Serin und Succinat. Auf die Zuordnung von Protonen, Phosphat und Wasser zur vollständigen Atom-Bilanzierung wird verzichtet; Protonen werden lediglich an Stellen in das Reaktionssystem aufgenommen, an denen sie am Aufbau des Protonengradienten beteiligt sind. Eine Übersicht der enthaltenen Reaktionen, einschließlich der verwendeten Gleichgewichtskonstanten findet sich in Tabelle 2.1, für eine grafische Darstellung des Modells siehe Abbildung 2.1.

*Das Stöchio-
metrische
Modell*

Das Stoffwechselziel – die Zellervielfältigung beim Wachstum auf Methanol – kann zusammenfassend durch folgende Reaktion dargestellt werden (nach van Dien *et al.*[43]):

Zielmetabolite

¹Für alternative C₂-, C₃- und C₄-Substrate siehe Korotkova *et al.*[113].



Der Bedarf jedes Zielmetaboliten (Edukte) pro Mol Biomasse (und pro Zeiteinheit) basiert auf stöchiometrischen Informationen aus dem Stoffwechselmodell von *Escherichia coli* und experimentellen Messungen der makromolekularen Biomassezusammensetzung[43]. Der Bedarf an ATP und NADPH berücksichtigt die notwendige Energie für: die Synthese der Grundbausteine und Vorläufermetabolite, deren Zusammensetzung zu Makromolekülen, weitere energieaufwändige Prozesse, die unmittelbar mit der Metabolitsynthese oder der Zellerhaltung und -vermehrung verbunden sind¹.

Da für die Bestimmung minimaler Flussmoden die Beiträge zur Biomasse einzeln verlangt werden, wird statt dieser kompakten Gleichung für jeden Zielmetabolit ein zusätzlicher Abfluss dem Modell hinzugefügt, bzw. bei Erhaltungsgrößen ein gleichzeitiger Zufluss des Partners (siehe Reaktionen 77 bis 93).

Bestimmung minimaler Flussmoden (MinModen) Alle berechneten Flussmoden in diesem Kapitel werden unter dem Kriterium der Flussminimierung optimiert. Reaktionen mit einer Gleichgewichtskonstante $k > 1000$ werden im Modell per se als irreversibel angenommen ($k_{max} = 1000$). Für global optimierte Flussvorhersagen wird die gleichzeitige Erfüllung aller 17 Zielflüsse verlangt, also:

$$\begin{array}{lllll}
 v_{\text{Glycine}}=13.4 & v_{\text{Methenyl-H}_4\text{F}}=1.96 & v_{\text{PEP}}=11.1 & v_{\text{Ery-4P}}=5.09 & v_{\text{TP}}=1.92 \\
 v_{\text{Serine}}=7.24 & v_{\text{Formyl-H}_4\text{F}}=11 & v_{\text{PHB}}=92.9 & v_{\text{Glc-6P}}=16.4 & v_{\alpha\text{-KG}}=17.1 \\
 v_{\text{Pyruvate}}=41.8 & v_{\text{Acetyl-CoA}}=53.5 & v_{\text{OAA}}=41.1 & v_{\text{Succ-CoA}}=6.8 & v_{\text{ATP}}=585.3 \\
 v_{\text{Pento-P}}=10.4 & v_{\text{NADPH}}=235.13. & & &
 \end{array}$$

Zur Bestimmung der MinModen wird die Erfüllung von jeweils nur einem dieser Zielflüsse verlangt ($v_i = 1$), während alle anderen Zielflüsse keinen Fluss tragen dürfen. Die 17 MinModen werden ihrem jeweiligen Bedarf entsprechend skaliert ($41,4v_{aaa}$) und aufaddiert, sprich linear kombiniert. Die sich ergebende Flussvorhersage für die Biomassesyntese bezeichnen wir als *MinModen-Kombination*.

Elementarmodenbestimmung Die Elementarmoden und die konvexe Basis aus Elementarmoden (siehe Seite 20) werden mit der von Klamt *et al.* entwickelten Software *FluxAnalyzer*[112], Vorgänger des *CellNetAnalyzers*[108], berechnet. Für die Darstellung einer (global optimierten) Flussverteilung als lineare Kombination aus Elementarmoden der konvexen Basis, wird folgendes Optimierungsproblem gelöst:

$$\begin{array}{ll}
 \text{minimize} & |\bar{\alpha}| \\
 \text{subject to} & \bar{\alpha}\mathbf{M} = \bar{f},
 \end{array} \tag{2.2}$$

wobei \mathbf{M} eine Matrix, bestehend aus den Vektoren (Elementarmoden) der konvexen Basis, \bar{f} der Vektor der global optimierten Flussverteilung und $\bar{\alpha}$ ein Vektor aus nicht-negativen realen Zahlen ist, die die Gewichtungsfaktoren der Linearkombination und somit die Lösung des Problems darstellen.

¹z.B. Aktivierung von Aminosäuren, Fehlerkorrektur während der Protein- und DNS-Synthese, Aufwinden der DNS-Stränge, nachträgliche Proteinmodifikationen, Ausgleich des durch Protonen-Lecks in der Membran verminderten Protonengradienten

Tabelle 2.1: Das Zentralstoffwechselmodell von *Methylobacterium extorquens*

#	Reaktion	k	Enzyme	EC-Nummer
Formaldehyd-Stoffwechsel				
1	MeOH + Q → HCHO + QH ₂ + H	100000	Methanol dehydrogenase	1.1.1.244
2	HCHO + H ₄ F → Methylene-H ₄ F	100000	nicht katalysiert	
3	Methenyl-H ₄ F + NADPH ↔ Methylene-H ₄ F + NADP	4	Methylene-H ₄ F-dehydrogenase (MtdA)	1.5.1.5
4	Methenyl-H ₄ F ↔ Formyl-H ₄ F	10,6	Methenyl-H ₄ F-cyclohydrolase	3.5.4.9
5	HCOOH + H ₄ F + ATP ↔ Formyl-H ₄ F + ADP + Pi	23,9	Formyl-H ₄ F-synthetase	6.3.4.3
6	HCOOH + NAD ↔ CO ₂ + NADH	420	Formate dehydrogenase	1.2.1.2
7	HCHO + H ₄ MPT → Methylene-H ₄ MPT	100000	Formaldehyde activating enzyme	
8	Methylene-H ₄ MPT + NAD ↔ Methenyl-H ₄ MPT + NADH	174,2	Methylene H ₄ MPT dehydrogenase (MtdB)	
9	Methylene-H ₄ MPT + NADP ↔ Methenyl-H ₄ MPT + NADPH	174,2	Methylene H ₄ MPT dehydrogenase (MtdA)	
10	Formyl-H ₄ MPT ↔ Methenyl-H ₄ MPT	7,3	Methenyl H ₄ MPT cyclohydrolase	3.5.4.27
11	HCOOH + H ₄ MPT ↔ Formyl-H ₄ MPT	4,9	Formyl MRF:H ₄ MPT formyltransferase	
Serinzzyklus				
12	Serine + H ₄ F ↔ Glycine + Methylene-H ₄ F	10,2	Serine hydroxymethyltransferase	2.1.2.1
13	Serine + GlyOx ↔ Glycine + H-pyruvate	1	Serine-glyoxylate aminotransferase	2.6.1.45
14	H-pyruvate + NADH ↔ Glycerate + NAD	1	Hydroxypyruvate reductase	1.1.1.81
15	H-pyruvate + NADPH ↔ Glycerate + NADP	1	Hydroxypyruvate reductase	1.1.1.81
16	Glycerate + ATP → 2-PG + ADP	100000	Glycerate kinase	2.7.1.31
17	PEP ↔ 2-PG	3	Enolase	4.2.1.11
18	PEP + CO ₂ ↔ OAA	1	PEP carboxylase	4.1.1.31
19	OAA + NADH ↔ Malate + NAD	6260	Malate dehydrogenase	1.1.1.37
20	Malate + CoA + ATP → Malyl-CoA + ADP	100000	Malate thiokinase	6.2.1.9
21	Acetyl-CoA + GlyOx ↔ Malyl-CoA	345	Malyl-CoA lyase	4.1.3.24
Zitratzyklus				
22	Pyruvate + CoA + NAD → Acetyl-CoA + NADH + CO ₂	100000	Pyruvate dehydrogenase	1.2.4.1
23	Acetyl-CoA + OAA → Cit + CoA	100000	Citrate synthase	2.3.3.1
24	Iso-C ↔ Cit	14,4	Aconitase	4.2.1.3
25	α-KG + CO ₂ + NADPH ↔ Iso-C + NADP	1,3	Isocitrate dehydrogenase	1.1.1.42
26	α-KG + CoA + NAD → Succ-CoA + CO ₂ + NADH	100000	α-KG dehydrogenase	1.2.1.52
27	Succ + CoA + GTP ↔ Succ-CoA + GDP + Pi	1,68	Succinyl-CoA synthetase	6.2.1.4
28	Succ-CoA → Succ + CoA	100000	Succinyl-CoA hydrolase	3.1.2.3
29	Succ + FAD ↔ Fum + FADH	1	Succinate dehydrogenase	1.3.5.1
30	Fum ↔ Malate	4,86	Fumarase	4.2.1.2
Glukoneogenese und Pentose-Phosphat-Weg				
31	2-PG ↔ 3-PG	7,3	Phosphoglycerate mutase	5.4.2.1
32	1,3-DPG + ADP → 3-PG + ATP	3226	Phosphoglycerate kinase	2.7.2.3
33	1,3-DPG + NADH ↔ TP + NAD	2,77	Glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase	1.2.1.12

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Tabelle 2.1: (Fortsetzung)

#	Reaktion	k	Enzyme	EC-Nummer
34	2 TP \rightarrow Fru-1,6-BP	5555	Aldolase	4.1.2.13
35	Fru-1,6-BP \leftrightarrow Fru-6-P	174	Fructose-1,6-bisphosphatase	3.1.3.11
36	Fru-6-P \leftrightarrow Glc-6-P	2,22	Phosphoglucose isomerase	5.3.1.9
37	Glc-6-P + NADP \leftrightarrow 6-PG + NADPH	2,08	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	1.1.1.49
38	Pento-P + CO ₂ + NADPH \leftrightarrow 6-PG + NADP	13,5	6-Phosphogluconate dehydrogenase	1.1.1.44
39	TP + S7P \leftrightarrow 2 Pento-P	1,5	Transketolase	2.2.1.1
40	TP + S7P \leftrightarrow Ery-4-P + Fru-6-P	1	Transaldolase	2.2.1.2
41	Ery-4-P + Pento-P \leftrightarrow TP + Fru-6-P	10	Transketolase	2.2.1.1
42	Malate + NAD \leftrightarrow Pyruvate + CO ₂ + NADH	1	Malic enzyme	1.1.1.38
43	PEP + ADP \rightarrow Pyruvate + ATP	18000	Pyruvate kinase	2.7.1.40
44	Pyruvate + CO ₂ + ATP \leftrightarrow OAA + ADP	6,55	Pyruvate carboxylase	6.4.1.1
45	OAA + GTP \leftrightarrow PEP + GDP + CO ₂	12	PEP carboxylase	4.1.1.32
PHB-Synthese und Acetyl-CoA-Oxidation				
46	2 Acetyl-CoA \leftrightarrow Acetoac-CoA + CoA	1	β -Ketothiolase	2.3.1.16
47	Acetoac-CoA + NADPH \leftrightarrow 3HB-CoA + NADP	1	Acetoacetyl-CoA reductase (NADPH)	1.1.1.36
48	3HB-CoA \rightarrow PHB + CoA	100000	PHB synthase	2.3.1.-
49	PHB \rightarrow 3HB	100000	PHB depolymerase	1.1.1.36
50	Acetoac + NADH \leftrightarrow 3HB + NAD	526	β -Hydroxybutyrate dehydrogenase	1.1.1.30
51	Acetoac-CoA + Succ \leftrightarrow Acetoac + Succ-CoA	100	Acetoacetate-Succinyl-CoA transferase	2.8.3.5
52	Crot-CoA \leftrightarrow 3HB-CoA	5,55	D-crotonase	4.2.1.17
53	L3HB-CoA \leftrightarrow Crot-CoA	5,55	L-crotonase	4.2.1.17
54	Acetoac-CoA + NADH \rightarrow L3HB-CoA + NAD	1587	Acetoacetyl-CoA reductase (NADH)	1.1.1.35
55	Crot-CoA + NADPH \leftrightarrow But-CoA + NADP	1	Crotonyl-CoA reductase	1.3.1.8
56	But-CoA + NAD \rightarrow Prop-CoA + CO ₂ + NADH	100000	Enzyme des Glyoxylate Regeneration Zyklus	
57	Mema-CoA + ADP + P _i \leftrightarrow Prop-CoA + ATP + CO ₂	123	Propionyl-CoA carboxylase	6.4.1.3
58	Mema-CoA \leftrightarrow Succ-CoA	18,6	Methylmalonyl-CoA mutase	5.4.99.2
Energiestoffwechsel				
59	NADH + Q \leftrightarrow NAD + QH ₂ + 2 H	1	NADH-Quinone oxidoreductase	1.6.99.5
60	QH ₂ \leftrightarrow Q + 2 H	1	Cytochrome oxidase	1.10.2.2
61	FADH + Q \leftrightarrow FAD + QH ₂	1	Ubiquinone oxidoreductase	1.5.5.1
62	ADP + 2 H \leftrightarrow ATP	1	ATPase	
63	GDP + ATP \leftrightarrow GTP + ADP	1,04	NDP Kinase	2.7.4.6
64	NADH + NADP + H \leftrightarrow NADPH + NAD	1	Transhydrogenase	1.6.1.2
Serin-Biosynthese				
65	PHP + NADH \rightarrow 3-PG + NAD	10000	3-Phosphoglycerate dehydrogenase	1.1.1.95
66	α -KG + 3-Pser \leftrightarrow PHP + Glu	6,66	Phosphoserine transaminase	2.6.1.52
67	3-Pser \leftrightarrow Serine	673	Phosphoserine phosphatase	3.1.3.3
68	α -KG + NADPH \rightarrow Glu + NADP	1000000	Glutamate dehydrogenase	1.4.1.4
Austauschreaktionen				

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Tabelle 2.1: (Fortsetzung)

#	Reaktion	k	Enzyme	EC-Nummer
69	$\text{CO}_2(\text{out}) \rightarrow \text{CO}_2$	1	CO_2 -Austausch	
70	$\text{Format}(\text{out}) \rightarrow \text{Format}$	1	Format-Austausch	
71	$\text{Glycin}(\text{out}) \rightarrow \text{Glycin}$	1	Glycin-Austausch	
72	$\text{HCHO}(\text{out}) \rightarrow \text{HCHO}$	1	Formaldehyde-Austausch	
73	$\text{Pyruvate}(\text{out}) \rightarrow \text{Pyruvate}$	1	Pyruvate-Austausch	
74	$\text{Serine}(\text{out}) \rightarrow \text{Serine}$	1	Serine-Austausch	
75	$\text{CH}_3\text{OH}(\text{out}) \rightarrow \text{CH}_3\text{OH}$	1	Methanol-Austausch	
76	$\text{Succ}(\text{out}) \rightarrow \text{Succ}$	1	Succinat-Austausch	
Austauschreaktionen mit Biosynthesewegen außerhalb der Systemgrenzen				
77	$\text{Glycin} \rightarrow \text{Glycin}_{\text{biomass}}$	1	Glycin-Austausch	
78	$\text{ATP} \rightarrow \text{ATP}_{\text{biomass}} + \text{ADP}$	1	ATP-Austausch	
79	$\text{NADPH} \rightarrow \text{NADPH}_{\text{biomass}} + \text{NADP}$	1	NADPH-Austausch	
80	$\text{Succ-CoA} \rightarrow \text{Succ-CoA}_{\text{biomass}} + \text{Succ} + \text{CoA}$	1	Succ-CoA-Austausch	
81	$\text{Acetyl-CoA} \rightarrow \text{Acetyl-CoA}_{\text{biomass}} + \text{CoA}$	1	Acetyl-CoA-Austausch	
82	$\text{Formyl-H}_4\text{F} \rightarrow \text{Formyl-H}_4\text{F}_{\text{biomass}} + \text{H}_4\text{F}$	1	Formyl-H ₄ F-Austausch	
83	$\text{Methenyl-H}_4\text{F} \rightarrow \text{Methenyl-H}_4\text{F}_{\text{biomass}} + \text{H}_4\text{F}$	1	Methenyl-H ₄ F-Austausch	
84	$\text{Pyruvate} \rightarrow \text{Pyruvate}_{\text{biomass}}$	1	Pyruvate-Austausch	
85	$\text{Serine} \rightarrow \text{Serine}_{\text{biomass}}$	1	Serin-Austausch	
86	$\text{PEP} \rightarrow \text{PEP}_{\text{biomass}}$	1	Phospho-Enol-Pyruvat-Austausch	
87	$\text{OAA} \rightarrow \text{OAA}_{\text{biomass}}$	1	Oxalacetat-Austausch	
88	$\alpha\text{-KG} \rightarrow \alpha\text{-KG}_{\text{biomass}}$	1	α -KG-Austausch	
89	$\text{TP} \rightarrow \text{TP}_{\text{biomass}}$	1	TP-Austausch	
90	$\text{Glc-6-P} \rightarrow \text{Glc-6-P}_{\text{biomass}}$	1	Glucose-6-Phosphat-Austausch	
91	$\text{Pento-P} \rightarrow \text{Pento-P}_{\text{biomass}}$	1	Pentose-Phosphat-Austausch	
92	$\text{Ery-4-P} \rightarrow \text{Ery-4-P}_{\text{biomass}}$	1	Ery-4-P-Austausch	
93	$\text{PHB} \rightarrow \text{PHB}_{\text{biomass}}$	1	PHB-Austausch	

2.3 Ergebnisse

Elementarmoden-Analyse

Zur Veranschaulichung der Problematik, die sich mit existierenden Methoden der strukturellen Netzwerkanalyse ergibt, unterziehen wir das Stoffwechselmodell von *Methylobacterium extorquens* einer Elementarmoden-Analyse. Im Vergleich mit genomweiten Modellen ist die Anzahl der im Modell enthaltenen Reaktionen sehr übersichtlich: 93 Reaktionen, 43 davon werden als irreversibel angenommen. Dennoch ist das Modell zu groß, um den vollständigen Satz an Elementarmoden mit Hilfe der FluxAnalyzer-Software[112] auf einem PC mit 768MB Speicherkapazität zu bestimmen. Eine Mindestanzahl an Elementarmoden liefert eine vereinfachende Rechnung: unter der Annahme, dass 5 der 17 Zielmetabolite nicht synthetisiert werden, ist das Problem berechenbar und ergibt 450 251 Elementarmoden.

Berechnung der generierenden Vektoren

Der Berechnung des vollständigen Satzes von Elementarmoden geht die Bestimmung der generierenden Vektoren voraus. Diese stellen eine Untermenge der Elementarmoden dar und aus ihnen können alle weiteren Elementarmoden bestimmt werden. Die Berechnung dieser minimalen Menge generierender Elementarmoden ist für das vollständige Stoffwechselmodell möglich und ergibt 7033 Moden. Jede Flussverteilung kann als eine Linearkombination dieser Flussvektoren dargestellt werden. Zur Veranschaulichung berechnen wir eine flussminimierte Lösung, die als Zielvorgabe die Synthese aller 17 Zielmetabolite realisiert (global optimiert). Obwohl die Synthese dieser 17 Metabolite eine komplexe Anforderung an das Stoffwechselnetzwerk darstellt, werden lediglich 21 der 7033 Moden benötigt, um durch Linearkombination die flussminimierte Lösung zu rekonstruieren. Diese sehr übersichtliche Anzahl an Moden wirft die Frage auf, inwieweit der durch die 7033 Moden aufgespannte Lösungsraum notwendig ist, und ob ein kleinerer (überschaubarer) Satz an Moden dem nicht vorzuziehen wäre - wenn auch auf Kosten der Vollständigkeit.

Physiologische Interpretation

Ein anderer Punkt betrifft die physiologische Interpretation der Elementarmoden. Will man durch die Zerlegung gemessener Flussverteilungen in Elementarmoden eine Aussage darüber treffen, wie die Anteile der synthetisierten Stoffe im einen Zustand sich von denen im anderen Zustand unterscheiden, ist eine klare Funktionszuweisung wünschenswert, d.h. eine Mode sollte z.B. ausschließlich Pyruvat, eine andere ausschließlich Oxalacetat synthetisieren. Abbildung 2.2 zeigt den aktiven Austausch der 21 Elementarmoden. Dabei wird deutlich, dass eine eindeutige physiologische Interpretation der Elementarmoden in diesem Sinne schwer fällt, da oftmals mehr als nur ein Zielmetabolit synthetisiert wird und es darüber hinaus, wie im Fall von Oxalacetat, mehrere Elementarmoden gibt, die den gleichen Zielmetaboliten synthetisieren.

MinModen-Ansatz

Das Konzept, das in dieser Arbeit vorgestellt wird, verfolgt einen anderen Ansatz: Statt der Minimierung des Gesamtflusses bei gleichzeitiger Erfüllung aller Stoffwechselziele (in den entsprechenden Anteilen), berechnen wir Flussverteilungen die jeweils ein Stoffwechselziel erfüllen. Die gleichzeitige Synthese anderer Vorläufermetabolite wird jeweils unterbunden¹. Die Flussverteilung, die wir erhalten, verfolgt per se nur eine definierte Aufgabe, ist somit physiologisch interpretierbar und wird entsprechend als minimale Flussmode, kurz *MinMode* bezeichnet. Die 17 berechneten MinModen sind der Tabelle 3 im Anhang zu entnehmen.

Beispiel einer MinMode

In allen 17 MinModen wird Methanol aufgenommen und aus dem Kohlenstoff und

¹In späteren Arbeiten wird die Synthese anderer Zielmetabolite zugelassen, aber nicht optimiert.

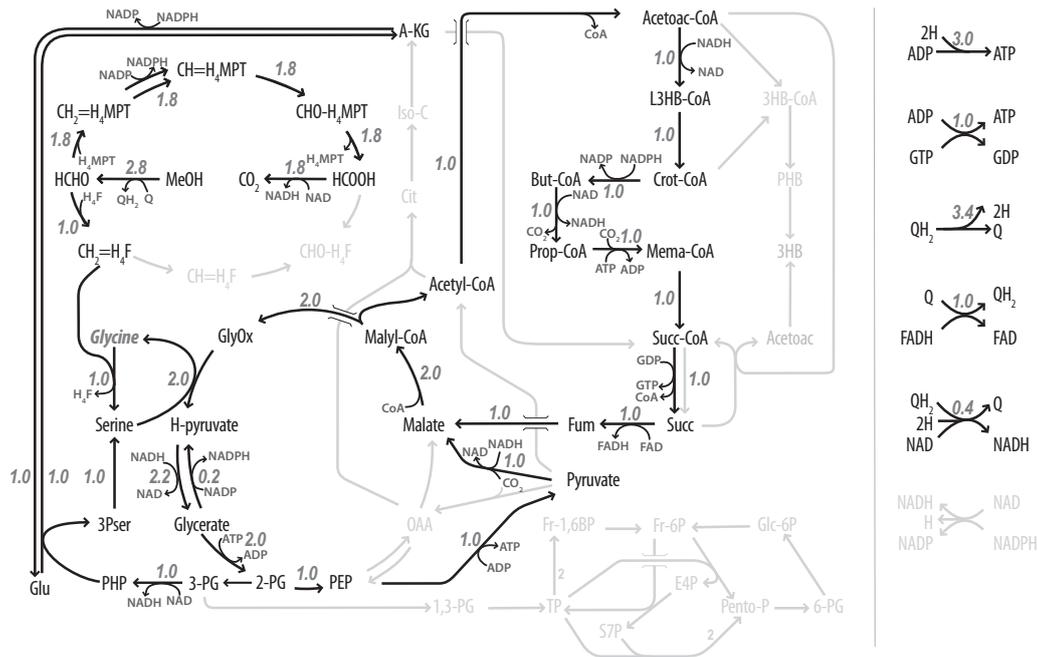


Abbildung 2.3: Glycin-MinMode mit entsprechenden Flusswerten für aktive Flüsse. Die Nettogleichung lautet: $2,8 \text{ MeOH} \rightarrow 1 \text{ Glycine} + 0,8 \text{ CO}_2$

der gespeicherten Energie ein Vorläufermetabolit produziert. Diese beiden Funktionen: Kohlenstofflieferant und Energielieferant, lassen sich in den Flussmoden gut nachvollziehen. Um ein Beispiel zu geben ist die MinMode für die Glycin-Synthese in Abbildung 2.3 dargestellt. Der H_4MPT -Zyklus¹ wird hier für die Generierung von NADPH und NADH verwendet (die in anderen Teilen des Netzwerks benötigt werden), sowie für die komplette Oxidation von Methanol zu CO_2 . Der freigesetzte Kohlenstoff wird zum Teil in der Umwandlung von Pyruvat zu Malat fixiert und dient der Synthese von Glycin. Das zweite Kohlenstoffatom wird über die Reaktionen des Serinzyklus eingebaut. Die Rolle des Zitratzyklus zur NADPH-Generation ist damit nicht erforderlich und nur drei Reaktionen des Zitratzyklus (von Succinyl-CoA zu Malat) tragen einen Fluss in dieser MinMode.

Verwendungshäufigkeit von Reaktionen

Um die relative Bedeutung einzelner Reaktionen für die Funktionalität des gesamten Netzwerks zu erfassen, zählen wir, wie oft jede Reaktion in den 17 MinModen einen aktiven Fluss trägt (Abbildung 2.4). Die Untersuchung einzelner Reaktionen im Hinblick auf ihre Verwendungshäufigkeit erlaubt das "Rückgrat" des Netzwerks zu bestimmen, in diesem Fall bestehend aus Reaktionen des Serinzyklus und des Formaldehydstoffwechsels (H_4F - und H_4MPT -Zyklus). Andererseits gibt es 15 Reaktionen, die in keiner MinMode einen Fluss tragen. Diese relativ hohe Zahl an verzichtbaren Reaktionen resultiert aus unserer Definition der Stoffwechselziele: nur jene Metabolite werden als Zielmetabolite betrachtet, die für die Synthese zellulärer Biomasse von Bedeutung sind. Es ist jedoch denkbar, dass für andere zelluläre Funktionen, andere Metabolite temporär ebenfalls von Bedeutung sein könnten. Zur Überprüfung wiederholen wir die MinModen-Berechnung für einen erweiterten Satz von Zielmetaboliten, der jeden der 63 Metabolite einschließt und erhalten 58 MinModen, von denen nur 6 Reaktionen verzichtbar sind (Reaktionen: 5,22,26,34,49 und 52).

¹oberer Teil des Formaldehydstoffwechsels

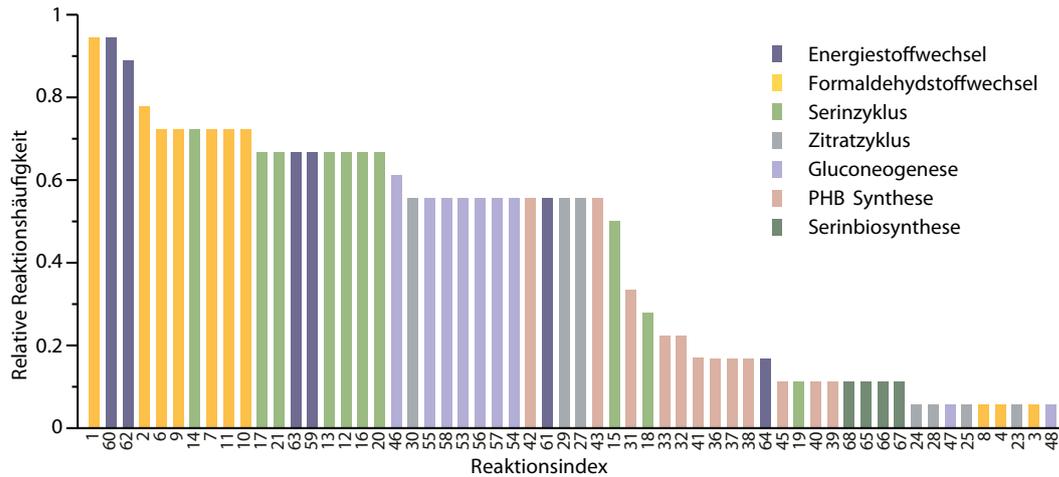


Abbildung 2.4: Häufigkeit von Reaktionen in den 17 Minimalmoden

Die MinModen werden nun linear kombiniert, um eine komplexe Flussverteilung zu erhalten, die alle für die Biomassesynthese notwendigen Vorläufermetabolite synthetisiert¹. Dabei gilt: Umso größer der Gewichtungsfaktor, mit dem eine MinMode in die Linearkombination eingeht, desto höher der Einfluss der entsprechenden MinMode in der MinModen-Kombination. Abbildung 2.5 zeigt die einzelnen Flusswerte der MinModen-Kombination im Vergleich zur global optimierten Flussverteilung (bei gleicher Wachstumsrate). In unserem Beispiel hat der ATP-Bedarf das größte Gewicht und die in der ATP-MinMode verwendete Stoffwechselwege (Methanolaufnahme, Formaldehydbildung und -abgabe, Atmung und ATP-Synthese) haben entsprechend höhere Flüsse in der MinModen-Kombination im Vergleich zur globalen Optimierung. Kleinere Flussunterschiede gibt es im H₄MPT-Zyklus, der Transhydrogenase, der NDP-Kinase und den Reaktionen alternativer Stoffwechselwege, die mit unterschiedlichen Cofaktoren arbeiten, wie z.B. die Umwandlung von PEP zu Malat (Reaktionen 18/19/45 und 42/43) oder von methylene-H₄MPT zu methenyl-H₄MPT (Reaktionen 8 und 9). Alle diese Flussunterschiede können auf Unterschiede in der Energieerzeugung, -umwandlung und -verschwendung zurückgeführt werden.

MinModen-Kombination

Die physiologische Relevanz der MinModen-Kombination wird anhand von experimentell bestimmten Flüssen[43] überprüft. Im Vergleich mit experimentellen Daten sind 18 der 21 Reaktionen in guter Übereinstimmung (siehe Abbildung 2.5 A). Lediglich die Vorhersage für die Enzyme: Malic-Enzyme (42), Malatdehydrogenase (19), PEP-Carboxylase (18) und Pyruvatkinase (43) unterscheidet sich signifikant von den experimentell bestimmten Flüssen. Die Vorhersage unter globaler Optimierung weicht in genau diesen Flüssen sogar noch etwas stärker ab. Als zweiten Test wiederholen wir die Analyse für die 4 Zielflüsse eines validierten, kinetischen Modells des Erythrozytenstoffwechsels[83]. Anschließend simulieren wir einen stationären Flusszustand mit diesem kinetischen Modell und vergleichen die vorhergesagte MinModen-Kombination (Abbildung 2.5 B). In diesem Fall liefert die MinModen-Kombination eine sehr ähnliche Vorhersage wie die von Holzhütter veröffentlichte global optimierte Lösung[83]: die Vorhersagen größerer Flüsse sind nahezu korrekt und in der Vorhersage kleinerer Flüsse sind Abweichungen akzeptabel.

Vergleich mit experimentellen Daten

¹Dabei wurden die einzelnen MinModen mit den entsprechenden Gewichtungsfaktoren multipliziert (die Flüsse für die Glycin-Synthese mit 13,4).

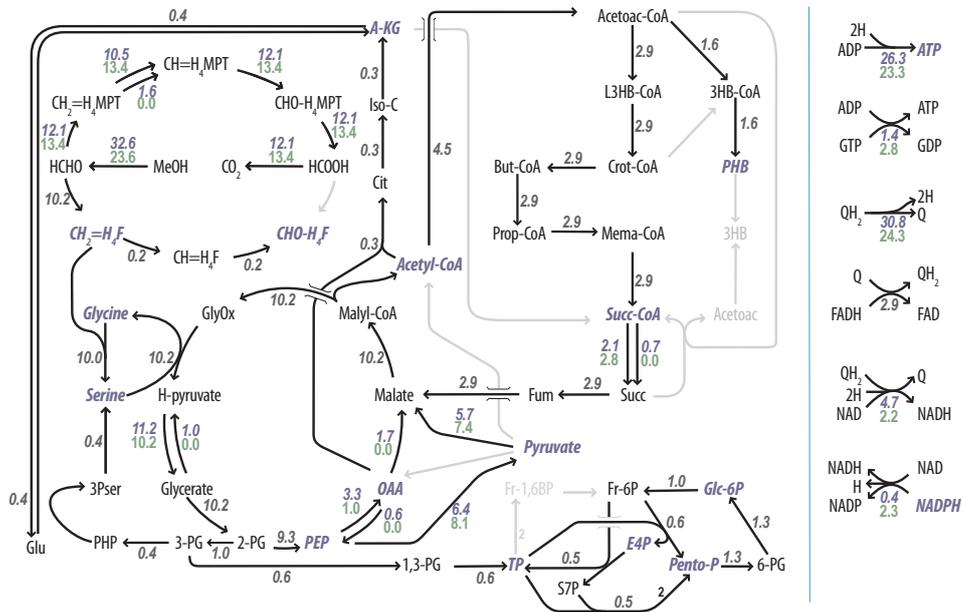


Abbildung 2.5: Vergleich der Flussvorhersagen: globale Optimierung (grüner Wert, unten), MinModen-Kombination (lila-kursiver Wert, oben), gleiche Flusswerte in beiden Vorhersagen sind grau-kursiv dargestellt, lila-kursive Metabolitnamen kennzeichnen Zielmetabolite.

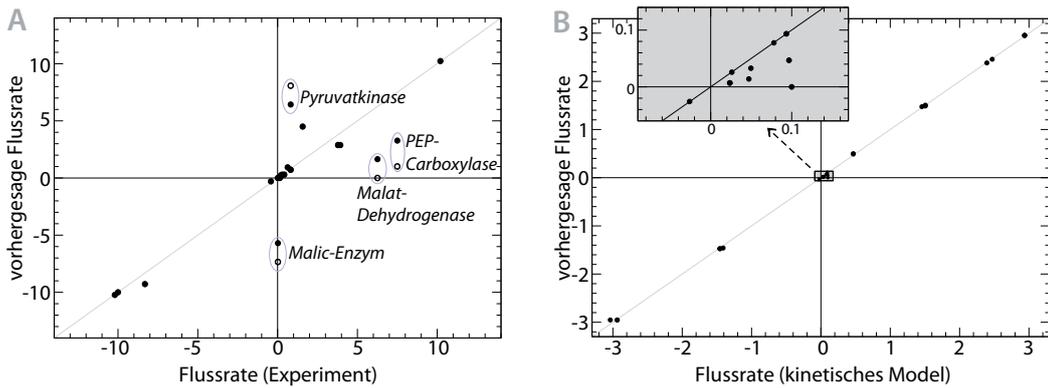


Abbildung 2.6: A) Vergleich experimentell bestimmter Flüsse mit denen der MinModen-Kombination (schwarz), Abweichungen zur global-optimierten Flussvorhersage sind in grau dargestellt; B) Vergleich der durch MinModen-Kombination vorhergesagten Flüsse mit simulierten, stationären Flüssen des kinetischen Modells des Erythrozytenstoffwechsels.

2.4 Diskussion

Wie am Beispiel des Stoffwechselmodells von *Methylobacterium extorquens* gezeigt wurde, ist die Anzahl an Elementarmoden, sowohl der vollständige Satz ($\gg 450\,000$), als auch die Teilmenge, die die konvexe Basis des Lösungsraums bildet (7033), enorm. Der Raum, der mit Hilfe dieser Moden aufgespannt wird, beschreibt vollständig das mögliche Modellverhalten; der physiologisch sinnvolle (und experimentell beobachtbare) Lösungsraum mag jedoch geringer sein: um eine komplexe Flussverteilung darzustellen werden überschaubare 21 der 7033 Elementarmoden, die eine konvexe Basis bilden, benötigt. Den Lösungsraum auf einen physiologisch relevanten einzuschränken ist jedoch nicht einfach, zumal Elementarmoden keine eindeutige, zelluläre Funktion zugewiesen werden kann.

In dieser Arbeit beschränkten wir uns auf "optimale" Moden: In der Annahme, dass die gesamte Stoffwechselleistung durch die Synthese einer Menge von "Zielmetaboliten" beschrieben wird, bestimmten wir optimale, quasi-stationäre Flussverteilungen, die jeweils genau einen Metaboliten synthetisieren und damit genau ein Stoffwechselziel erfüllen. Die gesamte Stoffwechselleistung wurde somit auf mehrere, individuell optimierte Einzelbeiträge aufgeteilt, deren Anzahl maximal der Zahl an Metaboliten im Netzwerk entspricht. Im Vergleich zur Elementarmodenanalyse lässt sich folgendes feststellen:

- Der Lösungsraum, der von diesen MinModen aufgespannt wird, ist eine wahre Teilmenge des Gesamtlösungsraumes: für das Modell des *Methylobacterium* beträgt die konvexe Dimension des MinModen-Raumes 17, die konvexe Basis aus Elementarmoden enthält 7033 Vektoren. Das zeigt, dass der Satz an MinModen den Lösungsraum nicht vollständig beschreibt, d.h. nicht jede stationäre Flussverteilung kann durch eine Linearkombination aus MinModen beschrieben werden.
- Sofern die einzelnen MinModen biochemisch ohne Widersprüche sind (ein überschaubarer Test), ist der durch sie aufgespannte Lösungsraum ebenfalls widerspruchsfrei.
- Während Elementarmoden einen umfassenden Lösungsraum beschreiben, der durch zusätzliche Nebenbedingungen auf einen physiologisch bedeutsamen Raum verkleinert werden kann (*top-down*), beginnt die MinModen-Analyse mit einem kleinen, physiologisch sinnvollen, aber unvollständigen Raum, der durch Erweiterung der betrachteten Stoffwechselfunktionen (d.h. zusätzlich bestimmte MinModen) vergrößert werden kann (*bottom-up*).
- MinModen sind sehr schnell berechenbar; das Konzept lässt sich daher auf sehr große (genomweite) Stoffwechselnetzwerke (> 500 Reaktionen) anwenden, deren vollständiger Satz an Elementarmoden sich u.U. nicht mehr bestimmen lässt.

Die berechneten MinModen können mit ähnliche Methoden analysiert werden wie Elementarmoden. Als Beispiel bestimmten wir die Häufigkeit, mit der eine Reaktion im MinModen-Set einen Fluss trägt. Da es zu den optimalen Synthesewegen der MinModen alternative Wege geben kann, unterbindet der Ausfall einer häufig verwendeten Reaktion nicht automatisch die Synthese von Zielmetaboliten. Häufig verwendete Reaktionen sind somit nicht gleichzusetzen mit essentiellen Reaktionen bzw. essentiellen

Enzymen. Beispielsweise wird die Format-Dehydrogenase (Reaktion 6) häufig verwendet, ist für das Wachstum auf Methanol aber nicht-essentiell [30].

Andererseits können Reaktionen, deren Unterdrückung ($v_i = 0$) die Synthese mindestens eines Zielmetaboliten unterbindet und die Anzahl an MinModen reduziert, als essentiell betrachtet werden. Äußert sich die Unterdrückung lediglich in veränderten Flussverteilungen mit konstanter Anzahl an MinModen, handelt es sich um nicht-essentielle Reaktionen. Somit sollte das Wachstum einer Mutante, welche die Fähigkeit zur Katalyse einer - als nicht-essentiell vorhergesagten - Reaktion verloren hat, nicht beeinträchtigt sein. Ist es dennoch beeinträchtigt, oder die Mutante gar lebensunfähig, ist die Stoffwechselfunktion durch die betrachteten Zielmetabolite nicht ausreichend beschrieben.

Interessanterweise gibt es 15 Reaktionen, die zur Realisierung der 17 Zielflüsse nicht beitragen. Drei der 15 Enzyme¹ sind für den Abbau des Speichermetaboliten poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) zu Acetoac-CoA verantwortlich; ein Prozess, der für das zelluläre Wachstum tatsächlich nicht relevant ist. Dies gilt allerdings nur für Umgebungsbedingungen, in denen genug Substrat zur Verfügung steht; bei Substratmangel ist der Abbau des PHB-Vorrats absolut notwendig! Im Fall der Aldolase, die 2 Triosephosphate in Fru-1,6-BP umwandelt (Reaktion 34), ist es hingegen möglich, dass Zielfunktionen übersehen worden sind. In dem Bakterium *Lactobacillus casei* ist Fr-1,6-BP beispielsweise als Regulator der Aktivität der Lactat-Dehydrogenase unverzichtbar[8]. D.h. es gibt 3 mögliche Gründe für die Inaktivität der 15 Reaktionen (bzw. der katalysierenden Enzyme): 1.) sie sorgen für eine größere Robustheit des Stoffwechsels und sind tatsächlich verzichtbar, 2.) ihre Funktion ist unter diesen Bedingungen nicht notwendig, oder 3.) ihre Funktion wurde nicht berücksichtigt.

Da im betrachteten Ausschnitt des Stoffwechsels jede Funktion über Metabolite vermittelt wird, können mit der Bestimmung von MinModen für jeden einzelnen Metaboliten im Netzwerk, alle potenziellen Zellfunktionen berücksichtigt werden (Kategorie 3 wird ausgeschlossen). Diese systematische Analyse reduziert die Anzahl verzichtbarer Reaktionen von 15 auf 6. Ist die Stöchiometrie des Netzwerks korrekt, so kann die Katalyse dieser Reaktionen nur der Erhöhung der Robustheit gegenüber Mutationen oder der Anpassung an veränderte Umgebungsbedingungen dienen. Mutanten, die die Fähigkeit der Katalyse dieser Reaktionen verloren haben, sollten unter gleichen Bedingungen normal wachsen. Für die α -KG Dehydrogenase trifft dies zu: da für das Wachstum auf C1-Quellen, wie Methanol, der Zitratzyklus teilweise unterdrückt wird[43, 44], beeinträchtigt der Mangel dieses Enzyms (unter diesen Bedingungen) das Wachstumsverhalten von *Methylobacterium extorquens* tatsächlich nicht[29].

Für das hier verwendete Modell unterscheiden sich die Flussvorhersagen durch globale Optimierung und MinModen-Kombination nicht wesentlich. Geringfügige Abweichungen zwischen beiden Optimierungsvarianten können anhand eines einfachen Beispiels erklärt werden. Für das Beispiel-Netzwerk bestehend aus 7 Reaktionen (Flüsse: $v_1, v_2 \dots v_7$), von denen v_4 und v_5 die Zielflüsse darstellen, können zwei MinModen für die Synthese der Metabolite X und Z bestimmt werden (Abbildung 2.7 A). Dabei muss das für die Synthese von X notwendige ATP durch zusätzliche Reaktionen erzeugt werden. Da jeweils nur ein Zielmetabolit synthetisiert werden darf, sind die Flüsse v_6 und v_7 notwendig und es entsteht ein Nebenprodukt. Die Summe aller Flüsse

¹PHB-Depolymerase, β -hydroxybutyrate Dehydrogenase und Acetoacetate-succinyl-CoA Transferase

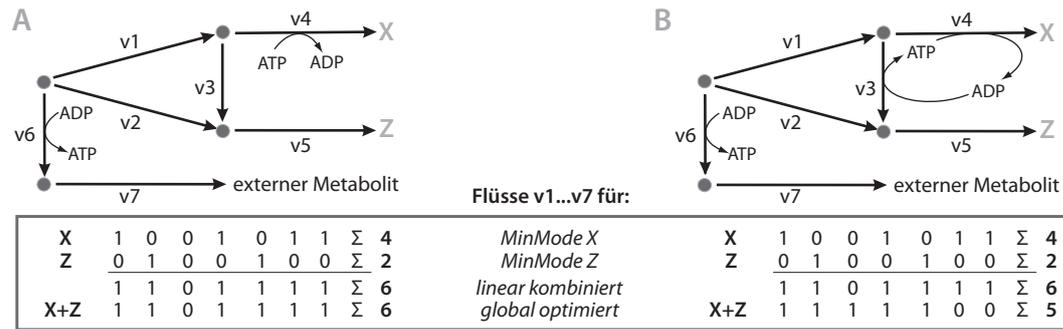


Abbildung 2.7: Beispielnetzwerke zur Veranschaulichung des Netzwerkeffektes: A) ohne Unterschied zwischen globaler Optimierung und Einzelzieloptimierung; B) Vorhersage unterschiedlicher Flusslösungen.

in beiden MinModen ist 4 und 2; die Kombination beider MinModen zu gleichen Teilen ergibt eine Flussverteilung der Gesamtsumme 6. Die hier verwendete einfache Flussminimierung berücksichtigt weder Aktivitätslevel von Enzymen, noch die Kosten für deren Bereitstellung, d.h. es wird die Anzahl der Umsetzungsschritte minimiert und die (global) optimierte Lösung für die gleichzeitige Synthese von X und Z ist identisch mit der MinModen-Kombination.

Würde ein Fluss v_3 nun gleichzeitig ATP erzeugen (Abbildung 2.7 B), dann würde Reaktion 3 in der globalen Optimierung bevorzugt verwendet werden, da sich damit die Summe der Flüsse für die Synthese von X und Z auf 5 reduzieren lässt. Die Synthese eines Kohlenstoffgerüsts kann in der globalen Optimierung somit mehr Umsetzungsschritte benötigen, gleichzeitig kann sie aber auch vom Synergieeffekt profitieren: Energie, die bei der Synthese des einen Stoffes gewonnen wird, kann für die Synthese eines anderen verwendet werden.

Die oben genannten Beispiele zeigen, dass vor dem Hintergrund gewählter Umgebungsbedingungen und betrachteter Stoffwechselziele, die MinModen-Analyse eine sinnvolle Unterscheidung von essentiellen und nicht-essentiellen Reaktionen bzw. Enzymen ermöglicht. Bisherige Annahmen über physiologisch bedeutsame Metabolite können durch Validierung dieser Vorhersagen mit beobachteten Phänotypen von Knock-out-Mutanten (im großen Maßstab möglich durch *Phänotyp-Microarrays*) somit korrigiert werden.

Da im Extremfall eine Zielfunktion alle anderen Ziele dominiert, kann sich der momentane Bedarf einzelner Metabolite drastisch ändern; eine unabhängige Regulation einzelner Stoffsynthesen könnte daher von Vorteil sein. Die gute Übereinstimmung experimentell bestimmter Flüsse mit Flussvorhersagen der MinModen-Kombination (siehe Abbildung 2.6) deutet darauf hin, dass die Optimierung einzelner Stoffsynthesen innerhalb des Gesamtnetzwerkes nicht unphysiologischer als die gemeinsame Optimierung aller Stoffsynthesen ist. Darüber hinaus können dem bereits existierenden Netzwerk neue Reaktionen hinzugefügt werden, ohne die bereits erreichte optimale Struktur zu beeinträchtigen.

Im Hinblick auf die Reaktionshäufigkeit im MinModen-Set lässt sich dazu folgende Hypothese aufstellen: *Reaktionen, die in vielen MinModen aktiv sind, sind Teil evolutionär alter Netzwerkteile, die fundamentale Stoffwechselfunktionen bereitstellen. Die-*

ses "Grundgerüst" wurde sukzessive durch spezialisierte Reaktionen ergänzt, die nur für die Synthese einiger weniger Metabolite von Bedeutung sind. Der Nachweis einer solchen evolutionären Entwicklung muss jedoch noch erbracht werden.

3 Einbeziehung thermodynamischer Informationen in die Flussvorhersage

Rother K, **Hoffmann S**, Bulik S, Hoppe A, Gasteiger J, Holzhütter HG. (2010) *IGERS: Inferring Gibbs energy changes of biochemical reactions from reaction similarities*. Biophys J., 98(11):2478-86.

Hoppe A, **Hoffmann S**, Holzhütter HG. (2007) *Including metabolite concentrations into flux-balance analysis: Thermodynamic realizability as a constraint on flux distributions in metabolic networks*. BMC Syst. Biol., 1(1): 23.

3.1 Einleitung

Die Qualität der Flussvorhersage ist abhängig vom gewählten Optimierungsziel und dem Lösungsraum, der durch Berücksichtigung physikalischer und biochemischer Fakten sinnvoll beschränkt werden kann. Die Verwendung thermodynamischer Eigenschaften als zusätzliche Bedingung in der Flussbilanzanalyse gewinnt zunehmend an Bedeutung [12, 78, 87]. Ziel ist es, ausschließlich Lösungen zu finden, die einen (aus thermodynamischer Sicht) “realistischen” Stofffluss beschreiben. Grundlage dafür sind vor allem verlässliche thermodynamische Parameter für alle modellierten Reaktionen.

Ziel

3.1.1 Abschätzung der Standard-Gibbs-Energie

Gemessene $\Delta_R G^\circ$ -Werte aus der Literatur wurden von R. N. Goldberg, Y. B. Tewari und T. N. Bhat zusammengestellt[70]. Zusammen mit den verwendeten Versuchsbedingungen (pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke, etc.) sind sie via Webinterface in einer NIST-Datenbank¹ zugänglich. Die Anzahl dieser experimentellen Werte ist allerdings sehr begrenzt und die unterschiedlichen Versuchsbedingungen erschweren deren Vergleichbarkeit. Modelle von Robert Alberty[2] erlauben einen Teil der Werte auf gleiche Bedingungen zu transformieren, eine umfassende Abdeckung genomweiter Stoffwechselmodelle mit gemessenen $\Delta_R G^\circ$ -Werte ist derzeit jedoch nicht möglich.

Gemessene $\Delta_R G^\circ$ nicht umfassend & schwer vergleichbar

Alternativ können die freien Energien theoretisch abgeschätzt werden. Die Gruppenübertragungsmethode (GCM), entwickelt von Mavrovouniotis[129, 130] und erweitert von Jankowski *et al.*[96], ist derzeit häufig die Methode der Wahl. Sie basiert auf der Annahme, dass die Gibbs-Bildungsenergie eines Moleküls, $\Delta_B G$, der Summe der Gibbs-Bildungsenergien aller enthaltenen funktionellen Gruppen entspricht. Da der $\Delta_R G$ -Wert einer Reaktion sich als Differenz der Gibbs-Bildungsenergien seiner Produkte und Substrate bestimmen lässt (siehe Gleichung 1.3), können anhand eines Testda-

GCM z.T. inakzeptable Werte

¹http://xpdn.nist.gov/enzyme_thermodynamics/

tensatzes bereits gemessener $\Delta_{\text{R}}G^{\circ}$ -Werte, die Beiträge einzelner Gruppen abgeschätzt und zur Berechnung unbekannter $\Delta_{\text{R}}G^{\circ}$ -Werte verwendet werden. Der Ansatz liefert relativ verlässliche Werte für Reaktionen, deren chemische Änderungen ausschließlich funktionelle Gruppen betreffen, die im Testdatensatz enthalten waren, und für die die Grundannahme gerechtfertigt ist. Für andere Reaktionen liefert er jedoch keine oder inakzeptable Vorhersagen.

Lösung: Wir schlagen einen komplementären Ansatz vor: wir bestimmen die Ähnlichkeit von Reaktionen bezogen auf die Änderungen chemischer Attribute ihrer Reaktionsteilnehmer (z.B. enthaltene funktionelle Gruppen, Ringstruktur, konjugiertes System), um dann bei ähnlichen Reaktionen auf ähnliche bzw. äquivalente thermodynamische Eigenschaften zu schließen. D.h. wenn es zu einer Reaktion mit unbekanntem $\Delta_{\text{R}}G^{\circ}$ -Wert eine ausreichend ähnliche Reaktion mit gemessenem $\Delta_{\text{R}}G^{\circ}$ -Wert gibt, wird dieser übernommen. Wir nennen diese Methode *Inference of Gibbs-Energy of Reaction Systems (IGERS)*.

Voraussetzung: Voraussetzung für die Bestimmung der Reaktionsähnlichkeit ist die Kenntnis der Atomübergänge, sogenannte *Atomübergangsmatrizen*. Diese Information findet man (manuell aufgearbeitet) in BioPath-Datenbank[164]. Alternativ gibt es seit 2006 entsprechende Vorhersagen in der KEGG-RPAIR-Datenbank[114, 100]. Neben der Vorhersage verlässlicher $\Delta_{\text{R}}G^{\circ}$ -Werte (die maximale Ungenauigkeit gibt der Nutzer vor), erlaubt dieser Ansatz, eine minimal notwendige Menge zu messender $\Delta_{\text{R}}G^{\circ}$ -Werte zu bestimmen, die es erlaubt, allen Reaktionen eines Netzwerkes einen ausreichend zuverlässigen $\Delta_{\text{R}}G^{\circ}$ -Wert zu zuweisen. Details zu diesem Ansatz finden sich in Rother *et al.*[167].

3.1.2 Berücksichtigung der Thermodynamik in der Flussvorhersage

Festgelegte Reaktionsrichtungen kritisch In der Modellierung wird der $\Delta_{\text{R}}G^{\circ}$ -Wert häufig als Indikator für die Umkehrbarkeit einer Reaktion verwendet. Bei unbekanntem $\Delta_{\text{R}}G^{\circ}$ -Wert wird dieser nach der Gruppenübertragungsmethode (GCM) abgeschätzt[52, 79]. Alternativ werden Reaktionsrichtungen auf beobachtete Richtungen reduziert. Reaktionsrichtungen von vornherein festzulegen ist eine sinnvolle Annahme unter moderaten Bedingungen, unter denen sich die intrazellulären Metabolitkonzentrationen nachweislich kaum ändern[174, 55], andererseits nehmen sie dem Modell die Möglichkeit extreme Situationen adäquat zu beschreiben.

Flexibilität ist wichtig Da die lokalen Metabolitkonzentrationen selbst unter "normalen" Bedingungen von der Standardkonzentration der $\Delta_{\text{R}}G^{\circ}$ -Werte (1M) stark abweichen und zum Teil einer gezielten metabolischen Regulation unterliegen, sind dem $\Delta_{\text{R}}G^{\circ}$ -Wert nach "unwahrscheinliche" Richtungsumkehrungen, wie die Umkehrung der atp-Synthese in der Mitochondrienmembran[73], thermodynamisch durchaus möglich – wenn nötig, ohne zusätzlichen Aufwand an metabolischer Energie. Gerade solche Situationen, in denen die Metabolitkonzentrationen nicht konstant gehalten werden können, in denen die Kontrolle über die Kohlenstoffzufuhr oder die Balance zwischen Stoffauf- und abbau (kurzzeitig) verloren geht, sind wichtig für unser Grundverständnis des Stoffwechsels.

Alternativer Ansatz In einem neueren Ansatz wird der Bereich möglicher Metabolitkonzentrationen auf experimentell beobachtete oder physiologisch plausible Werte beschränkt, und unter Verwendung der minimal und maximal möglichen Substrat- und Produktkonzentra-

tionen, der Bereich möglicher $\Delta_R G$ -Werte abgeschätzt:

$$\Delta_R G_{\max} = \Delta_R G^0 + RT \log\left(\prod_{M \in P} [M_{\max}]^\nu / \prod_{M \in S} [M_{\min}]^\nu\right) \quad (3.1)$$

bzw. analog dazu:

$$\Delta_R G_{\min} = \Delta_R G^0 + RT \log\left(\prod_{M \in P} [M_{\min}]^\nu / \prod_{M \in S} [M_{\max}]^\nu\right) \quad (3.2)$$

Dabei stellt P das Set der Produkte und S das Set der Substrate dar. Anhand dieser Werte wird die Richtung einzelner Reaktionen festgesetzt: Sind die Werte von $\Delta_R G_{\min}$ und $\Delta_R G_{\max}$ beide kleiner als null, läuft die Reaktion ausschließlich in Vorwärtsrichtung ab, ist sie in beiden Fällen größer als null, läuft sie ausschließlich in Rückwärtsrichtung ab [120].

Dieser Ansatz ist flexibler, als die ausschließliche Verwendung des $\Delta_R G^0$ -Wertes. Die separate Evaluierung jeder Reaktionsrichtung vernachlässigt allerdings den Netzwerkcharakter: die im stationären Zustand eingestellten Metabolitkonzentrationen müssen mit den Fließrichtungen aller Reaktionen kompatibel sein, an denen sie als Reaktanten mitwirken. An einem kleinen Beispiel wird dies deutlich. Nehmen wir an, Substrat S wird über ein Intermediat X in Produkt P umgewandelt: $S \rightarrow X \rightarrow P$ mit den Gleichgewichtskonstanten $k_1 = 1$ und $k_2 = 10$. Betragen die gemessenen Konzentrationen $[S] = 1$ und $[P] = 5$, so kann sich nur dann ein stationärer Fluss von S nach P einstellen, wenn die Konzentration von X zwischen 0,5 und 1 liegt. Die Vorgabe von Konzentrationen oder Konzentrationsbereichen für S und P schränkt somit den möglichen Konzentrationsbereich von X und damit den Raum möglicher Flussrichtungen ein.

Kritik: Vernachlässigung des Netzwerks

Wir gehen daher einen Schritt weiter und berücksichtigen in dem Konzept der *Thermodynamischen Realisierbarkeit* die Forderung $\Delta_R G < 0$ direkt bei der Berechnung der Flussvorhersagen. Nur wenn die Metabolite Konzentrationen annehmen können, die jede Flussrichtung in einer vorhergesagten Flussverteilung unterstützen, wird die Vorhersage vom Solver als akzeptabel ausgegeben.

Idee

3.1.3 Konzept der TR-Flussminimierung

Ziel der Thermodynamischen Realisierbarkeit (TR) ist die Vorhersage von Flussverteilungen, die den thermodynamischen Prinzipien nicht widersprechen. Dazu muss gewährleistet sein, dass

Ansatz

1. nur Flussrichtungen zugelassen werden, bei deren Reaktion Energie freigesetzt wird ($\Delta_R G < 0$),
2. die Stoffwechselenergie ausschließlich aus aufgenommenen Substraten gewonnen wird.

Für diese letzte Bedingung ist es notwendig, dass die verwendeten $\Delta_R G^0$ -Werte konsistent zueinander sind, d.h. dass sie dem Gesetz der Micro-Reversibilität (der Wegscheider-Bedingung) genügen: In einem geschlossenen System muss die Summe der $\Delta_R G$ -Werte immer null ergeben. Das $\Delta_R G$ der Umwandlung von A nach C muss da-

her der Summe der $\Delta_R G$ -Werte für A nach B und B nach C entsprechen. Dieses Prinzip ist auch als Verallgemeinerung des Kirchhoffschen Gesetzes bekannt[156].

*Korrektur
gemessener
 $\Delta_R G^\circ$ -Werte*

In einem Satz experimentell gemessener Werte ist diese Bedingung aufgrund unvermeidbarer Messungenauigkeiten meist nicht erfüllt. Für alle Reaktionen, für die ein $\Delta_R G^\circ$ -Wert bekannt ist und deren biochemische Reaktionsgleichung zum einen vollständig aufgeschrieben ist und zum anderen keine "virtuellen" oder Pseudo- Metabolite enthält¹, wird folgender Weg zur Korrektur der $\Delta_R G^\circ$ vorgeschlagen: Jeder gegebene $\Delta_R G^\circ$ -Wert wird gerade soweit erhöht oder verringert, dass die Micro-Reversibilität im Stoffwechselnetzwerk erfüllt ist. Dazu fügen wir Korrekturterme ein (beschrieben durch den Vektor E) und lösen folgendes Optimierungsproblem:

$$\begin{aligned} & \text{minimize} && \|E\| \\ & \text{subject to} && \overline{\Delta_R G_o} = \mathbf{S} \overline{\Delta_B G^*} + E, \end{aligned} \tag{3.3}$$

wobei $\|E\|$ die 2-norm des Vektors E, die sogenannte "root mean square distance" (RMSD) ist und $\overline{\Delta_B G^*}$ die jeweilige Änderung der Standard-Gibbs-Energie beschreibt. Ohne weitere Fixierung ist dieser Wert allerdings nur als relative Größe zu verstehen (hypothetisch). Der Ausdruck $\overline{\Delta_R G_o} - E$ gibt schließlich die korrigierte Änderung der Standard-Gibbs-Energie $\overline{\Delta_R G_o^*}$ an, mit der gerechnet werden kann.

Die Berücksichtigung der Metabolitkonzentrationen erfolgt auf zwei Ebenen mit unterschiedlicher Auswirkung auf die Flussvorhersage:

Einschränkend: Basierend auf Messwerten oder Plausibilitätsannahmen (Berücksichtigung der osmotischen Aktivität, begrenztes Zellvolumen, etc.) werden minimal und maximal *zulässige Stoffkonzentrationen (hard bounds)* festgelegt und dadurch, analog der Methode von Kümmel *et al.*[120], Reaktionsrichtungen ausgeschlossen.

Lenkend: Es wird gefordert, dass die Metabolitkonzentrationen möglichst innerhalb eines festgelegten *Toleranzbereichs* liegen (*soft bounds*) und wenig von gemessenen *Sollwerten* abweichen, wodurch die Flussrichtung reversibler Reaktionen beeinflusst wird.

Sollwerte

Der Abstand der gewählten Konzentration zum (gemessenen) Sollwert wird in die zu minimierende Optimierungsfunktion integriert:

$$\sum_{m \in W} (c - s_m)^2. \tag{3.4}$$

Dabei steht W für das Set von Metaboliten, für die (logarithmierte) Sollwertkonzentrationen s_m verfügbar sind und c steht für die aktuell gewählte (logarithmierte) Metabolitkonzentration.

Toleranzbereich

Es ist anzunehmen, dass eine derartige Justierung auf gemessenen Werte (aus unterschiedlichen Quellen) zu Widersprüchen führt. Als weitere Orientierung dienen daher die sogenannten *soft-bounds* (c_{low}, c_{high}). Sie geben einen Toleranzbereich an, in dem die Konzentrationen liegen sollten. Außerhalb dieser Grenzen wird ein linear anstei-

¹d.h. Metabolite denen keine reale Bildungsenthalpie zugewiesen werden kann

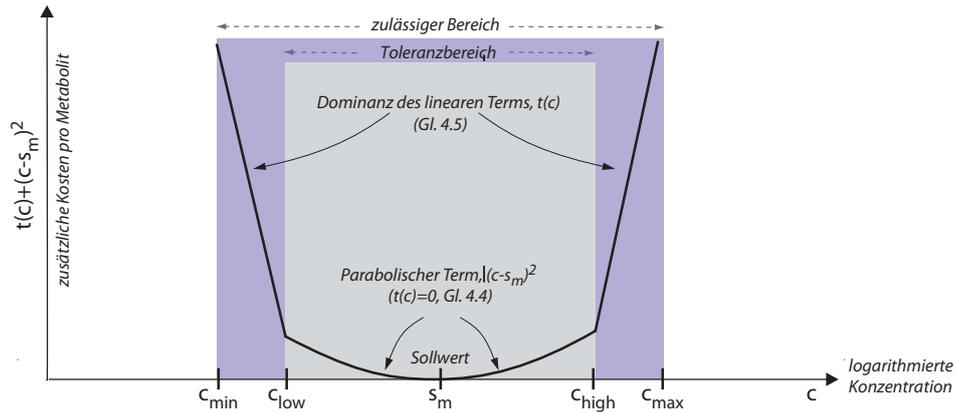


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Berücksichtigung von Metabolitkonzentrationen (Darstellung in Anlehnung an Abb.1 aus Hoppe et al.[87])

gender Bestrafungsterm eingeführt:

$$t(c) = \begin{cases} c_{\text{low}} - c & \text{if } c < c_{\text{low}} \\ 0 & \text{if } c_{\text{low}} \leq c \leq c_{\text{high}} \\ c - c_{\text{high}} & \text{if } c > c_{\text{high}} \end{cases} \quad (3.5)$$

Die minimalen und maximalen Grenzen zulässiger Stoffkonzentrationen gehen als Nebenbedingung in das Optimierungsproblem ein (siehe Gleichungen 3.1 und 3.2). Abbildung 3.1 veranschaulicht das Zusammenwirken der einzelnen (logarithmierten) Metabolitkonzentrationsbereiche.

Zulässige Konzentrationen

Das zu lösende Optimierungsproblem ist linear, mit realen aber auch binären, also ganzzahligen Variablen - ein sogenanntes Mixed Integer Problem (MIP) -, und enthält einen quadratischen Term in der Kostenfunktion. Unter Annahme der Flussminimierung lautet es wie folgt:

Optimierungsproblem

$$\begin{aligned} \text{minimize} \quad & |V| + \lambda_1 \sum_{c \text{ component of } C} t(c) + \lambda_2 \sum_{m \in W} (c - s_m)^2 \\ \text{subject to} \quad & \mathbf{S}'V = 0 \\ & 0 \leq v_j + \alpha d_j \leq \alpha, \quad 1 \leq j \leq n \\ & 0 \leq -\Delta_R G^j + \alpha d_j \leq \alpha, \quad 1 \leq j \leq n \\ & \overline{\Delta_R G} / (RT) = \overline{\Delta_R G}_o / (RT) + \mathbf{S}C \\ & C \in \mathfrak{C} \\ & v_j = L_j, \quad j \in J. \end{aligned} \quad (3.6)$$

Dabei ist V der Vektor der Flussraten und v_j die j -te Komponente darin. λ_1 und λ_2 sind empirische Faktoren, die angeben mit welchem Gewicht das Abweichen vom Sollwert und das Übertreten des Toleranzbereiches in die Kostenfunktion eingehen. Für die nachfolgend ausgeführten Rechnungen wurde, soweit nicht anders angegeben, $\lambda_1 = 100$ und $\lambda_2 = 10$ angenommen, d.h. das Einhalten des Toleranzbereiches ist wichtiger als die genaue Justierung auf Sollwerte. Die zulässigen Konzentrationsbereiche (*hardbounds*) werden durch \mathfrak{C} beschrieben. Der Ausdruck $0 \leq v_j + \alpha d_j \leq \alpha$ und $0 \leq$

$-\Delta_R G^j + \alpha d_j \leq \alpha$ sorgt dafür, dass für Flüsse in Vorwärtsrichtung ein negatives $\Delta_R G$, in Rückrichtung ein positives $\Delta_R G$ gewährleistet ist, wobei n die Anzahl der Reaktionen ist, d_j eine binäre Variable und α eine willkürlich gewählte, ausreichend hohe Zahl, größer als jeder mögliche Flusswert und jeder mögliche $\Delta_R G$ -Wert. Für $v_j = 0$ gelten diese Einschränkungen allerdings nicht, d.h. in diesem Fall bleibt der $\Delta_R G$ -Wert unbeschränkt.

Definition: TR & TRs Da die Verwendung von Sollwerten, Toleranzbereichen und zulässigen Konzentrationsbereichen unabhängig voneinander in die Rechnung eingehen, können sie auch separat verwendet werden. Wir verwenden hier die Bezeichnungen TR für eine Beschränkung zulässiger Konzentrationen und TRs, wenn zusätzlich ein Toleranzbereich und Sollwertkonzentrationen zur Lenkung des Stoffflusses verwendet werden.

Berechnung Das Konzept der Thermodynamischen Realisierbarkeit, ist nicht an ein bestimmtes Optimierungskriterium gebunden; es kann also mit verschiedenen Kriterien variabel kombiniert werden. Die Methode ist in dem Softwarepaket FASIMU[86] implementiert, welches in Zusammenhang mit dem CPLEX-Solver für die Berechnungen verwendet wurde.

3.2 Anwendung: Wachstum von *E.coli* auf Glucose

Experimentelle Datengrundlage

Verwendete Daten Um die TR-Methodik zu validieren, sind parallel bestimmte Stoffflüsse und Metabolitkonzentrationen notwendig. Eine umfassende Studie, die beide Daten enthält, wurde im Jahr 2007 von einer japanischen Gruppe veröffentlicht[93]. Anhand von Metabolitkonzentrationen, Proteinmengen, Stoffwechselflüssen und mRNS-Mengen verfolgten die Wissenschaftler die Reaktion von *E.coli* auf innere (genetische) und äußere Störungen.

Provozierte Störungen: Wachstumsrate & Mutation In der Studie wird *E.coli* K-12 (BW25113) im *Chemostat* bei 37°C und pH 7.0, in einem definierten Medium¹ und unter permanenter Sauerstoffzufuhr ($1 \frac{l}{min}$) kultiviert. Das Wachstum wird dabei durch den Zufluss von Glucose beschränkt. Die Anpassung der Bakterien an veränderte Wachstumsbedingungen provozierten die Wissenschaftler durch Variation der Durchflussgeschwindigkeit von 0.1l/h bis 0.7l/h. Dabei ermöglicht die schnellere Versorgung mit frischem Substrat und die stetige Eindämmung der Bakterienpopulation durch einen entsprechend schnelleren Abtransport den Zellen ein schnelleres Wachstum, d.h. die Experimente unterscheiden sich in den zellulären Wachstumsraten. Zusätzlich wurde bei konstanter Durchflussgeschwindigkeit von 0,2l/h der Wildtyp (K-12), sowie 24 lebensfähige Einzelgenmutanten untersucht. Insgesamt gibt es zu den 5 Referenzmessungen somit weitere 29 Datensätze.

Erhobene Daten Die Ergebnisse, sowie die Rohdaten dieses umfangreichen Projektes sind auf einer eigenen Internetseite² gut aufgearbeitet und frei zugänglich. Bezogen auf den Zentralstoffwechsel von *E.coli* wurden pro Datensatz folgende Daten erhoben:

¹48mM Na₂HPO₄, 22mM KH₂PO₄, 10mM NaCl, 45mM (NH₄)₂SO₄, 4 $\frac{g}{l}$ glucose + 1mM Spurenelemente

²<http://ecoli.iab.keio.ac.jp/>

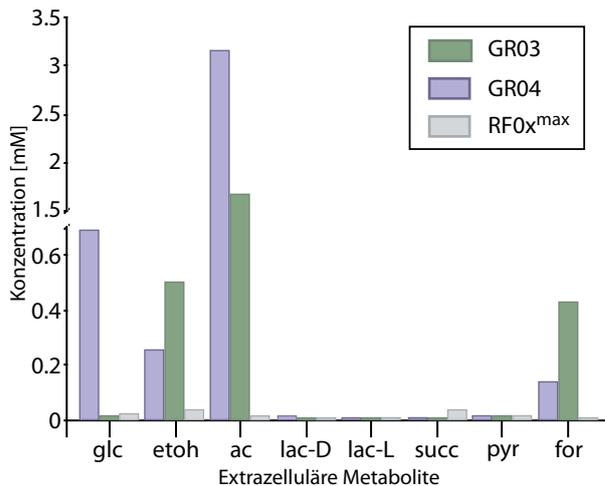


Abbildung 3.2: Gemessene Metabolitkonzentrationen im Ausfluss des Chemostaten in Abhängigkeit der Durchflussgeschwindigkeit d : im Referenzfall bei $d = 0,2h^{-1}$ (RF03, RF05 und RF06), bei $d = 0,5h^{-1}$ (GR03) und $d = 0,7h^{-1}$ (GR04).

- 85 mRNS Expressionslevel mittels qRT-PCR und *E.coli*-Filgen-Microarray
- 57 Proteinkonzentrationen (mit LC-MS/MS), für 28 von ihnen wurden die Ergebnisse über 2D-DIGE und MS überprüft
- 130 intrazelluläre Metabolitkonzentrationen via CE-TOFMS
- 50 Flüsse des Zentralstoffwechsels über ^{13}C -markierte Glucose und GC-MS
- Extrazelluläre Konzentrationen: O_2 , CO_2 , Glucose, Ethanol, Lactat, Acetat, Formiat, Succinat, Pyruvat

Experimentelle Beobachtungen

Da Mutationen generell einen Eingriff in die Netzwerkstruktur bedeuten, beschränken wir uns hier auf die Flussvorhersage bei veränderten Wachstumsbedingungen, konkret bei einer Durchflussgeschwindigkeit von $0,5h^{-1}$ (GR03) und $0,7h^{-1}$ (GR04). Neben der Wachstumsrate unterscheidet sich das Wachstum bei $0,5h^{-1}$ oder $0,7h^{-1}$ in der Synthese von Nebenprodukten: Während im Referenzfall bei $d = 0,2h^{-1}$ (RF03, RF05 und RF06), die angebotene Glucose ohne weitere Bildung von Nebenprodukten komplett zu CO_2 veratmet wird, entstehen bei $d = 0,5h^{-1}$ (GR03) Ethanol, Acetat und Formiat als Nebenprodukte. Bei $d = 0,7h^{-1}$ (GR04) wird das Substrat Glucose nicht vollständig verstoffwechselt und als Nebenprodukt wird überwiegend Acetat gebildet (siehe Abbildung 3.2).

Weiterhin unterscheiden sich die Stoffflüsse von GR03 und GR04 in den am Auffüllen der Zitratzyklus-Intermediate beteiligten Reaktionen (siehe Abb.3.3). Während beispielsweise in der Referenzlösung, sowie in GR04, 2-Oxoglutarat ausschließlich aus Pentosephosphat über die Pyruvatkinase (13) erzeugt wird ($v_{34} \approx (v_{48} + v_{49})$), wird in GR03 die Synthese von 2-Oxoglutarat zusätzlich durch die Aktivität der Pep-Carboxylase (52) unterstützt ($v_{34} > (v_{48} + v_{49})$).

Nebenprodukte bei GR03 & GR04

Pep-Carboxylase-Aktivität

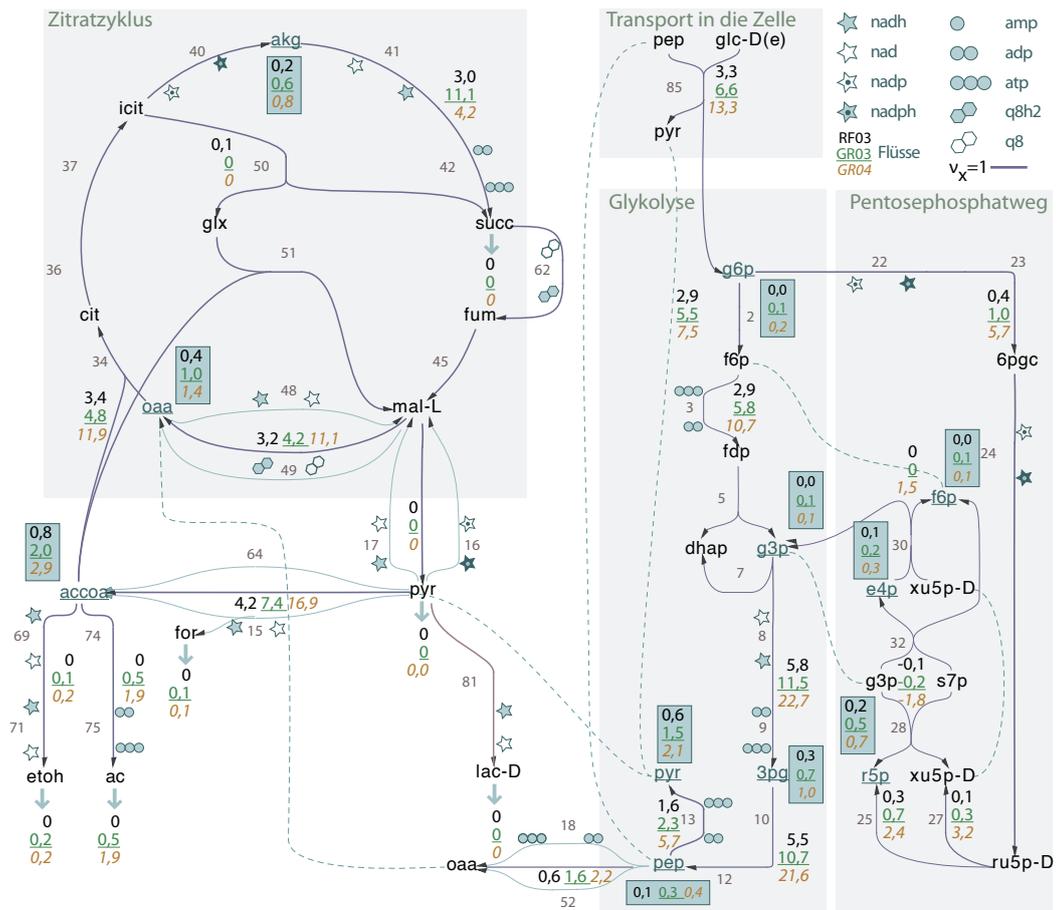


Abbildung 3.3: Experimentell gemessene Flussverteilungen aus der Arbeit von Ishii et al. Von oben nach unten sind jeweils die Werte für Referenz, GR03 und GR04 dargestellt.

Berücksichtigung der Thermodynamik

rev	Keine thermodynamischen Einschränkungen, d.h. alle Reaktionen sind reversibel
Keq	Wichtung der thermodynamisch ungünstigeren Reaktionsrichtung (Rückrichtung) mit der Gleichgewichtskonstante (siehe Seite 28)
Fst	Heuristische Richtungseinschränkungen, wie im Feist-Modell angegeben
TR	Einschränkende Metabolitkonzentrationen, d.h. das TR-Konzept beschränkt auf "hard bounds" (siehe Seite 46)
TRs	Anwendung des TR-Konzeptes unter Verwendung der Toleranzbereiche und Sollwertkonzentrationen (Gleichungen 3.4 und 3.5)

Optimierungskriterien

min $\sum v_i$	Flussminimierung
max Bio	Maximierung der Biomasseausbeute
min Glc	Minimierung des Glucoseeintrages

Tabelle 3.1: *Untersuchte Einflussgrößen und Rechnungsvarianten***Zusätzliche Nebenbedingungen bei globaler Optimierung**

X	Die Austauschraten werden als Nebenbedingungen jeweils relativ zum Glucoseeintrag fixiert, d.h. für GR03 gilt beispielsweise: $v_{87} = 1.97v_{85}$. Der Austausch von CO ₂ wird dabei vernachlässigt, da diese Rate von nicht berücksichtigten Prozessen stark beeinflusst sein kann.
Xb	Dabei werden die gemessenen Austauschraten vorgegeben (z.B. für die Glucoseaufnahme $v_{85} = 6.63$) und der Biomassefluss entsprechend auf die Wachstumsrate , d.h. auf 0.5 bzw. 0.7h ⁻¹ gesetzt.

Tabelle 3.2: *Zusätzliche Nebenbedingungen bei globaler Optimierung***Optimierungskriterien und Nebenbedingungen**

Es werden fünf Möglichkeiten, thermodynamische Prinzipien in die Berechnung von Flussvorhersagen einzubeziehen, untersucht. Bei Verwendung von Sollwertkonzentrationen (TRs) gehen gemessene Metabolitkonzentrationen mit ein, d.h. die Ergebnisse sind spezifisch für ein Experiment (GR03 oder GR04), alle anderen sind "universell" im Sinne von "unabhängig vom gewählten Experiment".

Nur TRs ist spezifisch

Um den Einfluss des Optimierungskriteriums zu studieren, wird das TR-Konzept in Kombination mit 3 verschiedenen Optimierungskriterien untersucht, wobei für die Vorhersage global optimierter Flusslösungen neben den Metabolitkonzentrationen weitere experimentelle Daten berücksichtigt werden. Tabellen 3.1 und 3.2 fassen die untersuchten Einflussgrößen zusammen.

3.2.1 Aufstellen des FBA-Modells

Da das der experimentellen Flussbestimmung zugrunde liegende Stoffwechselmodell von Ishii *et al.*[93] uns in einigen Aspekten zu ungenau erschien (der Energiestoffwechsel ist beispielsweise nicht enthalten), entschieden wir uns für die Verwendung eines komplexeren Modells basierend auf der Arbeit von Schütz *et al.*[182]. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurden Enzymaktivitäten, die von Ishii *et al.* bei der Bestimmung der Flüsse vernachlässigt wurden, ebenfalls vernachlässigt. Wir arbeiten daher mit einem reduzierten Modell, in dem u.a. der Methylglyoxalweg (Reaktion 84) entfernt wurde. Das Gesamtmodell (im Folgenden als “Schütz-Modell” bezeichnet) ist als Grundlage für weitere Rechnungen im Anhang erläutert (Seite 112, Tabelle 6).

Stöchiometrisches Modell

Mögliche Austausch

Das reduzierte Modell umfasst insgesamt 59 Reaktionen und erlaubt die Aufnahme von Glucose, Sauerstoff und Phosphat, und die Abgabe von CO₂, Pyruvat, Formiat, D-Lactat, Succinat, Ethanol, Acetat sowie dem virtuellen Energieäquivalent *atpEnergy* (siehe Abbildung 3.3). Die Glucose wird über das Phosphotransferase-System (PTS, Reaktion 85) unter Umwandlung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat aufgenommen und über die Glykolyse oder den Pentose-Phosphat-Weg (PP) in Pyruvat umgewandelt. Die Ausbeute dabei ist unterschiedlich: Glykolyse: 2 atp + 2 nadh, andernfalls 1 atp + 1 nadh + 2 nadph.

Pyruvat-Stoffwechsel

Das entstandene Pyruvat kann direkt ins Medium abgegeben werden, in Lactat, Acetat oder Ethanol umgewandelt werden oder auf einem der beiden verfügbaren Wege (64 oder 15) in Acetyl-CoA weiter verstoffwechselt werden, um den Zitratzyklus zu speisen. Die Umwandlung von Pyruvat zu Malat via Malic Enzyme verläuft in der Regel in umgekehrter Richtung, weshalb dies eher ein Pyruvat-Zufluss ist.

Glyoxalatshunt

Das Modell enthält weiterhin den Zitratzyklus, den Glyoxalatshunt und die Synthese von Ethanol und Acetat aus Acetyl-CoA. Der Glyoxalatshunt (50,51), welcher bei erhöhter Wachstumsrate des Wildtyps ($> 0,4h^{-1}$) aufgrund experimenteller Befunde[135] als vernachlässigbar angesehen wird, ist für Rechnungen der Referenzexperimente (bei $0,2h^{-1}$) im Modell enthalten, trägt in den GR03- und GR04-Simulationen aber keinen Fluss.

Energiegewinnung

Die Energiegewinnung erfolgt über Substratphosphorylierung oder die Veratmung von Sauerstoff. Dazu enthält das Modell zwei Cytochrome, CYTBO3_4pp und CYTBDpp, die die von den Substraten abgegebenen Protonen und Elektronen vom Ubiquinon-8 (q8), welches bei aerobem Wachstum die höchste aller Quinon-Konzentrationen aufweist[221] (siehe Seite 113), empfangen und auf Sauerstoff übertragen (in Klammern jeweils die Reaktions-ID).

Unterschiede zum Modell von Ishii

Für die spätere Auswertung von Bedeutung sind folgende 4 Umwandlungen, die hier detaillierter als im Ishii-Modell berücksichtigt werden:

- Die nadp-abhängige (16) oder nad-abhängige (17) Umsetzung von Malat zu Pyruvat (Malic Enzyme)
- Die nad-abhängige (48) oder Ubiquinonabhängige (49) Umsetzung von Malat zu

Oxalacetat durch die Malatdehydrogenasen, MDH

- Die atp-abhängige Umsetzung von Oxalacetat nach Phosphoenolpyruvat (18) oder die atp-unabhängige Rückreaktion (52)
- Die Umsetzung von Pyruvat nach Acetyl-CoA durch die nad-abhängige Pyruvatdehydrogenase (15) oder die Formiat-generierende Umsetzung durch die Pyruvat-Formiat-Lyase, PFL (64)

Die Einschränkungen der Reaktionsrichtungen im Modell von Ishii *et al.* werden nicht übernommen. Von den insgesamt 59 Reaktionen sind jedoch 6 durch die gewählten Umgebungsbedingungen und die Netzwerkstruktur per se irreversibel: die Phosphataufnahme (115), die Ethanol- (69,71), Acetat- (74,75) und D-Lactatsynthese (81). Das reduzierte Modell besitzt 13 Freiheitsgrade, d.h. 13 Flüsse müssen “gemessen” werden, um den gesamten Kohlenstofffluss zu bestimmen. Um den Stofffluss im Ishii-Modell (56 beteiligte Flüsse) zu rekonstruieren, genügen jedoch 9 bekannte Flüsse¹: bei Normierung auf den Glucoseeintrag (v_{85}) könnten dies beispielsweise 5 weitere Austauschflüsse ($v_{90}, v_{91}, v_{92}, v_{93}, v_{94}$) und 3 interne Flüsse (v_2, v_{13}, v_{51}) sein.

Reaktionsrichtungen

RID	Name	Reaktionsgleichung	K_{eq}	$\Delta G \frac{kJ}{mol}$
2	PGI	[c]g6p \rightleftharpoons f6p	4	-3,4
3	PFK	[c]f6p + atp* \rightarrow fdp + adp* + hp*	616	-15,9
5	FBA*	[c]dhap + g3p \rightleftharpoons fdp	1211	-17,6
7	TPI*	[c]g3p \rightleftharpoons dhap	11	-5,9
8	GAPD	[c]g3p + nad* + pi* \rightleftharpoons hp* + nadh* + 13dpg	1	-0,4
9	PGK*	[c]13dpg + adp* \rightleftharpoons 3pg + atp*	114	-11,7
10	PGM*	[c]3pg \rightleftharpoons 2pg	1	0,0
12	ENO	[c]2pg \rightleftharpoons pep + h2o*	5	-3,8
13	PYK	[c]pep + adp* + hp* \rightarrow pyr + atp*	7771	-22,2
15	PDH	[c]pyr + coa* + nad* \rightarrow accoa + co2* + nadh*	1.2E+06	-34,8
16	ME2*	[c]pyr + nadph* + co2* \leftarrow mal-L + nadp*	15	-6,7
17	ME1*	[c]pyr + nadh* + co2* \leftarrow mal-L + nad*	9	-5,4
18	PPCK*	[c]pep + co2* + adp* \leftarrow oaa + atp*	1	-0,8
22	G6PDH2r	[c]g6p + nadp* \rightleftharpoons 6pgl + nadph* + hp*	15	-6,7
23	PGL	[c]6pgl + h2o* \rightarrow 6pgc + hp*	5542	-21,4
24	GND*	[c] nadph* + co2* + ru5p-D \leftarrow 6pgc + nadp*	5	-3,8
25	RPI*	[c]ru5p-D \rightleftharpoons r5p	2	-2,1
27	RPE	[c]ru5p-D \rightleftharpoons xu5p-D	1	0,0
28	TKT1*	[c]g3p + s7p \rightleftharpoons r5p + xu5p-D	25	-8,0
30	TKT2	[c]xu5p-D + e4p \rightleftharpoons f6p + g3p	18	-7,1
32	TALA	[c]g3p + s7p \rightleftharpoons e4p + f6p	18	-7,1
34	CS	[c]accoa + oaa + h2o* \rightarrow coa* + cit + hp*	2.1E+06	-36,0
36	ACONTa*	[c]acon-C + h2o* \rightleftharpoons cit	13	-6,3
37	ACONTb	[c]acon-C + h2o* \rightleftharpoons icit	1	-0,8
40	ICDHyr*	[c]co2* + nadph* + akgl \rightleftharpoons icit + nadp*	313	-14,2
41	AKGDH	[c]akgl + coa* + nad* \rightarrow co2* + nadh* + succoa	1.2E+06	-34,8
42	SUCOAS	[c]atp* + coa* + succ \rightleftharpoons succoa + adp* + pi*	5	-4,2
45	FUM	[c]fum + h2o* \rightleftharpoons mal-L	3	-2,5
48	MDH*	[c]nadh* + oaa + hp* \rightleftharpoons mal-L + nad*	49883	-26,8
49	MDH2	[c]mal-L + q8 \rightarrow q8h2 + oaa	1.0E+08	-45,7
50	ICL*	[c]glx + succ \rightleftharpoons icit	3952	-20,5
51	MALS	[c]glx + accoa + h2o* \rightarrow mal-L + coa* + hp*	2.4E+06	-36,5
52	PPC	[c]pep + co2* + h2o* \rightarrow oaa + pi* + hp*	98079	-28,5
53	THD2pp*	nadh[c] + (2) h[e] + nadp[c] \rightarrow nadph[c] + (2) h[c] + nad[c]	7573	-22,1
54	NADTRHD	[c]nadph + nad \rightarrow nadh + nadp	2	-1,3
55	ATPS4rpp*	(3) h[e] + adp[c] + pi[c]* + hp*[c] \rightarrow atp[c] + (3) h[c] + h2o[c]*	20	-7,4
56	NADH16pp	nadh[c] + hp*[c] + q8[c] + (3) h[c] \rightarrow q8h2[c] + (3) h[e] + nad[c]	4.2E+06	-37,8

Fortsetzung auf der nächsten Seite

¹Eine Unterscheidung von v_{16}/v_{17} , v_{18}/v_{52} , v_{15}/v_{64} und v_{48}/v_{49} ist nicht notwendig, da dafür auch keine vergleichbaren Daten zur Verfügung stehen.

Tabelle 3.3 – (Fortsetzung)

RID	Name	Reaktionsgleichung	K_{eq}	$\Delta G \frac{kJ}{mol}$
57	NADH5	[c]nadh + q8 + hp* → q8h2 + nad	5.9E+12	-72,9
58	CYTBO3_4pp	(2) q8h2[c] + (1) o2[c] + (8) h[c] → (2) q8[c] + (8) h[e] + (2) h2o[c]*	8.1E+10	-62,3
59	CYTBDpp	(2) q8h2[c] + (1) o2[c] + (4) h[c] → (2) q8[c] + (4) h[e] + (2) h2o[c]*	1.3E+19	-109,1
62	SUCDi	[c]succ + q8 → fum + q8h2	35	-8,8
64	PFL	[c]pyr + coa* ⇌ accoa + for	5542	-21,4
66	FDH4pp,FORtpi	for[c] + hp*[c] + h[c] + q8[c] → co2[c] + h[e] + q8h2[c]	1.0E+13	-74,2
69	ACALD	[c]acald + coa* + nad* ⇌ accoa + nadh* + hp*	1698	-18,4
71	ALCD2x*	[c]acald + nadh* + hp* ⇌ etoh + nad*	25371	-25,1
74	PTAr*	[c]actp + coa* ⇌ accoa + pi*	616	-15,9
75	ACKr*	[c]actp + adp* ⇌ atp* + ac	1434	-18,0
81	LDH_D*	[c]nadh* + pyr + hp* ⇌ lac-D + nad*	49883	-26,8
85	GLCptspp	glc-D[e] + pep[c] → g6p[c] + pyr[c]	4.8E+06	-38,1
86	CO2tex*	co2[c] → co2[e]	1	0,0
87	O2tex	o2[e] → o2[c]	1	0,0
90	ETOHtex*	etoh[c] ⇌ etoh[e]	1	0,0
91	ACTex*	ac[c] ⇌ ac[e]	1	0,0
92	SUCCtex*	succ[c] → succ[e]	1	0,0
93	D-LACTex*	lac-D[c] → lac-D[e]	1	0,0
94	PYRtex*	pyr[c] → pyr[e]	1	0,0
95	FORtex*	for[c] → for[e]	1	0,0
97	ATPM	atp[c] + h2o[c]* → atpEnergy[e] + adp[c] + hp[c]* + pi[c]*	69946	-27,7
115	Plt2rpp	h[e] + pi[e] ⇌ h[c] + pi[c]	112	-11,7

Tabelle 3.3: Reaktionsschema des reduzierten *E.coli*-Modells

Zuordnung von $\Delta_R G^\circ$ -Werten und Definition der Reaktionsrichtung

Geschätzte $\Delta_R G^\circ$ -Werte Die $\Delta_R G^\circ$ -Werte entsprechen fast ausschließlich den (mit einer überarbeiteten Version der Gruppenübertragungsmethode[96]) geschätzten Werten im genomweiten *E.coli*-Modell von Feist *et al.*[52] (Werte für pH 7.2). Nur in Einzelfällen wurden Werte angepasst (siehe Tabelle 4). Insbesondere bei Reaktionen, die die Energie des Protonengradienten nutzen oder an dessen Aufbau beteiligt sind, wurde der $\Delta_R G^\circ$ -Wert um 11,7 kJ pro transloziertes Proton erhöht oder reduziert (siehe Rechenbeispiel Seite 115).

Konsistenz der Werte Die Konsistenz der Werte wurde mit Hilfe der Methode “*well-formed-equilibriums*” des FASIMU-Softwarepaketes[86] überprüft: das Optimierungsproblem in Gleichung 3.3 wurde gelöst und die geringfügigen Korrekturvorschläge (maximale Abweichung von 9e-05) übernommen. Anschließend wurden die Reaktionsgleichungen derart notiert, dass die Reaktion von links nach rechts jeweils in Richtung abnehmender chemischer Energie abläuft, also $\Delta_R G^\circ < 0 \frac{kJ}{mol}$. Reaktionen, korrigierte $\Delta_R G^\circ$ -Werte und korrespondierende Gleichgewichtskonstanten k sind der Tabelle 3.3 zu entnehmen.

Recherche der Metabolitkonzentrationsbereiche

Datenrecherche Zusätzlich zu den Metabolitkonzentrationen von Ishii *et al.*[93] verwenden wir Werte einer Studie von Ohashi *et al.*[141]. Die Autoren untersuchen darin den Einfluss von Histidinmangel in aerob gewachsenen *E.coli*-Zellen, wofür sie 198 Metabolitprofile an je 4 Zeitpunkten aufgenommen haben¹. Weiterhin werden Metabolitprofile von Bennet

¹ebenfalls via CE-TOFMS

et al.[15] zum Vergleich des aeroben Wachstums von *E.coli* auf Glucose, Glycerate und Acetate (via LC-MS/MS) verwendet. Ergänzt werden diese drei Datensätze durch recherchierte Konzentrationsbereiche von Kümmel *et al.*[119], einigen simulierten Daten von Schaub *et al.*[175], sowie durch Annahmen in folgenden Sonderfällen:

- Für Metabolite, bei denen metabolische Regulation und Diffusion Konzentrationsunterschiede ausreichend schnell ausgleichen, wird eine konstante Konzentration angenommen. Dies betrifft: externe Glucose (4g/l), externes Phosphat (70mM), Protonen an der äußeren Membranseite (63nM), intrazelluläres CO₂ (nach Abschätzung durch Merlin *et al.*[131] 10μM) und Wasser (1M). Da der pH-Wert bei der Abschätzung der Δ_RG[°]-Werte bereits einfließt, werden zytosolische Protonen nicht berücksichtigt. Sie werden, wie auch der virtuelle Metabolit atpEnergy, durch willkürliche Annahme von 1M vom TR-Kriterium ausgeschlossen.
- Die Protonenkonzentration an der äußeren Membran (h(e)) wurde mit 63nM - einem pH von 7,2 entsprechend - an die Daten von Zilberstein *et al.*[224] angepasst, auf denen die Berechnung des Protonengradienten beruht (siehe Seite 115). Die Konzentration der Protonen an der Innenseite darf zwischen 1nM (≈pH 8.0) und 2nM (≈pH 7.7) schwanken, mit einem Sollwert von 1,41nM (≈pH 7,85), entsprechend den Messungen von Zilberstein *et al.*.
- Der Konzentrationsbereich für Sauerstoff im Medium (von 58μM bis 228μM) entspricht der gelösten O₂-Konzentration unter Luftdruck (0,2095bar) und unter dem Druck, der in einem Chemostat mit 1 Liter Volumen minimal erreicht wird (0,0533bar)[41]. Analog dazu wurde die Konzentration an gelöstem CO₂ unter Luftdruck (0,00034bar) und bei 30mmHg (0,04bar) auf 9μM bis 1,064mM bestimmt².
- Für bislang nicht erwähnte extrazelluläre Metabolite wurde als obere Schranke die jeweils höchste Konzentration der Studie von Ishii *et al.*, als untere Schranke (willkürlich) eine sehr niedrige Konzentration von 100nM gewählt.

Für einige Metabolite wurden trotz intensiver Recherche keine geeigneten Werte zur Beschränkung der Konzentrationsbereiche gefunden. Für diese insgesamt 11 intrazellulären Metabolite (Formiat, Glyoxylat, Ubiquinon, Ubiquinol, Isocitrat, Ethanol, Acetaldehyd, Acetat) wurden die Standardwerte aus Hoppe *et al.*[87] übernommen, d.h. 5μM als untere und 2mM als obere Schranke.

Der zulässige Konzentrationsbereich der im Modell enthaltenen Metabolite ergibt sich aus den minimalen und maximalen Konzentrationen innerhalb dieser Datensammlung. Lediglich für Coenzym-A (CoA), Acetyl-CoA und Succinyl-CoA wurden ausschließlich Werte aus der Arbeit von Ishii *et al.* verwendet, um der Stofferhaltung des Coenzym-A gerecht zu werden. Die Werte sind in Tabelle 9 im Anhang aufgeführt.

*Zulässige
Konzentration*

Während die Sollwerte den im jeweiligen Experiment gemessenen Konzentrationen entsprechen, orientieren sich Toleranzbereiche an den minimalen und maximalen Kon-

*Sollwert und
Toleranzbereich*

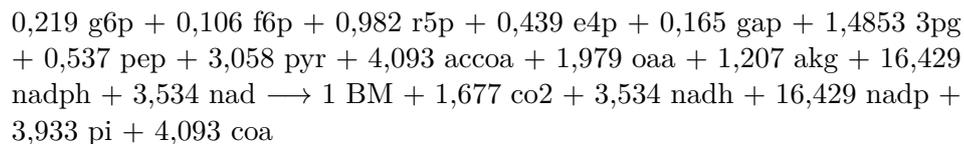
²Die Konzentration der gelösten Teilchen in Wasser C_s ist der Teilchenkonzentration in der Luft proportional (Henry-Gesetz): $C_s[mol/l] = K_H * p$. Die Henry-Konstante K_H errechnet sich aus dem entsprechenden Bunsenschen Absorptionskoeffizienten K_B (in Wasser, bei 35°C ist $K_B^{O_2} = 0,0244[1/bar]$ und $K_B^{CO_2} = 0,592[1/bar]$ [118]) dividiert durch das Molvolumen (bei idealen Gasen 22,4l/mol, für Kohlendioxid 22,262l/mol).

zentrationen in der gesamten Studie von Ishii *et al.* und sind damit für GR03 und GR04 gleich. Für Metabolite, für die keine Messung von Ishii *et al.* vorliegt, entspricht der Toleranzbereich dem zulässigen Metabolitkonzentrationsbereich und dessen geometrisches Mittel dient als Sollwertvorgabe¹. Die verwendeten Sollwerte und Toleranzbereiche sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Definition der Zielmetabolite

Als primäres Stoffwechselziel exponentiell wachsender *E.coli*-Zellen wird die Vermehrung ihrer Biomasse und damit die Synthese entsprechender Grundbausteine und Vorläufermetabolite angenommen. Tabelle 1 im Anhang enthält eine Übersicht der Metabolite, die für die Berücksichtigung der wichtigsten Stoffwechselfunktionen im Zentralstoffwechsel von *E.coli* zu den notwendigen Vorläufern und Grundbausteinen gezählt werden.

Die für die Biomasseproduktion notwendigen Anteile dieser Zielmetabolite werden der Arbeit von Li *et al.*[121] entnommen. Der Energiebedarf wird sowohl bei Ishii *et al.*, als auch bei Li *et al.* ausschließlich in NADPH-Molekülen angegeben². Die Pseudoreaktionsgleichung zur Synthese von Biomasse lautet wie folgt:



¹Lediglich im Falle der Standardwerte wurde der Sollwert willkürlich auf 0.26mM statt 0.1mM (geometrisches Mittel) gesetzt, was allerdings keinerlei Einfluss auf die Flussvorhersagen zeigte.

²Die in überschüssigem ATP enthaltene Energie kann jedoch als *atpEnergy* das System verlassen.

3.3 Ergebnisse

In diesem Kapitel untersuchen wir den Einfluss des TR-Konzepts auf die Qualität der Flussvorhersage bei Berechnung optimaler Flussverteilungen. Neben 5 verschiedenen Möglichkeiten die Thermodynamik zu berücksichtigen (Keq, rev, Fst, TR, TRs) wird zusätzlich der Einfluss folgender 3 Aspekte untersucht:

- Linear kombinierte Einzelzieloptimierungen statt globale Optimierung
- Wahl des Optimierungskriteriums ($\min \sum v_i$, max Bio, min Glc)
- Integration experimenteller Austauschraten (X) und der Wachstumsrate (Xb)

Als Vorbetrachtung untersuchen wir, inwieweit der Lösungsraum von der Einschränkung durch zulässige Metabolitkonzentration (TR) und a priori festgelegte, irreversible Reaktionen (Fst) betroffen ist.

3.3.1 Effektive Reversibilitätseinschränkungen

Die minimalen und maximalen Konzentrationen verschiedener Metabolomics-Studien begrenzen den Bereich zulässiger Metabolitkonzentrationen (hard bounds). Analog der Methode von Kümmel *et al.*[120] erlauben sie die Berechnung minimaler und maximaler Reaktionsenthalpien (siehe Gleichungen 3.1 und 3.2), welche zusammen mit den daraus resultierenden Einschränkungen in Tabelle 3.4 aufgeführt sind (Spalte K). Von den betrachteten 46 internen Reaktionen unterliegen 14 einer thermodynamischen Richtungseinschränkung; 12 davon stimmen mit denen im Feist-Modell überein (Spalte F); 2 werden zusätzlich eingeschränkt (64 und 75).

*Statisch durch
zulässige Kon-
zentrationen*

Inwieweit aus diesen 14 bzw. 21 Einschränkungen die Inaktivität weiterer Reaktionsrichtungen folgt, wird anhand von ReaMinModen (siehe Seite 72) untersucht. Dazu wird die Realisierung jeder Reaktionsrichtung einmal als Stoffwechselziel definiert und eine entsprechende Minimalmode berechnet. Falls es keine Lösung gibt, ist diese Reaktionsrichtung blockiert. Dabei gelten gleiche Austauschbedingungen wie für alle weiteren Rechnungen: Sauerstoff, Glucose und Phosphat können aufgenommen und CO₂, Acetat, Succinat, Formiat, Ethanol, D-Lactat und atp-Energie abgegeben werden. Bereits die Definition möglicher Austausche und die Stöchiometrie des Netzwerks führen zu Einschränkungen der Reaktionsrichtungen: Acetat- (74,75), Ethanol- (69,71) und D-Lactatsynthese (81) sind nicht umkehrbar. Die thermodynamischen Einschränkungen in Spalte K verursachen zusätzlich die Irreversibilität des unteren Teils der Glykolyse (8,9,10,12), des Zitratzyklus (36,37,40,42), sowie die erste Reaktion des Pentose-Phosphat-Weges (22) - insgesamt 27 netzwerkbedingte, irreversible Reaktionen (Spalte S). Die Einschränkungen von Feist *et al.* unterbinden zudem die Umkehrung des oberen Teils der Glykolyse (3,5,7).

*Strukturell
bedingt*

Das TR-Kriterium gewährleistet, dass für alle Flüsse einer gefundenen Flusslösung es ein negatives $\Delta_R G$ gibt¹; es werden somit Richtungsabschätzungen im Netzwerk und nicht für isolierte Reaktionen gemacht. Wie in Tabelle 3.4 ersichtlich führt die Anwendung dieses Kriteriums zu weiteren 5 Einschränkungen: weitere Teile des Pentose-

*Netzwerk
bedingt (TR-
Kriterium)*

¹Die dafür notwendigen Metabolitkonzentrationen liegen innerhalb vorgegebener Schranken.

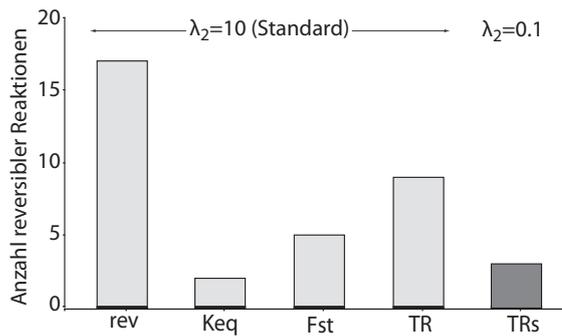


Abbildung 3.4: Anzahl reversibler Reaktionen innerhalb der MinModen-Berechnungen unter $\lambda_2 = 10$ (Standard) und $\lambda_2 = 0,1$. TRs unter Standardbedingungen enthält keine reversiblen Reaktionen und ist deshalb nicht dargestellt.

Phosphat-Weges (24,25) und der obere Teil der Glykolyse (3,5,7) werden irreversibel¹. Mit den heuristischen Reversibilitätseinschränkungen von Feist *et al.* gibt es größtenteils Übereinstimmung. Lediglich die Pyruvat-Formiat-Lyase (64) wird als irreversibel vorhergesagt, während Feist *et al.* annehmen, dass das Enzym in beide Richtungen arbeiten kann. Im Feist-Modell wird zudem die Richtung der oxidativen Phosphorylierung vorgegeben (53-56,58), einschließlich der ATPase (55). Unter Verwendung des TR-Konzeptes kann es hingegen zur Umkehrung der ATPase kommen, wobei adp zur Verfügung gestellt wird. Widersprüche gibt es beim nadp-abhängigen Malic Enzyme (16) und der Succinat-Dehydrogenase (62): nach TR sind diese Reaktionen reversibel, Feist *et al.* gehen jedoch von Irreversibilität aus.

Annahmen im Modell von Ishii *et al.*

Im Modell von Ishii *et al.* gibt es ebenfalls Annahmen zur Irreversibilität von Reaktionen. Erneute Bestimmung blockierter Reaktionsrichtungen (durch ReaMinModen) unter Verwendung der Ishii-Annahmen ergibt die zusätzliche Irreversibilität der GAPD (8) und PGK (9) (siehe Spalte I). Damit werden von Ishii *et al.* 4 zusätzliche Annahmen getroffen: die Fumarase (FUM,45), die Ribulosephosphat-3-Epimerase (RPE,27) und die Succinat-Dehydrogenase (SUCDi,62) katalysieren ausschließlich in Vorwärtsrichtung, Malic Enzyme (ME,16) ausschließlich in Rückwärtsrichtung. Die Annahmen für Reaktionen 16 und 62 werden von Feist *et al.* ebenfalls getroffen². In den Ergebnissen fließen allerdings nur RPE und ME in die im Ishii-Modell verbotene Richtung. Damit sind die Einschränkungen von Ishii *et al.* etwas restriktiver als von Feist *et al.*, welche wiederum etwas restriktiver sind, als das TR-Kriterium.

Reversibilität in berechneten MinModen

Wieviel der 14 bzw. 8 reversiblen Reaktionen tatsächlich innerhalb eines Minimalmodensets in beide Richtungen verwendet werden, zeigt Abbildung 3.4. Dabei kommt der Unterschied deutlich zum Vorschein, ob die Thermodynamik als Nebenbedingung den Lösungsraum einschränkt (TR, Fst), oder aber in die Definition einer optimalen Lösung einfließt (TRs, Keq): Beschränken wir uns auf zulässige Konzentrationsbereiche gibt es noch ca. 10 reversible Reaktionen im MinModen-Set, bei zusätzlicher Verwendung der Sollwerte und Toleranzbereiche und $\lambda_2 = 10$ fließen die Reaktionen in allen MinModen in die gleiche Richtung. Verringert man nun die Bestrafung der Abweichungen vom Sollwert auf $\lambda_2 = 0,1$ ergeben sich wieder 3 Reaktionen, die in beide Richtungen fließen. Eine ähnlich starke Gleichrichtung zeigt sich bei Wichtung der Rückrichtung mit der Gleichgewichtskonstante (Keq).

¹Welche der 5 Einschränkungen Ursache, und welche Konsequenz ist, ist nicht bekannt. Aber es ist anzunehmen, dass - analog zu Feist - die Reaktionen 3 und 24 die thermodynamischen Engpässe darstellen.

²Diese zusätzlichen Einschränkungen verursachen jedoch keine weiteren Irreversibilitäten.

RID	Name	$\Delta_R G_{min}$	$\Delta_R G^0$	$\Delta_R G_{max}$	K	S	P	F	FP	I
2	PGI	-17.18	-2.93	5.69						
3	PFK	-40.4	-15.92	6.29			→	→	→	→
5	FBA*	-16.92	-17.6	39.06			←	←	←	←
7	TPI*	-22.53	-5.87	14.07			←	←	←	←
8	GAPD	-17.6	-0.42	34.79		→	→	→	→	→
9	PGK*	-22.56	-11.73	10.05		→	→	→	→	→
10	PGM*	-10.35	0	6.05		→	→	→	→	→
12	ENO	-13.51	-3.77	3.98		→	→	→	→	→
13	PYK	-33.73	-22.21	-0.28	→	→	→	→	→	→
15	PDH	-74.47	-34.78	-24	→	→	→	→	→	→
16	ME2*	-9.84	-6.7	40.84				←	←	←
17	ME1*	11.68	-5.45	55.89	←	←	←	←	←	←
18	PPCK*	4.75	-0.84	45.74	←	←	←	←	←	n.e.
22	G6PDH2r	-21.73	-6.7	25.99		→	→	→	→	→
23	PGL	-37.65	-21.37	-14.04	→	→	→	→	→	→
24	GND*	-19.63	-3.49	47.94			←	←	←	←
25	RPI*	-19.35	-2.09	9.87			→	→	→	→
27	RPE	-21.74	0	6.49						→
28	TKT1*	-40.16	-7.96	13.93						
30	TKT2	-15.66	-7.12	25.97						
32	TALA	-36.67	-7.12	7.18						
34	CS	-59.24	-36.03	-2.02	→	→	→	→	→	→
36	ACONTa*	-17.88	-6.29	20.28		←	←	←	←	←
37	ACONTb	-9.63	-0.84	19.26		→	→	→	→	→
40	ICDHyr*	-22.62	-14.25	32.28		←	←	←	←	←
41	AKGDH	-81.2	-34.78	-30.45	→	→	→	→	→	→
42	SUCOAS	-32.08	-4.19	20.01		←	←	←	←	←
45	FUM	-18.09	-2.51	17.59						→
48	MDH*	-34.34	-26.82	17.41						n.e.
49	MDH2	-83.34	-45.67	-26.8	→	→	→	→	→	n.e.
52	PPC	-35.55	-28.49	-3.95	→	→	→	→	→	n.e.
53	THD2pp*	-42.35	-22.14	17.35				→	→	n.e.
54	NADTRHD	-46.43	-1.26	9.83				→	→	n.e.
55	ATPS4rpp*	-15.9	-7.45	13.48				→	→	n.e.
56	NADH16pp	-47.2	-37.39	12.54				→	→	n.e.
57	NADH5	-90.83	-72.49	-36.24	→	→	→	→	→	n.e.
58	CYTBO3_4pp	-46.4	-62.27	38.13				→	→	n.e.
59	CYTBDpp	-104.57	-109.07	-26.91	→	→	→	→	→	n.e.
62	SUCDi	-39.98	-8.8	20.65				→	→	→
64	PFL	-41.37	-21.37	-0.95	→	→	→	→	→	n.e.
66	FDH4pp&FORtppi	-99.33	-74.2	-53.08	→	→	→	→	→	n.e.
69	ACALD	-33.15	-18.44	28.29		←	←	←	←	←
71	ALCD2x*	-43.48	-25.14	11.11		→	→	→	→	→
74	PTAr*	-27.17	-15.92	6.83		←	←	←	←	←
75	ACKr*	-38.16	-18.02	-1.62	→	→	→	→	→	→
81	LDH_D*	-29.86	-26.82	0.17		→	→	→	→	→

Tabelle 3.4: Übersicht der Richtungseinschränkungen nach Kümmel et al. (Spalte K), dem TR-Konzept (Spalte S) und nach Feist et al. (Spalte F), sowie daraus folgende Einschränkungen ermittelt nach dem Pruningverfahren (Spalte P und FP) im Vergleich zu den Einschränkungen im Modell von Ishii et al. (Spalte I). Austauschreaktionen sind nicht dargestellt. Die Spalten 3 und 5 enthalten die minimalen und maximalen $\Delta_R G$ -Werte (in $\frac{kJ}{mol}$) bei Berücksichtigung des zulässigen Konzentrationsbereiches.

3.3.2 Evaluation unterschiedlicher Flussvorhersagen

Für die fünf Varianten (Keq, rev, TR, Fst, TRs) berechnen wir Minimalmoden, die entweder alle Flüsse minimieren (wobei $v_{Zielfluss} = 1$) oder einen Zielfluss maximieren. Die Minimalmoden werden mit Gewichtungsfaktoren aus Li *et al.*[121] linear kombiniert und die resultierende Flussverteilung den global optimierten Flussverteilungen gegenübergestellt.

*Fluss-
verhältnisse*

Zur Charakterisierung und zum Vergleich von Flussverteilungen hat sich, neben der Summe der quadrierten Abweichungen (RMSD), die Verwendung von Flussverhältnissen als sinnvoll erwiesen (siehe [182]). Diese beschreiben die relativen Anteile mit denen der Stofffluss sich an markanten Verzweigungen im Netzwerk aufteilt. Im Gegensatz zu den Verhältnissen von Schütz *et al.* soll durch die hier definierten Flussverhältnisse ein Entweder-Oder-Szenario abgebildet werden: der Fluss fließt beispielsweise entweder in die Glykolyse oder in den Pentose-Phosphat-Weg (R_1). Im Gegensatz zu einer gemittelten Abweichung lassen die Werte der Flussverhältnisse Rückschlüsse auf das vorhergesagte Flussgeschehen zu und lenken die Aufmerksamkeit (idealerweise) ausschließlich auf die Punkte im Netzwerk, an denen der vorhergesagte Stofffluss erstmals vom beobachteten abweicht. Die Definition der Flussverhältnisse $R_1 - R_8$ basiert auf 8 Flusswerten, die (bei Normierung auf Glucoseeintrag, $v_{85} = 100$) ausreichend sind, um die experimentell gemessenen Flussverteilungen von Ishii *et al.* im Modell abzubilden¹. Abbildung 3.5 veranschaulicht die Idee der Flussverhältnisse und gibt ihre Definitionen und die entsprechenden Werte für die experimentell bestimmten Flussverteilungen wieder.

*Allgemeine
Beobachtungen*

Für die erhöhten Wachstumsraten GR03 und GR04 wird der Glyoxalatshunt (Reaktion 50 und 51) vernachlässigt; R_3 ist somit immer null und wird im Folgenden nicht betrachtet. Abbildung 3.6 zeigt die Flussverhältnisse der berechneten Flussverteilungen für GR03 und GR04. Auf den ersten Blick fällt auf:

1. Die Flussverhältnisse für GR03 können besser vorhergesagt werden, als für GR04.
2. Unter Berücksichtigung experimentell gemessener Austauschraten (+X, +Xb) sind die Vorhersagen am genauesten, wobei in diesem Fall die Flussminimierung sich als Optimierungskriterium am besten eignet.
3. Die im 2. Kapitel verwendete Wichtung der Rückrichtung mit der Gleichgewichtskonstanten (Keq) liefert vergleichsweise schlechte Vorhersagen, sowohl in der globalen Optimierung, als auch als Linearkombination von Minimalmoden.
4. Die Anwendung von Richtungseinschränkungen, sowohl direkt (Fst), als auch indirekt über beschränkte Metabolitkonzentrationsbereiche (TR) liefert dagegen relativ gute Vorhersagen: Während in den Keq-Rechnungen zum Teil mehr Fructose-6-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat umgewandelt wird, als umgekehrt (dadurch ist $R_1 < 0$), arbeitet die PGI bei TR und Fst überwiegend in Vorwärtsrichtung (d.h. Glucose-6-Phosphat wird zu Fructose-6-Phosphat umgesetzt).

¹Exklusive der 4 nicht-aufgelösten Reaktionspaare 16/17, 18/52, 48/49, 15/64

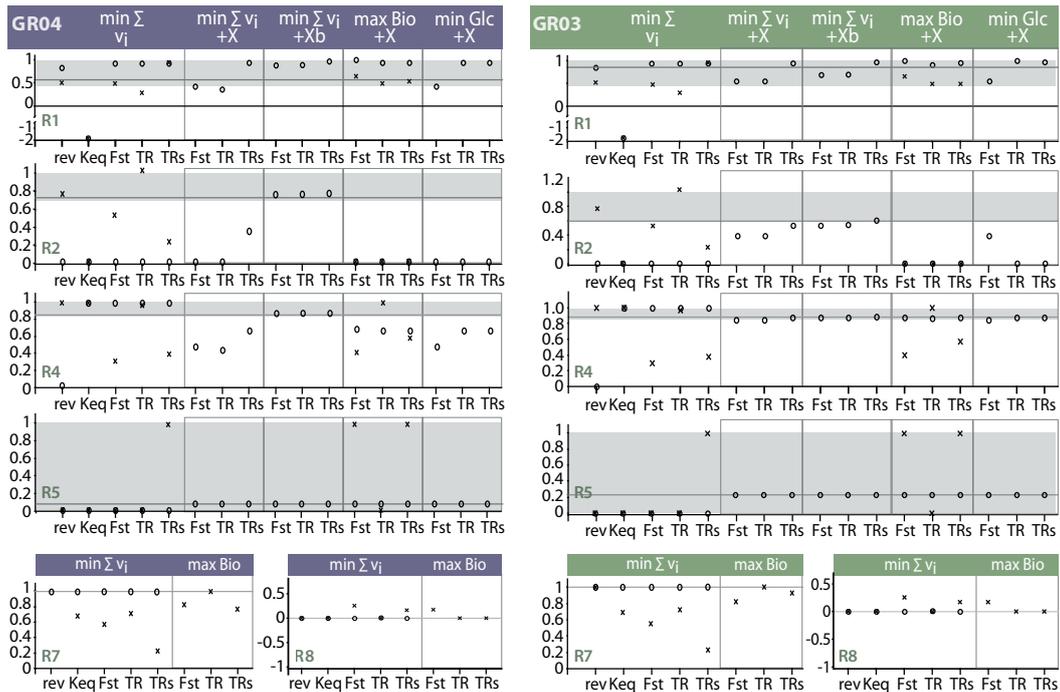


Abbildung 3.6: Flussverhältnisse der vorhergesagten Flussverteilungen im Vergleich mit den experimentellen Verhältnissen (durchgezogene Linie), sowohl der globalen (Kreis), als auch der linearkombinierten MinModen (Kreuz) für Experiment GR04 (links) und GR03 (rechts) unter Flussminimierung ($\min \sum v_i$), Maximierung des Biomass yields ($\max \text{Bio}$) und Minimierung des Glucoseeintrages ($\min \text{Glc}$), sowie unter Berücksichtigung der Austauschraten ($+X$) und zusätzlich der Wachstumsrate ($+Xb$). Der farblich hinterlegte Balken markiert den in der Gesamtstudie von Ishii et al. beobachteten Wertebereich der Flussverhältnisse. Die Verhältnisse wurden auf Grundlage der in den Tabellen 16 bis 19 im Anhang (Seite 140 bis 143) enthaltenen Werte erstellt.

5. In Kombination mit Flussminimierung oder Minimierung der Glucoseaufnahme rate wird in den TR-Rechnungen eine Aktivität der Pyruvatkinase (13) und damit zusätzlich zu dem über das PTS-System beim Glucoseimport erzeugten Pyruvat, ein Bedarf an Pyruvat (für die Synthese von Acetyl-CoA) vorhergesagt ($R_2 > 0$). Bei den Zielflussmaximierungen ist diese Reaktion nicht aktiv und R_2 deshalb null.
6. Die zusätzliche Verwendung der Sollwerte und Toleranzbereiche (TRs) verbessert bei globaler Optimierung zum Teil die Vorhersage. Auf die linear kombinierten Vorhersagen wirkt sich diese Zusatzbedingung eher nachteilig aus.
7. Die Übereinstimmung mit experimentellen Beobachtungen in der Vorhersage von R_4 (Zitratzyklus) und R_5 (Ethanolexport) hängt stark davon ab, ob Austauschraten vorgegeben sind, oder nicht. Ohne diese Vorgabe werden selten Nebenprodukte produziert, und wenn, dann häufig Ethanol. R_4 ist daher meist 1 und R_5 entweder 0 oder 1.

“rev”-Variante
überraschend
gut

Die MinModen-Kombination ohne Berücksichtigung der Thermodynamik (rev) ist überraschend gut in Übereinstimmung mit experimentellen Flussverhältnissen. Während in den einzelnen Minimalmoden die Synthese der Zielmetabolite zum Teil auf

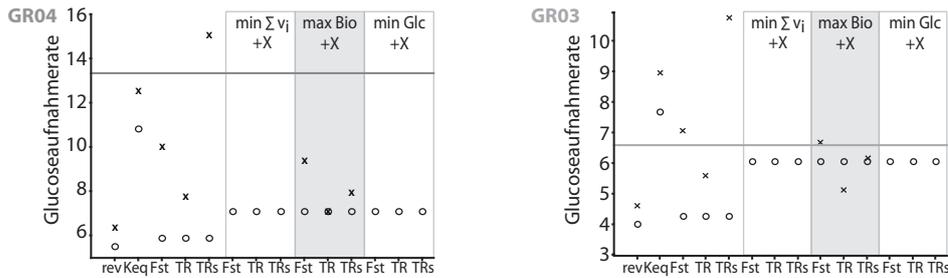


Abbildung 3.7: Vergleich der Glucose-Aufnahmerate linear-kombinierter (Kreuz) und global-optimierter (Kreis) Flussverteilungen für GR04 (links) und GR03 (rechts), normiert auf $v_{biomass} = 1$. Die eingezeichneten Geraden geben die experimentell bestimmten Aufnahmeraten wieder.

thermodynamisch unzulässigem Wege stattfindet (z.B. Umkehrung des Zitratzyklus und der Pyruvatkinase), ergeben sich - zum Teil diktiert durch die Umgebungsbedingungen - in der Summe thermodynamisch zulässige Flüsse (bis auf wenige Ausnahmen, wie der Rückwärtsfluss von Reaktion 52). Angesichts der Tatsache, dass keine GR03-spezifischen Daten in diese Berechnung einfließen und die Vorhersage somit für jedes Experiment der Ishii-Studie gleich lautet, ist die gute Übereinstimmung für Experiment GR03 rein zufällig; wenngleich die Vorhersage als grobe Abschätzung durchaus sinnvoll sein könnte.

Werden die Austauschraten (+X,+Xb) in der globalen Optimierung nicht berücksichtigt, so ist die Vorhersage durch linear kombinierte Flussmoden gleichwertig bis besser als global optimierte Flussverteilungen¹. In diesem Zusammenhang ist ein Vergleich der Glucoseaufnahmerate bei gleicher Biomasseproduktion interessant (siehe Abbildung 3.7). Die Grafik zeigt, dass die global optimierten Flusslösungen (sofern die Austauschraten nicht vorgegeben sind) "effizientere" Wege als tatsächlich beobachtet vorhersagen, d.h. für die gleiche Menge Biomasse wird weniger Glucose benötigt. Der Glucosebedarf der aus MinModen linearkombinierten Flussmoden schwankt dagegen um den experimentell gemessenen Wert. Auffällig ist, dass die Wichtung des Rückwärtsflusses mit der Gleichgewichtskonstanten (Keq), Moden mit einem stark erhöhtem Glucoseverbrauch erzeugt.

MinModen-Kombination gleichwertig

3.3.3 Varianz berechneter Metabolitkonzentrationen

Jede TRs-Rechnung liefert neben den Flusswerten auch Metabolitkonzentrationen, die diese Flusslösung unter Berücksichtigung der $\Delta_R G^\circ$ -Werte ermöglichen (siehe Gleichung 3.6). Diese können mit den vorgegebenen Sollwertkonzentrationen übereinstimmen - oder auch nicht. Während der Toleranzbereich für GR03 und GR04 gleich ist, sind die Sollwerte, sofern vorhanden, spezifisch und entsprechen den für GR03 oder GR04 gemessenen Werten. Es ist daher anzunehmen, dass mit zunehmender Bestrafung der Abweichungen vom Sollwert λ_2 (siehe Gleichung 3.6), die Spezifität der für GR03 und GR04 vorhergesagten Flussverteilungen zunimmt. Die Verwendung von $\lambda_2 = 0, 1$ (analog zu Hoppe *et al.*) hat sich diesbezüglich als zu schwach erwiesen (gleiche Flusslösungen für GR03-TRs und GR04-TRs). Ein erhöhter Wert von $\lambda_2 = 10$

λ_2 bestimmt Spezifität

¹gemessen am RMSD der Abweichungen der Gesamtflussverteilung, der Abweichungen in den Flussverhältnissen und dem qualitativen Maß

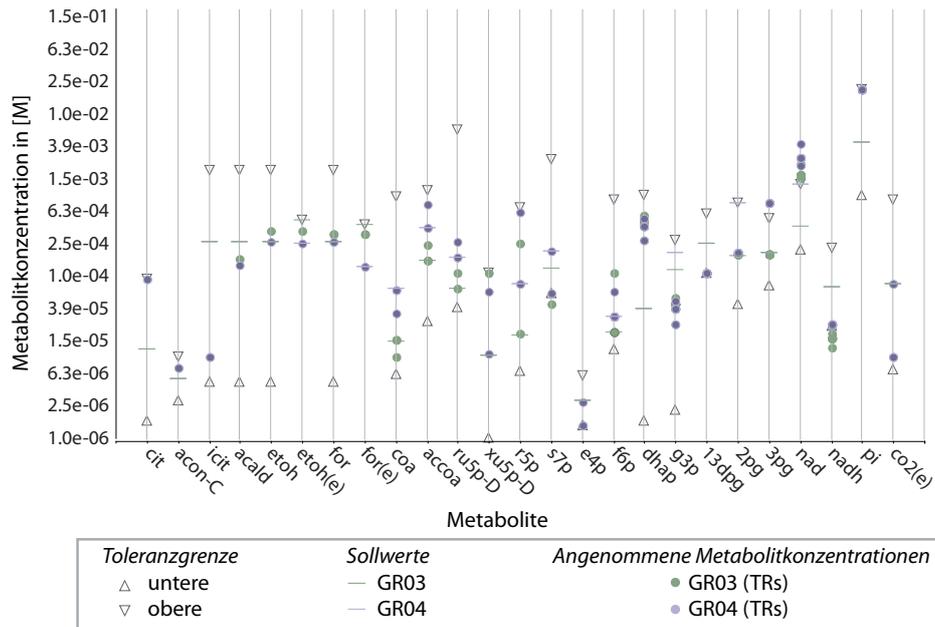


Abbildung 3.8: Vorhergesagte Metabolitkonzentrationen in den Minimalmoden der TRs Berechnungen für GR03 und GR04 (nur Flussminimierung)

sorgte für mehr Spezifität und verbesserte die Vorhersage der Flussverhältnisse, insbesondere für R_1 , deutlich¹.

Einfluss der Sollwerte

Die unter TRs vorhergesagten Konzentrationen der 4x12 Minimalmodenberechnungen (GR03/GR04, $\min \sum v_i / \max v_i$) geben einen Einblick in das für die Umsetzung entscheidende Zusammenspiel zwischen Gleichgewichtskonstante und Konzentrationsgefälle (siehe Abbildung 3.8). Ein Beispiel: Bei einer Gleichgewichtskonstante von 1 muss Ethanol innen mindestens in gleicher Konzentration wie außen vorliegen, damit es exportiert und nicht importiert wird. In GR03 wurde eine äußere Ethanolkonzentration von $490 \mu\text{M}$ gemessen; innen gilt für Ethanol der Standardsollwert von $260 \mu\text{M}$. Statt die äußere Konzentration nun auf mindestens $260 \mu\text{M}$ zu reduzieren, wird für innen, wie außen die Ethanolkonzentration auf $357 \mu\text{M}$ gesetzt. Diese Lösung wird bevorzugt, da bei Minimierung des Abstandsquadrates viele kleine Abweichungen günstiger sind als eine große.

Einfluss der Austauschraten

Bei Vorgabe der Austauschraten sind zum Teil drastische Abweichungen von den Sollwerten notwendig. Beispielsweise beträgt bei TRs(+X) die zytosolische Acetatkonzentration das 2,51 (GR03) bzw. 3,46 fache (GR04) des angesetzten Sollwerts; gleichzeitig werden die äußeren Konzentrationen radikal reduziert, so dass die äußere Acetatkonzentration der GR04-Simulation nur 29% des Sollwerts beträgt (Daten nicht gezeigt).

Kritik an geschätzten Sollwerten

Die Auswirkungen der Konzentrationsschranken im Zusammenspiel mehrerer Reaktionen werden in Abbildung 3.9 am Beispiel der Umsetzung von Citrat über cis-Aconitat zu Isocitrat näher erläutert. Dabei ist zu beobachten, dass die auf experimentellen Werten basierenden Sollwerte von Citrat und cis-Aconitat zugunsten der angestrebten Übereinstimmung mit dem geschätzten Sollwert von Isocitrat vernachlässigt werden.

¹Eine weitere Erhöhung auf $\lambda_2 = 1000$ brachte keine weitere Verbesserung.

I	Immer übereinstimmend ($0.98 < [M]_{TRs}/[M]_{sm} < 1.02$)	6pgc, 6pgl, fdp, co2, akgl, oaa, nadp, nadph,h, hp, h2o, h(e), o2, o2(e), q8, q8h2, pep, pyr, pyr(e), pi(e), mal-L, glc-D(e), g6p, adp, atp
II	Immer abweichend	2pg, 3pg, 13dpg, acald, acon-C, etoh, etoh(e), for, for(e), pi, cit, icit, nadh, s7p
III	Schwach variierend	r5p, accoa, coa, e4p, co2(e), xu5p-D
IV	Stark variierend	dhap, f6p, g3p, ru5p-D, nad, nadh
V	Außerhalb des Toleranzbereichs	dhap, nad, nadh, s7p

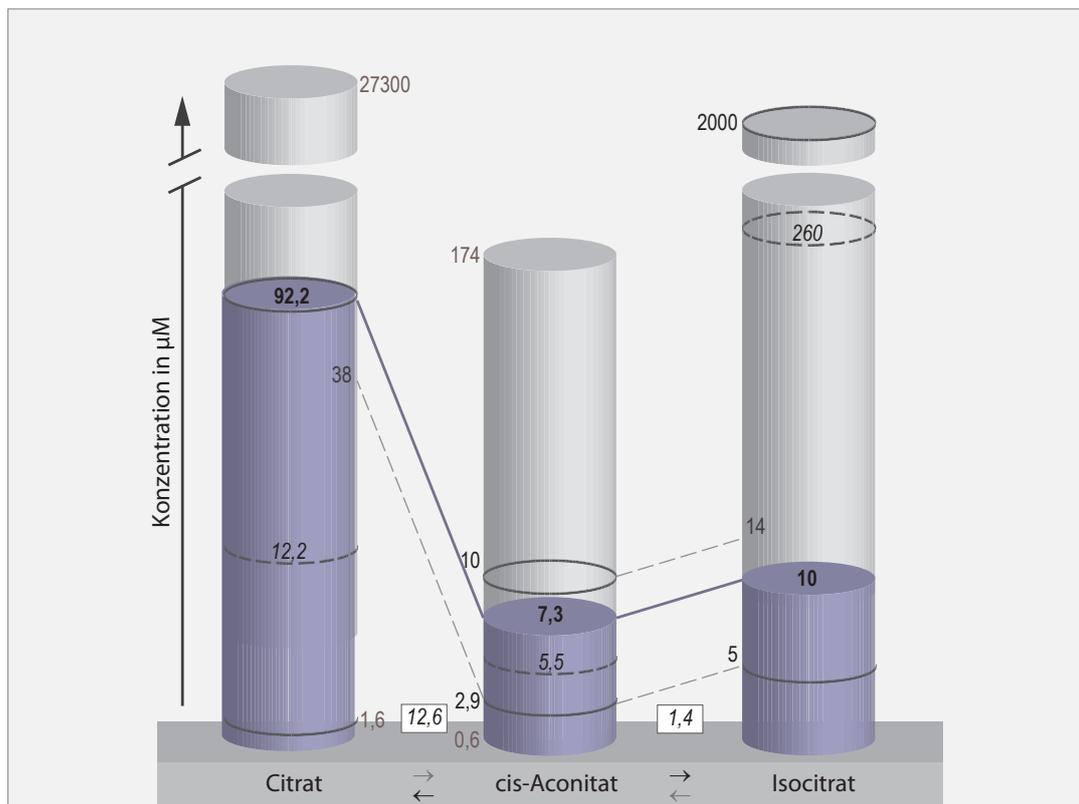
Tabelle 3.5: Übereinstimmung der angenommenen Metabolitkonzentrationen mit den jeweiligen Sollwerten.

Die Metabolite können nach der Übereinstimmung ihrer angenommenen Konzentration mit dem vorgegebenen Sollwert fünf Kategorien zugeordnet werden (siehe Tabelle 3.5). Dabei überrascht die Übereinstimmung mit Sollwerten stark eingebundener Energiemetabolite: Mit einem ungewöhnlich niedrigen atp/adp-Konzentrationsverhältnis von 0,8 (GR03) bzw. 0,86 (GR04) sind die atp-abhängigen Umsetzungen offensichtlich realisierbar. Das nadp/nadph-Verhältnis von 1,4 (GR03) und 0,7 (GR04) bedarf ebenfalls keiner weiteren Korrektur. Lediglich das nad/nadh-Verhältnis wird von 0,2 (GR03) bzw. 0,05 (GR04) auf jeweils rund 0,01 korrigiert.

Verhältnisse der Energiemetabolite

Kategorie II der Tabelle 3.5 gibt Grund zu der Frage, welche der gewählten Sollwerte von vornherein im Widerspruch zu notwendigen Flussrichtungen stehen. Bei Anwendung der Gleichung 3.1 auf die Sollwerte für GR03 und GR04 stellen wir fest, dass es Konflikte mit den in Tabelle 3.4/Spalte P vorhergesagten Reaktionsrichtungen gibt: Würden alle Metabolite in den vorgegebenen Sollwertkonzentrationen vorliegen, würden einige Reaktionen ausschließlich vorwärts (7:TPI, 36:ACONTa, in GR04 auch 69:ACALD) und andere ausschließlich rückwärts (8:GAPD, 37:ACONTb, 74:PTAr, in GR03 auch 10:PGM) ablaufen. Damit wäre der Zitratzyklus, die Glykolyse und die Ethanol-, sowie Acetatsynthese blockiert. Wird eine entsprechende Zielmetabolitsynthese gefordert, sind für dessen Erfüllung die Sollwerte zweitrangig. Im Fall von Ethanol und Acetat bedeutet es aber, dass - sofern nicht durch Vorgabe der Austauschraten gefordert - Ethanol kaum und Acetat nicht gebildet wird.

Sollwerte im Widerspruch



Erläuterung: Im thermodynamischen Gleichgewicht liegt Isocitrat in 1.4fach höherer Konzentration als cis-Aconitat vor; damit Isocitrat gebildet werden kann muss dessen Konzentration also weniger als das 1.4fache der cis-Aconitat-Konzentration betragen. Nun hat die schwache Varianz der beobachteten cis-Aconitat-Konzentrationen einen relativ eng gefassten Toleranzbereich zur Folge; um innerhalb dieser Grenzen zu bleiben darf die Isocitrat-Konzentration maximal $14\mu\text{M}$ betragen - der (geschätzte) Sollwert beträgt jedoch $260\mu\text{M}$.

Die Konzentration von cis-Aconitat selbst ist gekoppelt an die Citrat-Konzentration (cit): cis-Aconitat muss 12,6 mal geringer verfügbar sein, damit es nicht fortwährend zu Citrat umgesetzt wird. Selbst die kleinstmögliche cis-Aconitat-Konzentration von $2,9\mu\text{M}$ verlangt Citrat, mit mindestens $38\mu\text{M}$ den experimentell gemessenen Wert ($12\mu\text{M}$) zu übertreten. Die Lösung, die der Algorithmus findet, um eine möglichst hohe Isocitrat-Konzentration zu realisieren, ist: i) Citrat nimmt eine (innerhalb der Sollwertgrenzen) maximal mögliche Konzentration von $92\mu\text{M}$ an, ii) cis-Aconitat wird so gering als gerade notwendig konzentriert ($7,3\mu\text{M}$) und iii) die Isocitrat-Konzentration wird auf den höchst möglichen Wert von $10\mu\text{M}$ gesetzt.

Abbildung 3.9: Illustration des TR-Algorithmus am Beispiel der Umsetzung von Citrat zu Isocitrat (nicht maßstabgetreu). Die Säulen markieren die zulässigen Konzentrationsbereiche, mit Sollwerten (gestrichelte Markierung) und Toleranzbereichen (durchgezogene Markierung). Die angenommenen Konzentrationen sind violett dargestellt (siehe Text). Die Konzentrationsgefälle, die (abhängig von $\Delta_R G^\circ$ bzw. der Gleichgewichtskonstanten k) unter Berücksichtigung der Toleranzbereiche für eine Umsetzung von Citrat nach Isocitrat notwendig sind, verbinden die Säulen.

3.4 Diskussion

In diesem Kapitel werden Möglichkeiten der Berücksichtigung thermodynamischer Prinzipien in der Flussbilanzanalyse, bzw. der Berechnung minimaler Flussmoden untersucht. Insbesondere wird das Konzept der Thermodynamischen Realisierbarkeit (TR) als Alternative zur traditionellen statischen Festsetzung von Reaktionsrichtungen vorgestellt. Statt im Vorfeld anhand von gemessenen Metabolitkonzentrationsbereichen und Freien Standardreaktionsenthalpien, sprich $\Delta_{\text{R}}G^{\circ}$ -Werten, die Umkehrbarkeit jeder Reaktion individuell zu überprüfen[120], wird die thermodynamische Überprüfung als Nebenbedingung direkt in die Berechnung optimaler Flussverteilungen integriert. Dadurch ist es möglich, die Einschränkungen zu berücksichtigen, die sich durch das Zusammenspiel der Metabolitkonzentrationen im Netzwerk ergeben.

Es konnte gezeigt werden, dass gerade die zusätzlichen Einschränkungen, die durch das Zusammenspiel der einzelnen Reaktionen entstehen, den Lösungsraum ähnlich umfassend beschränken, wie die von vornherein festgelegten Flussrichtungen nach Feist *et al.*[52]. Lediglich bei 2 Enzymen gab es Diskrepanzen, die sich auf die Ergebnisse auswirkten: Malic Enzyme (ME, Reaktion 16) und die Ribulose 5-phosphate 3-Epimerase (RPE, Reaktion 27). Während es zur Reversibilität des Malic Enzymes unterschiedliche Meinungen gibt[19, 52], ist die Richtungseinschränkung der RPE, die eine Reaktion nahe dem chemischen Gleichgewicht katalysiert ($\Delta_{\text{R}}G^{\circ} = 0$), im Ishii-Modell vermutlich nicht thermodynamisch begründet: Die Rückreaktion der RPE (in Kombination mit der Rückreaktion der TKT2) erlaubt die Synthese von Ribose-5-Phosphat (r5p) aus Fructose-6-Phosphat und Glyceraldehyde-3-Phosphat; der Pentose-Phosphat-Weg kann somit umgangen werden (siehe Flussmode TRs+Xb). Insofern sind diese Diskrepanzen zwar für die Vorhersagequalität von Nachteil, physiologisch und thermodynamisch sind sie aber korrekt.

Das TR-Konzept sieht vor, für die Wahl der Metabolitkonzentrationen, die eine vorhergesagte Flusslösung ermöglichen, Sollwerte und Toleranzbereiche vorzugeben. Bei Existenz von zwei Stoffwechselfaden, die gleichermaßen zur Erfüllung eines Stoffwechselziel beitragen können, wird somit derjenige bevorzugt, dessen Konzentrationen möglichst wenig von den vorgegebenen Sollwerten und Toleranzbereichen abweichen. Die Parameter λ_1 und λ_2 wichten die Einhaltung dieser Vorgaben: Auf die Einhaltung der Toleranzbereiche wurde mit $\lambda_1 = 100$ (analog zu Hoppe *et al.*[87]) sehr viel Wert gelegt und lediglich 4 Metabolite wichen davon ab (dhap, nad, nadh und s7p). Die Einhaltung der Sollwerte wichteten wir jedoch höher: Während in der Arbeit von Hoppe *et al.*[87] die Sollwerte als Orientierung ohne konkreten experimentellen Bezug gedacht waren, repräsentieren sie in der vorliegenden Arbeit die gemessenen Metabolitprofile eines bestimmten Experiments (GR03 oder GR04). Damit wandelt sich der Sinn vom Anhaltspunkt zum zu realisierenden Ziel. Wir haben den Wert λ_2 dementsprechend hoch angesetzt (10 statt 0,1) mit dem Ergebnis, dass die Sollwerte der Substrate und Produkte die Flussrichtung der Reaktionen vorgeben und in allen Flusslösungen die Umsetzung in die gleiche Richtung stattfindet (siehe Abbildung 3.4).

Was einerseits der Diversität möglicher Flusslösungen abträglich erscheint, ist andererseits für die linear gewichtete Überlagerung von minimalen Flusslösungen von Vorteil: durch die starke Justierung der Sollwerte, stimmen die angenommenen Metabolitkonzentrationen in den einzelnen MinModen weitestgehend überein und rechtfertigen damit die Annahme der Überlagerung. Die verbleibenden, in einzelnen MinModen

noch abweichenden Konzentrationen, könnten in Anbetracht subzellulärer Kompartimentierung und dem Phänomen des *Metabolit-Kanalisation* durchaus informativ sein: So weist die Sekundärstruktur der Aconitase, die die Umsetzung von Citrat über cis-Aconitat zu Isocitrat katalysiert, an der aktiven Bindungsstelle auf eine Protein-Proteinbindung hin[217] - das Enzym könnte somit tatsächlich an einem Katalysatortunnel beteiligt sein und die lokale cis-Aconitat-Konzentration somit wesentlich von dem gemessenen Wert abweichen.

Ein so hohes Gewicht auf den Sollwerten sollte andererseits durch entsprechend gut belegte, verlässliche Konzentrationen begründet sein. Die Konsistenz von Metabolitkonzentrationen ist jedoch (aufgrund von Messungenauigkeiten) selbst innerhalb ein und derselben Studie nicht unbedingt gegeben[223]. Darüber hinaus werden in der Arbeit von Hoppe *et al.*[87], sowie in der Implementierung der TR-Methode in FASIMU[86], fehlende Sollwerte durch das geometrische Mittel des Toleranzbereichs ersetzt. Das Beispiel der Umsetzung von Citrat über cis-Aconitat zu Isocitrat zeigt, dass der auf diese Weise geschätzte Sollwert von Isocitrat, nicht gut gewählt ist und wirft die Frage auf, inwieweit die Verwendung des geometrischen Mittels (aus Mangel an experimentell gemessenen Werten) insbesondere bei Standardgrenzen sinnvoll ist. Gegebenenfalls sollte die Bestrafung der Abweichungen sich ausschließlich auf experimentell gemessene (verlässliche) Sollwerte (und Toleranzbereiche) beziehen.

Für den Vergleich der Flussvorhersagen zu den experimentell gemessenen Werten haben wir Flussverhältnisse definiert, die die Aufteilung des Stoffflusses an wichtigen Verzweigungspunkten im Netzwerk beschreiben. Es gibt mehrere Möglichkeiten solche Punkte zu definieren: z.B. durch die Wahl der fokussierten Flüsse oder die Art der Flussverhältnisse (divergierend[182] oder konvergierend[31]). Während für R_5 bis R_8 der direkte Vergleich von Austauschraten eine gleichwertige Aussage zulässt, geben die Verhältnisse R_1 bis R_4 wesentliche Aspekte des Flussgeschehens wieder und eignen sich daher gut zur Unterscheidung der Ishii-Flussverteilungen. So zeigte sich, dass die Vorhersage von R_2 , die Umsetzung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat (13) oder Oxalacetat (52), eine besondere Herausforderung darstellt. Besonders bei Zielwertmaximierung und globalen Lösungen ohne Berücksichtigung der Austauschraten ist die Aktivität der Pyruvatkinase (13) nicht notwendig und R_2 ist null, d.h. über das PTS-System wird beim Glucoseimport bereits ausreichend Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat verstoffwechselt. Sofern kein Pyruvat exportiert wird, liefert der verbleibende Pyruvatfluss $(1 - R_2)$ einen Hinweis auf die Nutzung des Zitratzyklus zur Energiegewinnung. Dabei zeigte sich, dass diese Funktion, die in den vorhergesagten Flussmoden nicht oder nur wenig abgerufen wird.

Besonders die Berücksichtigung der Thermodynamik in der Flussminimierung durch Wichtung der Rückrichtung mit der Gleichgewichtskonstanten[83] ist den Ergebnissen nach kritisch zu hinterfragen. Obwohl weder in den linear kombinierten, noch den global optimierten Lösungen thermodynamisch unzulässige Reaktionsrichtungen verwendet werden, beeinflusst die Wichtung doch die Wahl der aktiven Flüsse und die Vermischung von Beschränkung und Optimierungsziel erweist sich hier deutlich von Nachteil: Der Algorithmus versucht Pfade, in denen Reaktionen gegen das chemische Gleichgewicht laufen müssen, möglichst zu vermeiden. Dies geschieht ohne Berücksichtigung realer Konzentrationsverhältnisse. In den Keq-Simulationen wird beispielsweise die Fructose-1.6-Bisphosphatase (Reaktion 5, $k=1210$) und damit der obere Teil der Glykolyse systematisch umgangen.

Ausblick

Unter Verwendung der Austauschraten und der Wachstumsraten sind die Vorhersagen mit Abstand am zuverlässigsten. Die ist allerdings nur für globale Optimierungen möglich; in die Berechnung der MinModen fließt diese globale Informationen derzeit nicht ein, was ein großer Nachteil ist. Hier könnte die Berücksichtigung von Isotopomerfraktionen, die die Akkumulation einer radioaktiv markierten Spezies quantifizieren, evt. die Vorhersage verbessern.

Die Kontrolle des pep-pyr-oaa-Knotenpunktes hängt von vielen Faktoren ab, weshalb der zielgerichtet manipulierte Fluss beteiligter Reaktionen für Bioingenieure lange Zeit eine Herausforderung darstellte[171]. Im Hinblick auf verbesserte Flussvorhersagen ist zu überlegen, für solch kritische Punkte, die vom Optimierungskriterium nicht erfasst werden (können), empirisch gewonnene Varianzgrenzen als Nebenbedingung in die Flussvorhersage zu integrieren. Die Flussmessungen in Ishii *et al.* zeigen beispielsweise, dass trotz massiver Eingriffe in die Systemstruktur durch Blockierung wichtiger Enzyme des Zentralstoffwechsels, mindestens 47% des Stoffflusses in die Glykolyse fließt (außer bei der PGI-Mutante) und mindestens 50% des Phosphoenolpyruvates durch die Pyruvatkinase zu Pyruvat umgesetzt wird (siehe R_1/R_2 , Abbildung 3.5). Eine ähnliche Idee hatten Choi *et al.*[31]. Sie zeigen, dass das zusätzliche Festsetzen konvergierender Flussverhältnisse zu genaueren Flussvorhersagen führt.

Während die heuristisch gesetzten Richtungsverbote fundiertes biochemisches Wissen über die einzelnen Stoffwechselwege benötigen, basieren die Einschränkungen nach TR ausschließlich auf der zugrunde liegenden Netzwerkstöchiometrie, den verwendeten Umgebungsbedingungen, sorgfältig recherchierten Metabolitkonzentrationsbereichen und - in diesem Fall - geschätzten $\Delta_R G^\circ$ -Werten. Mit der Entwicklung von Messtechnik, die auch Metabolite unterhalb des derzeitigen Detektionsgrenze von $0.5 \mu\text{M}$ ¹ nachweisen kann, könnte das TR-Konzept auch auf weniger gut charakterisierte Stoffwechselwege angewendet werden und damit einen Beitrag zur Analyse genomweiter Stoffwechselnetzwerke leisten.

¹Geringster Messwert in der Studie von Ishii *et al.*

4 Funktionelle Netzwerkbeschreibung und Netzwerkkonsistenz

Hoffmann S, Hoppe A and Holzhütter HG. (2007) *Pruning genome-scale metabolic models to consistent ad functionem networks*. Genome Informatics, 18(1), 308-19.

4.1 Einleitung

Die Anzahl und Größe rekonstruierter Stoffwechselnetzwerke ist seit dem ersten veröffentlichten Modell für *Haemophilus influenzae*[178] im Jahr 2000 sehr gestiegen [163, 14, 77, 52, 47, 123, 67]. Mit bis zu 3311 Reaktionen sind diese Netzwerke sehr umfangreich und entsprechend unübersichtlich und die enthaltenen biochemischen Umsetzungen für den Anwender im Einzelnen kaum nachprüfbar. Im Gegensatz zu traditionellen (kinetischen) Modellen, die i.d.R. von Grund auf neu erstellt werden und meist nicht mehr als 50 Reaktionen enthalten, werden bereits rekonstruierte genomweite Modelle der Literatur entnommen und auf eigene Fragestellungen angewendet. Die Ergebnisse unterliegen maßgeblich der Rekonstruktion und damit auch der Qualität, die diese Rekonstruktionen haben.

Genomweite Modelle sind unübersichtlich

Mit der Erfahrung im Erstellen qualitativ hochwertiger Modelle und der Durchführung umfangreicher Konsistenzprüfungen, nimmt die Qualität nachfolgender Rekonstruktionen zu[140]. Dennoch sind Inkonsistenzen nicht ausgeschlossen. Im Stoffwechselmodell von *E.coli* iJR904 wurden beispielsweise 70 der 618 Metabolite als nicht-synthetisierbare oder nicht-abbaubare *Dead-End-Metabolite* identifiziert[163]. Die 89 Reaktionen, in denen diese 70 Metabolite als Reaktionsteilnehmer auftreten, können im Fließgleichgewicht weder in Vorwärts- noch in Rückwärtsrichtung einen Fluss tragen und gelten als blockiert. Blockierte Reaktionen treten auf, wenn mindestens eines der Substrate nicht verfügbar bzw. nicht synthetisierbar ist, oder mindestens eines der Produkte nicht abgebaut werden kann. Ursachen für blockierte Reaktionen sind demnach: i) unvollständige Stöchiometrien (d.h. es fehlen Reaktionen), ii) unzureichend definierte Ausgangsbedingungen (d.h. es fehlen Substrate bzw. Zuflüsse), oder iii) unzureichend erfasste Stoffwechselfunktionen (d.h. es fehlen Abflüsse aus dem System). Der Zusammenhang ist in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt.

Ursachen blockierter Reaktionen

Die Recherche fehlender Reaktionen und Transportprozesse ist trotz einer großen Anzahl hilfreicher Algorithmen (siehe Seite 15) ein zeitaufwendiger Prozess, insbesondere wenn diese Inkonsistenzen auf Lücken unseres derzeitigen Wissensstandes verweisen oder eine intensive Auseinandersetzung mit den Grenzen des Systems erfordern. Doch auch ohne diese Reaktionen und Austausch enthalten genomweite Stoffwechselmodelle die vollständige und richtige Beschreibung vieler Stoffwechselfade und erlauben die Synthese eines großen Spektrums unterschiedlicher Metabolite, welche potenziell zelluläre Funktionen erfüllen können. Wir bezeichnen diese Menge synthetisierbarer Stoffe

Synthesekapazität

eines Modells als *Synthesekapazität*. Umfasst die Synthesekapazität eines Netzwerks alle für eine spezifische Fragestellung geforderten Stoffwechselleistungen, ist die aufwändige Recherche fehlender Reaktionen und Austauschprozesse u.U. nicht notwendig und es gilt lediglich, den inaktiven Teil des Netzwerks zu entfernen. Sowohl der Rekonstrukteur eines Netzwerks wie auch der Anwender, der mit dem soeben aus dem Internet heruntergeladenen Model an der Beantwortung einer konkreten Fragestellung interessiert ist, sollten daher in der Lage sein, auf einfachem Wege blockierte Reaktionen ausfindig zu machen und zu überprüfen, ob das konsistente Teilnetzwerk in der Lage ist, eine befriedigende Synthesekapazität abzubilden.

Problem Hinweise auf Blockierte Reaktionen und Dead-End-Metabolite liefern Methoden der strukturellen Netzwerkanalyse: Durch Bestimmung gekoppelter Stoffwechselflüsse[26], gekoppelter Metabolitkonzentrationen[139], Stofferhaltungsbedingungen[139, 51], Extreme Pathways[147] oder Elementarmoden[184] werden Abhängigkeiten, die als Konsequenz blockierter Reaktionen im Netzwerk entstehen, aufgedeckt. Die Bestimmung auf diesem Wege ist jedoch numerisch aufwändig und für größere Netzwerke kaum zu bewältigen. Optimierungsbasierte Methoden, wie die Flux-Variability-Analysis (FVA) von Mahadevan und Schilling[124] oder die Flux-Coupling-Analysis von Burgard *et al.*[26] sind gute Alternativen, untersuchen jedoch nicht explizit die Syntheseleistung eines Netzwerks.

Idee Minimale Flussmoden (MinModen) sind stationäre Flussverteilungen, die bestimmt werden, indem für eine entsprechende Zielreaktion ein Fluss von eins verlangt wird. Wird dabei der Abfluss eines Metaboliten aus dem System verlangt, beschreiben die sogenannten MetabMinModen einen der jeweils möglichen Synthesewege eines Metaboliten. Es mag andere als den gefundenen, optimalen Weg geben; gibt es jedoch keinen optimalen Syntheseweg, d.h. es kann keine MinMode bestimmt werden, so gibt es auch keinen anderen Syntheseweg. Wird als Ziel die Umsetzung eines Metaboliten verlangt, werden minimale Flussmoden bestimmt, die eine Reaktion (in Vorwärts- oder Rückrichtung) realisieren. Da die Nichtexistenz einer solchen MinMode ebenfalls alternative Flusslösungen ausschließt, können die realisierbaren Reaktionsrichtungen eines Netzwerks bestimmt werden. Insofern kann die Methodik dazu verwendet werden, sowohl blockierte Reaktionen als auch nicht-synthetisierbare Metabolite im Netzwerk zu identifizieren. Um Verwechslungen zu vermeiden, wird hier zwischen Metabolit-MinModen (MetabMinModen) und Reaktions-MinModen (ReaMinModen) unterschieden.

Ansatz Zunächst bestimmen wir in einem genomweiten Netzwerk blockierte Reaktionen und nicht-synthetisierbare Metabolite. Diese sind wie folgt definiert:

1. **Blockierte Reaktionen:** Existiert für eine gegebene Reaktion weder eine ReaMinMode für die Vorwärts-, noch für die Rückwärtsrichtung, so wird diese Reaktion als blockiert betrachtet.
2. **Nicht-synthetisierbare Metabolite:** Existiert für einen gegebenen Metaboliten keine MetabMinMode, so wird dieser Metabolit als nicht-synthetisierbar betrachtet.

Anschließend extrahieren wir durch Entfernen der blockierten Reaktionen ein konsistentes Teilnetzwerk und bestimmen dessen Synthesekapazität, d.h. die Menge synthetisierbarer Metabolite.

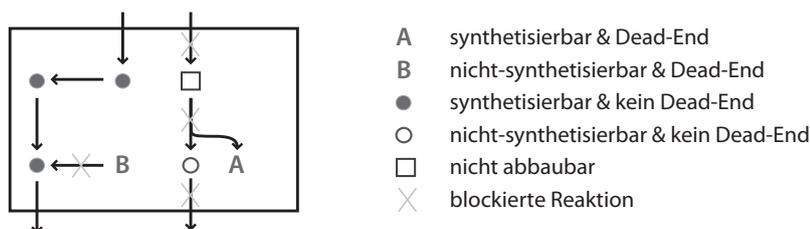


Abbildung 4.1: Blockierte Reaktionen und Eigenschaften der beteiligten Metabolite

4.2 Anwendung: Wachstum von *Escherichia coli* auf verschiedenen Medien

Die Konzepte werden auf das genomweite Stoffwechselnetzwerk von *Escherichia coli*, iJR904[163], angewendet. Die Konsistenz dieses Netzwerks wird in Abhängigkeit der Definition von drei Parametern untersucht: 1.) den erlaubten Metabolitabflüssen, 2.) den Umgebungsbedingungen und 3.) der Art der Berücksichtigung der Thermodynamik.

Das Netzwerk basiert auf genomischen, biochemischen und physiologischen Informationen aus wissenschaftlichen Veröffentlichungen und verschiedenen Datenbanken (LIGAND, EcoCyc, TC-DB)[163]. Das Modell enthält 931 Reaktionen (kodiert von 904 Genen) und 625 Metabolite, von denen 618 der Stationaritätsbedingung unterliegen (interne Metabolite). Für 70 Metabolite wurden keine biochemischen Hinweise auf weitere Transport- oder andere Verwertungsprozesse gefunden; sie verbleiben als Dead-End-Metabolite im Netzwerk. Soweit bekannt, sind Einschränkungen der Reaktionsrichtung gegeben. Das Netzwerk erlaubt Simulationen mit verschiedenen Substratquellen (siehe Anhang A, Seite 117). Das bakterielle Wachstum wird durch relative Beiträge von 49 Metaboliten in Form einer Biomassegleichung modelliert.

Stoffwechselmodell

Die Konzentration der 618 internen Metabolite im System bleibt konstant (siehe Gleichung 1.8). Ihre Verbindung über die Systemgrenze hinaus wird durch den Parameter b_i beschrieben: eine nicht näher spezifizierte Verwendung des Stoffes wird durch $b_i \geq 0$ (ein Abfluss aus dem System), die unspezifische Herkunft durch $b_i \leq 0$ (ein Zufluss), abgebildet. Sofern nicht anders angegeben gilt jedoch $b_i = 0$. In allen nachfolgend verwendeten Modellen dürfen extrazelluläre Stoffe frei aus dem System abfließen (d.h. $b_i \geq 0$). Zusätzlich werden folgende Situationen unterschieden:

Metabolitabflüsse

- X_{bio} Alle für die Biomassesynthese wichtigen Metabolite dürfen das System verlassen.
- X_{all} Alle Metabolite dürfen das System frei verlassen.

In dieser Studie werden drei unterschiedliche Medien simuliert, die unbegrenzt Sauerstoff, Phosphat, Schwefel, Stickstoff, Natrium, Kalium und Eisen enthalten, sich in den zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquellen aber unterscheiden (für die genauen Konzentrationen siehe Anhang Seite 117):

Umgebung

- E_{gluc} definiert ein Glucose-Minimalmedium;
- E_{rich} enthält zusätzlich zu E_{gluc} : ac, akg, lac-D, lac-L, glyc, mal-L, pyr und succ;
- E_{cplx} definiert ein komplexes Medium, das zusätzlich zu E_{rich} 123 Metabolite enthält, die nach Reed *et al.*[163] aufgenommen werden können.

Thermodynamik Über mögliche Reaktionsrichtungen entscheidet die Thermodynamik. Diese wird wie folgt berücksichtigt:

- R_{all} Alle Reaktionen werden als reversibel betrachtet, d.h. für keine Reaktion werden Flussrichtungen beschränkt.
- R_{irrev} Es werden die von Reed *et al.*[163] vorgeschlagenen Richtungseinschränkungen verwendet (686 von 931 Reaktionen sind irreversibel). Zusätzlich wird für 17 Reaktionen¹ die Richtung beschränkt, um thermodynamisch unzulässige Zyklen zu verbieten (Vorschlag einer Folgearbeit von Reed *et al.*[162]).
- R_{TR} MetabMinModen und ReaMinModen werden unter Berücksichtigung der *Thermodynamischen Realisierbarkeit (TR)*[87] berechnet (nur einschränkend durch Begrenzung zulässiger Konzentrationen, siehe Kapitel 3).

Die für R_{TR} notwendigen Konzentrationsbereiche entstammen für 22 interne Metabolite der Arbeit von Kümmel *et al.*[120], für 10 extrazelluläre Metabolite der Arbeit von Henry *et al.*[79, 78] (siehe Anhang Seite 121). Für alle weiteren Metabolite wird ein Konzentrationsbereich von 5 μM –2 mM angenommen, der laut Literaturrecherche typische Zellkonzentrationen umfasst[87]. Die Werte der Gibbs-Energien wurden den Abschätzungen von Henry *et al.*[78] entnommen.

Optimierungsproblem Das zu lösende Optimierungsproblem lässt sich wie folgt zusammenfassen:

$$\begin{array}{ll}
 \text{minimize} & \sum_{j=1}^N v_j \\
 \text{subject to} & v_j \geq 0 \quad \forall j \in \mathbb{N}_n, \quad \sum_{j=1}^N S_{ij}v_j - b_i = 0 \quad \forall i \in \mathbb{N}_m \\
 & \text{if the } k^{\text{th}} \text{ MetabMinMode:} \quad \left| \quad \text{if the } r^{\text{th}} \text{ ReaMinMode:} \right. \\
 & b_k = 1 \quad \left| \quad v_r = 1 \right. \\
 & \text{if } X_{bio}: \quad \left| \quad \text{if } X_{all}: \right. \\
 & b_i = 0 \quad \forall i \notin M_{biomass} \quad \left| \quad b_i \geq 0 \quad \forall i \in \mathbb{N}_m \right. \\
 & b_i \geq 0 \quad \forall i \in M_{biomass} \\
 & \text{if } R_{TR}: \quad \left| \quad \text{if } R_{irrev}: \right. \\
 & 0 \leq v_j + \alpha d_j \leq \alpha, \quad \forall j \in \mathbb{N}_n \quad \left| \quad v_j = 0 \quad \forall j \in R_{irrev} \right. \\
 & 0 \leq -(\Delta G_r)_j + \alpha d_j \leq \alpha, \quad \forall j \in \mathbb{N}_n \\
 & (\Delta G_r)_j = (\Delta G_r^\circ)_j + \sum_{i=1}^n c_i S_{ij} \\
 & c_i^{\max} \leq c_i \leq c_i^{\min}, \quad \forall i \in \mathbb{N}_m
 \end{array}$$

Dabei entspricht n der Anzahl der Reaktionen, m der Anzahl der Metabolite, d_j einer binären Variable, die über $1 \leq j \leq n$ läuft, und $c_i = RT \ln([M_i])$ einem Koeffizienten, der sich aus der aktiven Metabolitkonzentration M_i berechnet. c_i^{\max} und c_i^{\min} begrenzen den zulässigen Konzentrationsbereich eines Metaboliten M_i (hard bounds). α entspricht einer willkürlich festgelegten positiven Zahl, die im Wert größer als jeder mögliche Fluss- oder $\Delta_R G$ -wert ist, wodurch die Bedingungen $0 \leq v_j + \alpha d_j \leq \alpha$ und $0 \leq -(\Delta G_r)_j + \alpha d_j \leq \alpha$ folgende TR-Nebenbedingung gewährleisten:

$$\text{if } v_j \neq 0 \text{ then } \text{sgn}(v_j) = -\text{sgn}((\Delta G_r)_j)$$

	R_{all}		R_{irrev}		R_{TR}	
	X_{bio}	X_{all}	X_{bio}	X_{all}	X_{bio}	X_{all}
E_{cplx}	141	20	185	75	160	70
E_{rich}	155	49	365	251	324	221
E_{gluc}	159	52	377	265	326	224
E_{zero}	564	564	931	931	931	931

Tabelle 4.1: Anzahl blockierter Reaktionen in den 18 Flussmodellen

4.3 Ergebnisse

Das Konzept zur Prüfung der Konsistenz metabolischer Netzwerke wird auf das genomweite Stoffwechselwerk iJR904 von *E. coli*[163] angewendet, welches bereits in vielen unterschiedlichen Studien analysiert wurde[162, 97, 78, 5, 90]. Das Netzwerk umfasst 931 Reaktionen und 618 Metabolite und es ist bekannt, dass im Netzwerk eine große Anzahl von Reaktionen blockiert sind und einige Metabolite nicht-synthetisiert werden können. Durch Entfernen aller blockierten Reaktionen, d.h. derjenigen, für die weder in Hin- noch in Rückrichtung eine ReaMinMode bestimmt werden kann, reduzieren wir das Netzwerk auf seinen konsistenten Kern und bestimmen dessen Synthesekapazität. Diese Konsistenzanalyse ist abhängig von den gewählten Bedingungen. Wir haben daher insgesamt 18 Teil-Netzwerke des originalen iJR904 Netzwerks erstellt und die Konsistenz in Abhängigkeit der Definition der austauschbaren Metabolite (X_{bio} , X_{all}), der Medienzusammensetzung (E_{gluc} , E_{rich} , E_{cplx}) und der Art der Berücksichtigung der Thermodynamik (R_{all} , R_{irrev} , R_{TR}) untersucht.

*Durchgeführte
Rechnungen*

Die Anzahl der jeweils blockierten Reaktionen sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Dabei erweisen sich, selbst wenn alle Metabolite das System verlassen dürfen (X_{all}), alle Reaktionen ihre Richtung umkehren können (R_{all}) und ein komplexes Medium vielfältige Substrate anbietet, 20 Reaktionen sowohl in Hin- als auch in Rückrichtung als blockiert. Andere Bedingungen haben eine höhere Anzahl zur Folge. Unter relativ eingeschränkten, für FBA-Analysen jedoch sehr typischen Bedingungen (X_{bio} , R_{irrev} , E_{gluc}) erreicht die Anzahl mit 377 blockierten Reaktionen ihr Maximum.

*Anzahl
blockierter
Reaktionen*

Für die Berechnung der ReaMinModen ist lediglich die Realisierung des entsprechenden Flusses, nicht jedoch die Flussverteilung selbst von Interesse. Obwohl vom Netzwerk abgetrennt, können daher einige Reaktionen als Teil eines möglicherweise thermodynamisch unzulässigen internen Zyklus einen Fluss realisieren. Unzulässige Zyklen sollten jedoch unterbunden werden. Reaktionen, die Teil solch unzulässiger Zyklen sind, lassen sich dadurch identifizieren, dass eine entsprechende ReaMinMode selbst dann bestimmt werden kann, wenn keinerlei Substrate (E_{zero}) zur Verfügung stehen. Lässt man die Umkehrbarkeit für alle Reaktionen zu (R_{all}), gehören im gesamten *E. coli*-Netzwerk 367 Reaktionen solch internen Zyklen an (= 931 – 564). Bei Berücksichtigung des TR-Kriteriums (R_{TR})[87] und bei korrekter Einschränkung der Reaktionsrichtung (R_{irrev}) werden thermodynamisch unzulässige interne Zyklen bereits bei der Berechnung der ReaMinModen ausgeschlossen. Ohne Substratzufuhr sind daher alle 931 Reaktionen des Netzwerks blockiert.

*Reaktionen
unzulässiger
Zyklen*

Blockierte Reaktionen werden aus dem Originalnetzwerk entfernt, indem die entsprechende Spalte in der *Stöchiometrischen Matrix S* gestrichen wird. Die ‘‘Synthesekapazität‘‘ der auf diese Weise reduzierten Netzwerke entspricht der Anzahl ihrer synthetisierbaren Metabolite, d.h. der Anzahl an Metaboliten, für die jeweils eine MetabMinMode bestimmt werden kann. Abbildung 4.2 zeigt einen Vergleich der Synthesekapazität des

*Synthese-
kapazität
reduzierter
Modelle*

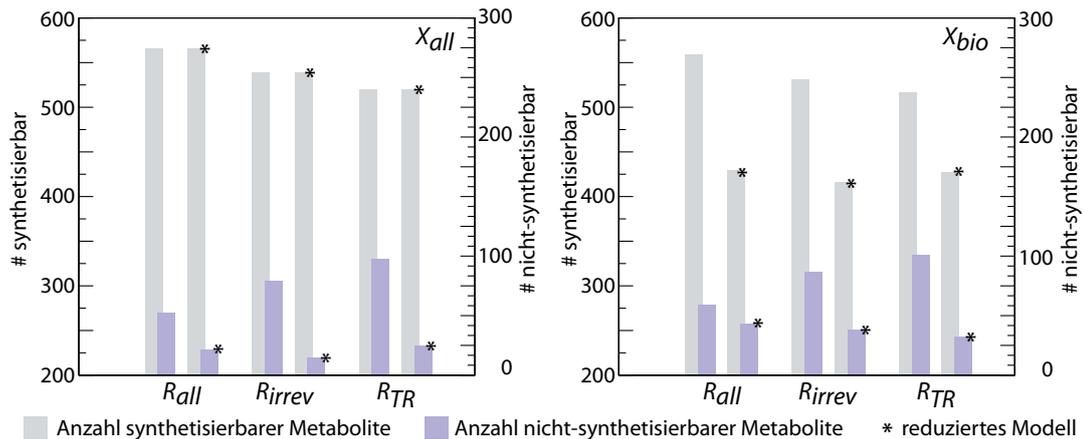


Abbildung 4.2: Synthetisierbare und nicht-synthetisierbare Metabolite unter Annahme eines Komplexmediums (E_{cplx})

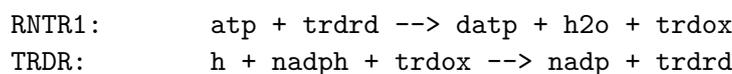
vollständigen Originalnetzwerkes (cpl) und der verschiedenen reduzierten Netzwerke (red) bei Verwendung eines komplexen Mediums (E_{cplx}). Dabei wird deutlich: umso schwächer die Einschränkung, umso höher die Anzahl synthetisierbarer Metabolite. In X_{all} unterscheidet sich die Anzahl synthetisierbarer Metabolite im vollständigen und reduzierten Netzwerk nicht. In X_{bio} ist die Anzahl im reduzierten Modell dagegen deutlich geringer, gewährleistet aber in jedem Fall die Synthese aller für die Biomasseproduktion wichtigen Metabolite.

Nicht-verwertbare Metabolite werden entfernt

Die geringere Synthesekapazität unter X_{bio} ist wie folgt zu erklären: Im Gegensatz zur Berechnung der ReaMinModen, die sich exakt an der Definition erlaubter Metabolitabflüsse hält (X_{bio} oder X_{all}), wird für die Berechnung der MetabMinModen ein zusätzlicher, virtueller Abfluss dem Netzwerk hinzugefügt, um zu prüfen, ob der entsprechende Zielmetabolit dem Netzwerk entzogen werden kann. Metabolite, die weder aus dem System abgeführt werden können, noch als Vorstufen wichtiger Zielmetabolite agieren, die also nicht-verwertbar sind, können somit dennoch synthetisierbar sein. Die Reaktionen, die einzig zu ihrer Synthese beitragen, gelten jedoch unter den betrachteten Bedingungen (X_{bio}) als blockiert und werden bei der Reduktion entfernt werden. Wird der Metabolit in keiner Reaktion mehr umgesetzt, wird er ebenfalls aus dem Modell entfernt und die Zahl synthetisierbarer Metabolite im Modell sinkt.

Regenerierte Metabolite werden nicht entfernt

Warum verbleiben dennoch nicht-synthetisierbare Metabolite im reduzierten Modell? Es gilt: Reaktionen, die nicht-synthetisierbare Metabolite als Reaktanten enthalten, müssen nicht notwendigerweise blockiert sein. Beispielsweise wird die Reduktion von ATP (atp) in die Desoxyform (datp) durch die Oxidation des Cofaktors Thioredoxin angetrieben (trdrd/trdox). Die oxidierte, wie auch die reduzierte Form des Thioredoxin sind im vollständigen Netzwerk nicht-synthetisierbar. Jedoch existiert eine NADPH-abhängige Thioredoxinreduktase, die die Regeneration des Thioredoxin katalysiert (TRDR) und daher die Reduktion des atp zu datp ermöglicht:



Ist die Synthese eines Metaboliten nicht möglich, können nachfolgende Reaktionen im Netzwerk nur dann Teil eines Fließgleichgewichts sein, wenn es eine Reaktion

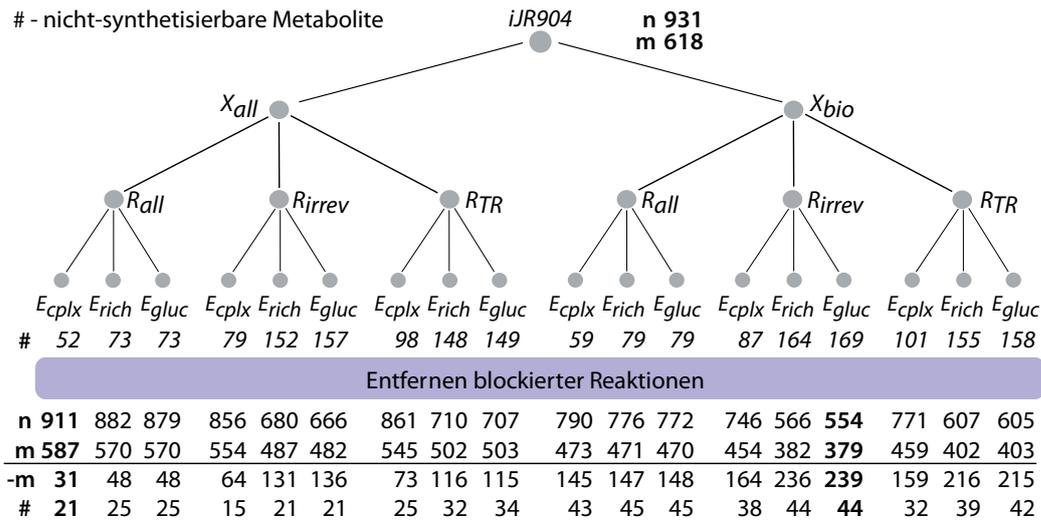


Abbildung 4.3: Charakteristika der 18 reduzierten Flussmodelle: n kennzeichnet die Anzahl der Reaktionen, m die Anzahl der Metabolite, $-m$ die Anzahl der entfernten Metabolite und $\#$ die Anzahl nicht-synthetisierbarer Metabolite vor und nach der Reduktion.

gibt, die den nicht-synthetisierbaren aber nun verbrauchten Metaboliten wieder regeneriert. Ist dies der Fall und es gibt einen sogenannten Regenerationszyklus, dann kann die Reaktion einen Fluss größer als Null tragen und ist nicht blockiert. Alle nicht-synthetisierbaren Metabolite, die nach dem Entfernen blockierter Reaktionen verbleiben, sind Teil solcher Regenerationszyklen.

Die Anzahl der Metabolite, um die das vollständige Modell jeweils reduziert wurde und die Anzahl nicht-synthetisierbarer Metabolite, die in jedem der 18 Flussmodelle verbleiben, sind in Abbildung 4.3 dargestellt. In allen Varianten verbleiben nicht-synthetisierbare Metabolite, die jedoch nicht zu den 49 für die Biomassessynthese wichtigen Metaboliten zählen. Beispielsweise werden unter der Annahme X_{all} , E_{cplx} und R_{irrev} insgesamt 64 nicht-synthetisierbare Metabolite entfernt und lediglich 15 der 554 Metabolite verbleiben nicht-synthetisierbar. Wie bereits dargestellt, sind diese 15 Metabolite Teil thermodynamisch zulässiger, regenerierender Zyklen. Die Erhaltungsbedingungen, die durch die reduzierte *Stöchiometrische Matrix* gegeben sind [172], erlauben eine Zuordnung dieser Metabolite in 3 Gruppen:

*Minimal
notwendige
Synthesen*

1. ACP-Gruppe: enthält das Acetylgruppen-übertragende-Protein (ACP) und die daran gebundenen Metabolite¹ (*insgesamt 11 Mitglieder*),
2. Thioredoxin-Gruppe: enthält die reduzierte und oxidierte Form des Thioredoxin (*trdrd und trdox*)
3. t-RNA-Gruppe: enthält die beladene und unbeladene Form der L-Glutamyl-tRNA (*trnaglu und glutrna*)

Das bedeutet die Synthese von nur drei Metaboliten reicht aus, um die Synthese der verbleibenden 12 Metabolite ebenfalls zu ermöglichen (z.B. ACP, trdrd und trnaglu).

¹acACP, actACP, palmACP, myrsACP, hdeACP, malACP, ddcaACP, tdeACP, octeACP und 3hrmsACP

Aufgrund von
Irreversibilität
unterbundene
Synthesen

Verzichtet man bei dem soeben erwähnten Modell auf die Einschränkung der Reaktionsrichtung (Modellvariante $(E_{cplx}, X_{all}, R_{all})$), so können 33 Metabolite zusätzlich produziert werden. Dies wirft die Frage auf, inwieweit thermodynamische Einschränkungen die Synthese von Metaboliten unterbinden. Um dieser Frage nachzugehen schränken wir in dem Modell ohne Richtungseinschränkungen die Richtung jeweils einer Reaktion r_i ein und vergleichen die Synthesekapazität dieses modifizierten ($(E_{cplx}, X_{all}, R_{all} \setminus \{i\})$) mit dem nicht-modifizierten Modell. Die Iteration über alle Richtungseinschränkungen in R_{irrev} , ergibt 23 Reaktionen, deren Irreversibilität die Synthese von Metaboliten blockiert. Wird die Umkehrbarkeit dieser 23 Reaktionen in dem vorher beschriebenen Modell ($(E_{cplx}, X_{all}, R_{irrev})$) erlaubt, dann können in diesem modifizierten Modell 9 Metabolite mehr synthetisiert werden (d.h. 563 statt 554).

4.4 Diskussion

In diesem Kapitel wird das Konzept minimaler Flussmoden zur Vorhersage von Netzwerkkonsistenzen verwendet und durch Entfernen dieser Inkonsistenzen aus dem Originalnetzwerk ein konsistentes Kernmodell "extrahiert". Unser Kriterium für Konsistenz, dem dieses Kernmodell genügen muss, ist die mögliche Realisierung eines Nichtnull-Flusses durch jede Reaktion des Modells ($v_i \neq 0$), d.h. das Modell darf keine blockierten Reaktionen enthalten. Diese Forderung ist moderat im Vergleich zu Kumar *et al.*[117], die die Synthetisierbarkeit aller zytosolischen Metabolite und die Synthetisierbarkeit und Abbaubarkeit aller in subzellulären Kompartimenten vorliegenden Metabolite verlangen. Hintergrund dieser Forderung ist die Notwendigkeit, dem kontinuierlichen Anstieg des Zellvolumens während des Zellwachstums mit der kontinuierlichen Synthese aller Metabolite zu begegnen, um einer Beeinträchtigung der Stoffwechselfunktion durch zu geringe Metabolitkonzentrationen (Verdünnungseffekt) entgegenzuwirken. Die Annahme, alle Stoffe müssen synthetisierbar sein, ist sicherlich sinnvoll, sofern das verwendete genomweite Stoffwechselnetzwerk als vollständig betrachtet werden kann. Im Zusammenhang mit einer spezifischen Fragestellung, wie die Fähigkeit Biomasse zu synthetisieren, ist die Synthetisierbarkeit einer Auswahl als essentiell betrachteter Metabolite jedoch ausreichend.

Da blockierte Reaktionen nicht-synthetisierbare Metabolite enthalten, verringert sich beim Entfernen dieser Reaktionen die Anzahl nicht-synthetisierbarer Metabolite. Dennoch, in allen, von uns bestimmten 18 Kernmodellen verbleiben nicht-synthetisierbare Metabolite - die Forderung von Kumar wird somit von keinem unserer Modelle erfüllt. Die genaue Anzahl blockierter Reaktionen, sowie nicht-synthetisierbarer Metabolite hängt sehr von den angewendeten Bedingungen ab: verwendetes Medium, erlaubte Metabolitabflüsse, Art der Berücksichtigung der Thermodynamik. Entsprechend unterschiedlich sind die 18 Modelle in ihrer Größe und ihrer Synthesekapazität. Unseren Berechnungen zufolge genügt es jedoch oftmals, wenn einige wenige der nicht-synthetisierbaren Metabolite zusätzlich synthetisiert werden können, um alle Metabolite eines Netzwerks zu produzieren. In einem Fall betrifft dies das acetyl carrier protein, thioredoxin (in reduzierter oder oxidiert Form) und L-Glutamyl tRNA (mit oder ohne Aminosäure beladen). Dieses Beispiel zeigt, dass diese "wenigen" Metabolite zumeist in den schlechter charakterisierten Randbereichen[117] oder an der schwer zu definierenden Systemgrenze des Netzwerks zu finden sind. Die 49, für die Biomassensynthese relevanten Metabolite können jedoch von allen Modellen synthetisiert werden, eine Tatsache, die auf den ursprünglichen Fokus der iJR904-Rekonstruktion rückschlie-

ßen lässt.

Das Auffinden blockierter Reaktionen und nicht-synthetisierbarer Metabolite im Netzwerk erlauben auch andere Methoden:

- *Flux variability analysis*, kurz FVA[124], untersucht z.B. den Spielraum, den einzelne Flüsse bei der Realisierung einer vorgegebenen, optimalen Syntheseleistung haben. Jeder Fluss eines Netzwerks wird minimiert und maximiert, wobei blockierte Reaktionen an einem Nullfluss in beiden Rechnungen zu erkennen sind.
- Burgard *et al.*[26] maximieren den Fluss durch jede einzelne Reaktion und begrenzen das Substratangebot. Sie unterscheiden zwischen konditionell blockierten Reaktionen, falls die Blockierung durch die Verfügbarkeit entsprechender Substrate aufgehoben werden kann, und unkonditionell blockierten.
- Statt einem zu realisierenden Metabolitabfluss aus dem System können nicht-synthetisierbare Metabolite auch wie bei Kumar *et al.*[117] und Imielinski *et al.*[90] durch punktuell Aufheben des Fließgleichgewichts, d.h. $S_{iv} > 0$, bestimmt werden.

Unabhängig davon, welche Methode verwendet wird, machen die Ergebnisse die Notwendigkeit einer Konsistenzprüfung bei Verwendung genomweiter Netzwerke deutlich und es ist erstaunlich, dass der Anteil aktiver Reaktionen bei veröffentlichten FBA-Analysen kaum Erwähnung findet. Die Netzwerke selbst repräsentieren eine Fülle an Wissen und Möglichkeiten; nicht alle wurden, wie die Biomasseproduktion, bei der Erstellung bewusst berücksichtigt und nicht alle Netzwerkteile sind daher für die betrachteten Bedingungen notwendig. Auch wenn die Erstellung genomweiter Netzwerke sich deutlich von traditionell erstellten Modellen unterscheidet, sollten daher die von solch einem umfassenden Netzwerk abgeleiteten Flussbilanzmodelle, die der Untersuchung einer spezifischen Fragestellung dienen, auf eben diese Frage zugeschnitten sein: 1. um die Ergebnisse statistischer Analysen nicht zu verzerren, 2. um die Unübersichtlichkeit als eine Hauptquelle für Modellfehler und Inkonsistenzen zu minimieren, und 3. um die tatsächliche Netzwerkgröße als Grundlage von Rechnungen transparenter zu machen.

Das hier verwendete Konzept minimaler Flussmoden erlaubt die Bestimmung sowohl blockierter Reaktionen, als auch nicht-synthetisierbarer Metabolite. Die Rechnung ist schnell, einfach zu implementieren und flexibel kombinierbar mit zusätzlichen Nebenbedingungen (siehe 3.Kapitel), und stellt daher eine gute Alternative zu existierenden Konzepten dar.

5 Vorhersage von Flussänderungen auf Basis geänderter Enzymkonzentrationen

Hoffmann S and Holzhütter HG. (2009) *Uncovering metabolic objectives pursued by changes of enzyme levels*. Ann N Y Acad Sci., 1158:57-70.

5.1 Einleitung

Abhängig von den momentanen inneren oder äußeren Bedingungen können sich Stoffwechselfunktionen ändern oder unterschiedlich wichtig sein. Erhöht sich beispielsweise die Wachstumsrate im Bioreaktor lebender Zellen aufgrund einer höheren Durchflussgeschwindigkeit und damit einer erhöhten Substratverfügbarkeit, dann ändert sich das Verhältnis von Protein-, mRNS- und DNS-Menge in der Zelle[155]. Die Proportionen, in denen einzelne Grundbausteine und Vorläufermetabolite benötigt werden, sind daher abhängig vom Systemzustand und ihre Änderung führt zu geänderten Stoffwechselflüssen.

Abhängigkeit des Stoffflusses vom Systemzustand

Geänderte Stoffwechselfunktionen zu erfassen ist i.d.R. auf gut messbare Größen, wie exportierte Stoffwechselprodukte beschränkt. Die Biomassezusammensetzung in Abhängigkeit äußerer und innerer Bedingungen experimentell zu bestimmen, ist sehr aufwändig; gleiches gilt für intrazelluläre Flüsse und Enzymaktivitäten. Metabolitkonzentrationen und Enzymkonzentrationen sind vergleichsweise leicht verfügbar. Dabei sind relative Daten, z.B. Änderungen der Enzymkonzentration, wesentlich zuverlässiger und einfacher zu bestimmen, als absolute Daten. Mathematische Methoden basieren jedoch zumeist auf der Verwendung absoluter Daten, da damit i.d.R. absolute Stoffflüsse vorhergesagt werden.

Relative Daten leichter verfügbar

Allerdings, nicht jede Flussänderung lässt sich durch Änderung der Enzymkonzentration begründen - diese Korrelation gilt nur für annähernd gesättigte Enzyme deren Aktivität nicht wesentlich durch Aktivatoren oder Inhibitoren reguliert wird. Im umgekehrten Fall führt die Änderung der Enzymkonzentration nicht notwendigerweise zu einer entsprechenden Erhöhung oder Verringerung des Flusses. Eine strikte Korrelation ist daher nicht möglich und die Herausforderung bei der Verwendung von Enzymkonzentrationsänderungen zur Flussvorhersage besteht darin, einen geeigneten Kompromiss zu finden.

Korrelation von Fluss und Enzymkonzentration

Unter der Annahme, dass einzelne Stoffwechselfunktionen unabhängig voneinander ausgeführt werden können (MinModen) und sich jede komplexe Flussverteilung als Überlagerung dieser Einzelstoffsynthesen darstellen lässt (MinModen-Kombination), lassen sich auch Flussänderungen als lineare MinModen-Überlagerung darstellen. Ausgehend von Enzymkonzentrationsmessungen zweier Zustände, suchen wir nun jene MinModen-Kombination, welche maximal mit den Änderungen der Enzymkonzentra-

Idee

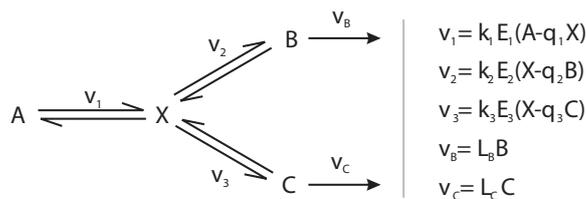


Abbildung 5.1: Minimalmodell zur Veranschaulichung optimaler Stoffwechselregulation bestehend aus einem Zufluss und 2 Abflüssen (v_B und v_C); daneben die Gleichungen, die die entsprechenden Umsatzraten beschreiben.

tion korreliert. D.h. wir begegnen der Unsicherheit in der Interpretation von Enzymkonzentrationen, indem wir durch Maximierung des Korrelationskoeffizienten unsere Flussvorhersagen auf einige (wenige), lineare Beziehungen zwischen gemessener Enzymkonzentrationsänderung und Flussdifferenz stützen und gleichzeitig nicht-lineare und nicht-proportionale Beziehungen zulassen. Idealerweise können die Gewichte, mit denen die einzelnen MinModen in diese Zerlegung eingehen, als geänderte Wichtung metabolischer Ziele verstanden werden und Hinweise auf geänderte Stoffwechselfunktionen geben.

5.1.1 Optimale Enzymkonzentrationsänderung im Netzwerk - ein Beispiel

Zur Einführung in die Problematik wird anhand eines Beispielmodelles, bestehend aus 4 Metaboliten (A, B, C, X) und 3 Enzymen (E_1, E_2, E_3), die Rolle des Netzwerks in dem Zusammenspiel von Enzymkonzentrationen und Stoffflüssen veranschaulicht.

Beispielmodell

Im Modell kann Metabolit A aufgenommen werden und B und C als potentielle Stoffwechselprodukte das System verlassen (siehe Abbildung 5.1). X ist ein Intermediat dieses Netzwerks. Es gibt 3 reversible Umwandlungen (v_1, v_2, v_3), deren Umsatzraten durch einfache chemische Kinetiken (ohne Sättigungsphänomen) beschrieben werden. Dabei entspricht k_i der (enzym)spezifischen Ratenkonstante, E_i der entsprechenden Enzymkonzentration und q_i dem Reziproken der Gleichgewichtskonstanten. Die irreversiblen Zielflüsse v_B und v_C werden durch einfache, irreversible Kinetiken erster Ordnung beschrieben. Der Bedarf an Metabolit B bzw. C (die "aktuelle" Stoffwechselfunktion) wird über die Parameter L_B bzw. L_C gesteuert, die die "metabolische Last" repräsentieren. Die zeitliche Änderung der Konzentration des Intermediats X ergibt sich als Summe der zu- und abfließenden Flüsse:

$$\frac{dX}{dt} = v_1 - v_2 - v_3 \quad (5.1)$$

Referenzzustand

Als Referenzzustand des Systems (*) betrachten wir einen gleichermaßen hohen Bedarf an B und C , d.h. $L_B^* = L_C^* = 1$. Wir nehmen zunächst konstante Enzymkonzentrationen an ($E_i^* = 1$) und setzen die Ratenkonstanten ebenfalls auf $k_i^* = 1$. Für reversible Reaktionen können wir eine Gleichgewichtskonstante von 1 annehmen, d.h. $q_i = 1$. Die Metabolitkonzentrationen werden zunächst auf $[A] = 10$, $[X] = 5$, und $[B] = [C] = 2.5$ gesetzt. Im stationären Zustand gilt: $v_1 = v_2 + v_3$, $v_B = v_2$ und $v_C = v_3$. Im Referenzzustand produziert das System somit pro Zeiteinheit jeweils 2,5 Moleküle B und C , d.h. $v_B^* = v_C^* = 2,5$.

Modellverhalten

Zur Illustration des Modellverhaltens sind in Abbildung 5.2 A die Änderungen der Flüsse in Abhängigkeit der metabolischen Last L_B dargestellt. Verlangen beispielsweise

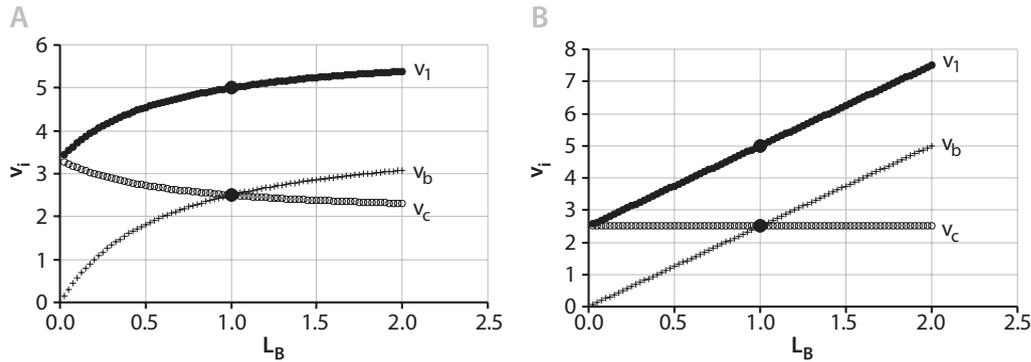


Abbildung 5.2: Flussänderungen in Abhängigkeit des Mehrbedarfs an Metabolit B. (A) bei konstanter Enzymkonzentration und (B) bei optimaler Anpassung der Enzymkonzentration. (Grafik: H.G. Holzhütter)

äußere oder innere Bedingungen nach der doppelten Menge an Metabolit B, d.h. $L_B = 2$, steigt v_B nicht-linear an. Durch die gemeinsame Verwendung des Substrates X sind die Synthesen von B und C gekoppelt und die erhöhte Syntheserate von B führt zu einer geringeren Synthese von C, d.h. v_C sinkt.

Wir bezeichnen eine Stoffwechselregulation optimal, wenn zum einen eine linear proportionale Anpassung an momentane Bedürfnisse gewährleistet ist und zum anderen andere Stoffwechselziele, wie in diesem Fall die Synthese von C, unbeeinträchtigt bleiben. Mathematisch lassen sich diese beiden Bedingungen wie folgt ausdrücken:

*Optimale
Regulation*

$$(i) \quad \frac{v_B}{v_B^*} = \frac{L_B}{L_B^*} \quad (5.2)$$

$$(ii) \quad v_C = v_C^* \quad (5.3)$$

Dabei bezieht sich der Index 0 auf den Referenzwert. Darüber hinaus soll der energetisch kostspielige Auf-, Um- und Abbau von Enzymen weitestgehend minimiert werden, d.h. die Enzymkonzentration soll möglichst wenig von der Menge im Referenzzustand abweichen:

$$(iii) \quad \sum_{i=1}^3 (E_i^* - E_i)^2 \rightarrow \text{minimum} \quad (5.4)$$

Die Anwendung dieses Optimierungsproblems (Gleichungen 5.1 bis 5.4) auf unser Beispielmodell liefert das gewünschte Ergebnis: v_B steigt linear mit dem Lastparameter L_B an, während v_C konstant bleibt (Abbildung 5.2 B).

Die minimalen Änderungen in der Enzymkonzentration, die diese optimale Regulation möglich machen, sind in Abbildung 5.3 A dargestellt. Wie erwartet steigt die Menge an E_1 und E_2 . Unerwartet ist eher die Änderung der Menge an E_3 : bei einer geringeren Last von $L_B < 0.5$ steigt die Enzymkonzentration ähnlich der Menge an E_2 , bei einer erhöhten Last $L_B > 1$ sinkt die Menge an E_3 , damit trotz eines höheren Zuflusses v_1 der Fluss v_C konstant gehalten werden kann. Dieses Beispiel zeigt bereits, dass das bloße Betrachten der Enzymkonzentrationsänderung in E_3 zu irrtümlichen Schlussfolgerungen hinsichtlich der Synthese von Metabolit C führen könnte.

*Änderungen
der Enzymkonzentration*

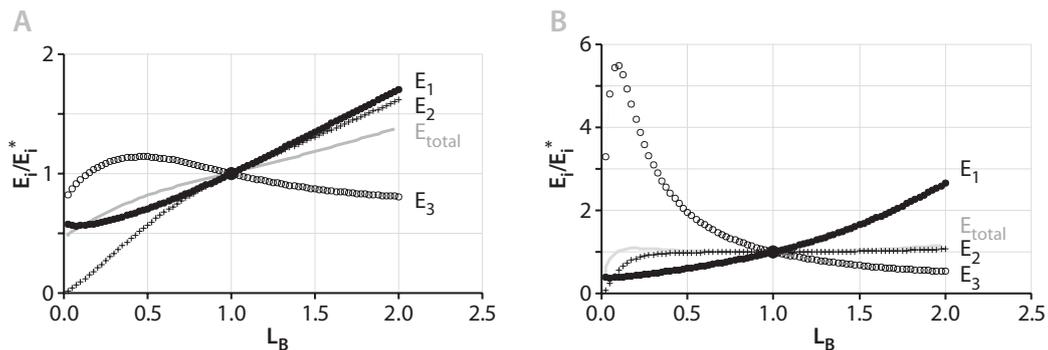


Abbildung 5.3: Anpassung der Enzymkonzentration in Abhängigkeit des Mehrbedarfs an Metabolit B. Dabei gilt $k_i = E_i^* = 1$ ($i = 1, 2, 3$) für (C) und $k_i = E_i^* = 1$ ($i = 1, 3$), $k_2 = 0, 1$, $E_2^* = 10$ für (D). (Grafik: H.G. Holzhütter)

*Irrtümliche
Schlüsse
naheliegend*

Noch offensichtlicher wird die Diskrepanz zwischen scheinbarer und tatsächlicher Ursache für Enzymkonzentrationsänderungen, wenn sich die katalysierenden Enzyme in spezifischer Rate und Enzymkonzentration voneinander unterscheiden. Angenommen, die spezifische Umsatzrate des Enzyms E_2 sei etwas geringer: $k_2 = 0.1$ und die Enzymkonzentration im Referenzzustand dafür etwas erhöht: $E_2^* = 10$. D.h. wir haben nun die 10fache Menge an Enzym, die allerdings nur ein Zehntel des Stoffumsatzes leisten kann. Der Umsatz im Referenzzustand bleibt also gleich, die minimal notwendigen Enzymkonzentrationsänderungen sind dagegen stark verändert (Abbildung 5.3 B): Die optimale Stoffwechselregulation passt v_B an die veränderte Last L_B nun hauptsächlich über Veränderung der Enzymkonzentration E_3 an. Da ein gleicher Effekt via E_2 den zehnfachen Aufwand an Enzymkonzentrationsänderung erfordert, bleibt E_2 dagegen konstant.

5.1.2 Lösungsansatz

Im Folgenden die Maximierung der Korrelation von Enzymänderungen mit Flussänderungen unter Verwendung linear kombinierter minimaler Flussmoden.

Bestimmung repräsentativer Minimalmoden

Innerhalb der verschiedenen MinModen-Sets können identische und sehr ähnliche MinModen vorkommen, die eine eindeutige Vorhersage nicht erlauben. Beispielsweise unterscheidet sich die MinMode für Glucose-6-Phosphat nur in einer Reaktion von der MinMode für Fructose-6-Phosphat. Aus diesem Grund werden zunächst MinModen, die sich ausreichend voneinander unterscheiden, bestimmt und jedes MinModen-Set auf diese *repräsentativen MinModen* reduziert. Die Ähnlichkeit wird mit einem vereinfachten Tanimoto-Koeffizienten bewertet. Es gilt:

- n_A : Anzahl der aktiven Flüsse ($v_i > 0$) in MinMode A
- n_B : Anzahl der aktiven Flüsse ($v_i > 0$) in MinMode B
- n_{AB} : Anzahl der sowohl in A, als auch in B aktiven Flüsse
- n_{AA} : Anzahl gleicher Flusswerte in MinMode A und B

Flusszunahme:		A	B	C	D
Referenz	$v_{\text{ref}} = 1$	$\bullet \xrightarrow{\quad} \bullet$ a b	$\bullet \xleftarrow{\quad} \bullet$ a b	$\bullet \xrightarrow{\quad} \bullet$ a b	$\bullet \xleftarrow{\quad} \bullet$ a b
Experiment	$v_{\text{exp}} = 2$	$\bullet \xrightarrow{\quad} \bullet$ a b	$\bullet \xleftarrow{\quad} \bullet$ a b	$\bullet \xleftarrow{\quad} \bullet$ a b	$\bullet \xrightarrow{\quad} \bullet$ a b
	$v_{\text{exp}} - v_{\text{ref}}$	+1	-1	+3	-3
Flussabnahme:		A	B	C	D
Referenz	$v_{\text{ref}} = 2$	$\bullet \xrightarrow{\quad} \bullet$ a b	$\bullet \xleftarrow{\quad} \bullet$ a b	$\bullet \xleftarrow{\quad} \bullet$ a b	$\bullet \xrightarrow{\quad} \bullet$ a b
Experiment	$v_{\text{exp}} = 1$	$\bullet \xrightarrow{\quad} \bullet$ a b	$\bullet \xleftarrow{\quad} \bullet$ a b	$\bullet \xrightarrow{\quad} \bullet$ a b	$\bullet \xleftarrow{\quad} \bullet$ a b
	$v_{\text{exp}} - v_{\text{ref}}$	-1	+1	-3	+3

Abbildung 5.4: Interpretation von Flussdifferenzen: Spalten A-D zeigen die Flussdifferenz in Abhängigkeit von der Fließrichtung der Umsetzung von Metabolit a zu b im Referenz- und Auslenkungsexperiment.

$$s = \frac{n_{AA}}{n_A + n_B - n_{AB}} \quad (5.5)$$

Maßgebend für die Ähnlichkeit sind dabei nur Reaktionen, für die Enzymkonzentrationsänderungen vorliegen, da nur die Flüsse dieser Reaktionen in die Berechnung des Korrelationskoeffizienten eingehen. Zwei MinModen, die sich ausschließlich in Reaktionen unterscheiden für die keine Messwerte vorliegen (z.B. Oxidative Phosphorylierung), werden als identisch betrachtet. Zwei MinModen sind ähnlich, wenn sie eine Ähnlichkeit von mindestens 0,95 besitzen ($s \geq 0,95$). Die repräsentative MinMode bestimmt sich aus dem Mittelwert aller ähnlichen und identischen MinModen-Vektoren und wird in diesem Kapitel durch die Bezeichnung rMFM abgekürzt (für “representative minimal flux mode”).

Besonderheiten im Umgang mit Flussänderungen

Im einfachsten Fall repräsentieren positive Flussänderungen eine Erhöhung des Flusses im Vergleich zum Referenzzustand, während negative Flussänderungen eine Flussverminderung deutlich machen. Aus Abbildung 5.4 geht hervor, dass bei Reaktionen, die ihre Richtung umkehren können, eine positive Flussänderung aber unterschiedliche Ursachen haben kann. Eine eindeutige Aussage lässt sich demnach nur für Flussänderungen treffen, deren Reaktionsrichtung sich zwischen den betrachteten Zuständen nicht ändert. Die Interpretation der Flussänderung wird zudem erleichtert, wenn diese Reaktion in Vorwärtsrichtung definiert ist (Spalte A). Für die Korrelation gelten deshalb folgende Bedingungen: 1. im MinModen-Set reversible Reaktionen werden von der Korrelation ausgeschlossen, 2. Reaktionen, die irreversibel in die Rückwärtsrichtung laufen, werden umgekehrt notiert¹.

Aufstellen des Optimierungsproblems

Wir gehen davon aus, dass sich die Flussverteilung unter gegebenen Bedingungen als Linearkombination der zuvor (unter gleichen Bedingungen) bestimmten repräsentati-

¹d.h. alle *Stöchiometrische Koeffizienten* werden mit -1 multipliziert)

ven MinModen (rMFM) darstellen lässt:

$$v = \sum_i^q \alpha_i r MFM_i, \quad (5.6)$$

wobei q der Anzahl rMFMs und α_i der Wichtung, mit der eine rMFM in die Gesamtflussverteilung eingeht, entspricht. Diesem Ansatz folgend, lässt sich auch jede Änderung einer Flussverteilung als Linearkombination repräsentativer MinModen darstellen:

$$\Delta v = \sum_i^q \Delta \alpha_i r MFM_i \quad (5.7)$$

Die α_i sollen dabei so gewählt werden, dass eine maximale Korrelation der Flussänderungen Δv mit beobachteten Änderungen der maximalen Enzymaktivität Δv^{max} erreicht wird. Der dafür verwendete Pearsonsche Korrelationskoeffizient r ist wie folgt definiert:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (\Delta v_i^{max} - \overline{\Delta v^{max}})(\Delta v_i - \overline{\Delta v})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (\Delta v_i^{max} - \overline{\Delta v^{max}})^2 \sum_{i=1}^n (\Delta v_i - \overline{\Delta v})^2}} \quad (5.8)$$

Damit Flussdifferenzen im Sinne der Differenz absoluter Flusswerte korreliert werden (Abbildung 5.4, Spalte A), müssen für die Wertepaare $(\Delta v_i, \Delta v_i^{max})$, die in den Koeffizienten eingehen und deren Anzahl durch n beschrieben wird, folgende Bedingungen gelten:

1. die Änderung maximaler Enzymaktivität Δv_i^{max} wurde gemessen
2. die Reaktion läuft jeweils in Vorwärtsrichtung ab, d.h. $v_1 \geq 0$ und $v_2 \geq 0$ ¹

Um realistische und eindeutige Gewichtungsfaktoren α_i zu finden, soll der Betrag dieser Faktoren möglichst gering gehalten, d.h. $\sum \Delta \alpha_i^2$ minimiert werden. Minimal wird diese Summe, wenn alle q rMFM-Moden zu gleichen Teilen beitragen. Da die Austauschraten als Nebenbedingung in das Optimierungsproblem eingehen, entspricht die Kohlenstoffaufnahme der Kombination aller Kohlenstoff-aufnehmenden rMFM-Moden der gemessenen Aufnahme (d.h. $\Delta \alpha_i^{min} = v_{up}/q$) und es gilt:

$$\sum_{i=1}^q (\Delta \alpha_i^{min})^2 = \frac{v_{up}^2}{q} \quad (5.9)$$

Um eine Vergleichbarkeit mit dem Korrelationskoeffizienten zu gewährleisten wird der Term der α -Minimierung mit diesem Minimalwert normalisiert. Die Bedeutung der zu minimierenden Gewichtungsfaktoren α_i gegenüber der Korrelationsmaximierung wird zusätzlich über den Faktor φ gesteuert. Die Optimierungsfunktion lautet somit:

$$\mathbf{maximize} \quad r - \varphi \frac{q}{v_{uptake}^2} \sum_{i=1}^q \Delta \alpha_i^2 \quad (5.10)$$

¹D.h. reversible Reaktionen werden ausgeschlossen, die Richtungen irreversibler Reaktionen ggf. umgekehrt.

Vereinfachende Annahme

Da die maximalen Enzymaktivitäten nur schwer zugänglich sind, ihre Änderung hingegen gut durch die Änderung der vielfach besser messbaren Enzymkonzentrationsänderungen abgebildet werden kann (siehe Shimizu[191], Seite 28), nähern wir die Änderung der maximalen Enzymaktivitäten durch die relative Änderung der Enzymkonzentrationen an. Bei konstanter Enzymkonzentration soll dabei auf den Ursprung verwiesen werden (daher minus eins):

$$\Delta v^{max} = \frac{E_2}{E_1} - 1 = E^* - 1 \quad (5.11)$$

Obwohl die Verwendung relativer Enzymkonzentrationsänderungen eine Korrelation mit relativen Flussänderungen nahelegen würde, notwendig Gleichung 5.7 die Verwendung von Flussdifferenzen.

Die Plausibilität des Konzepts wurde anhand simulierter Daten eines kinetischen Modells (des Erythrozytenstoffwechsels) überprüft[81]. Die Methodik sagte in dieser Vorarbeit zufriedenstellend sowohl das veränderte Flussgeschehen vorher, als auch die Reaktion der Zelle auf die veränderten Bedingungen durch veränderten Bedarf an Zielmetaboliten.

5.2 Anwendung: Wachstum von *E.coli* auf Glucose

Die Methodik wird auf das in Kapitel 3 verwendete, mittelgroße *E.coli*-Modell angewendet. Die Protein- und Flussdaten werden aus 5 Experimenten der Studie von Ishii *et al.*[93] entnommen. In diesen Experimenten variiert die Durchflussgeschwindigkeit D des Mediums von 0,1 bis $0,7\text{h}^{-1}$ (GR01-GR04), im Referenzexperiment (RF03) ist $D=0,2\text{h}^{-1}$. Dem entsprechend, wachsen die Bakterien unterschiedlich schnell.

Berücksichtigung der Thermodynamik

Wir bestimmen Minimalmoden, die dem Kriterium der Flussminimierung genügen und die die Thermodynamik auf unterschiedliche Weisen berücksichtigen: zum einen wird das Konzept der Thermodynamischen Realisierbarkeit (**TR**) verwendet (siehe Seite 46), zum anderen werden irreversible Reaktionen nach Feist *et al.*[52] (**Fst**) festgelegt. Die Details zur Berechnung der MinModen sind im Kapitel 3 beschrieben.

Verwendete MinModen-Sets

Ein kritischer Punkt des MinModen-Konzeptes ist der relativ enge Lösungsraum, der durch die MinModen aufgespannt wird (seine Dimension entspricht der Anzahl definierter Zielmetabolite). Beispielsweise wird in keiner der 13 MinModen, die die optimale Synthese der 13 Biomassevorläufer (inkl. nadph und atp) unter Verwendung der Feist-Irreversibilitäten beschreiben (siehe Tabellen 11-15), Ethanol als Nebenprodukt an das Medium abgegeben. In dem reduzierten Lösungsraum, den diese 13 MinModen aufspannen, ist die Ethanol synthese somit nicht enthalten. Da in GR02, GR03

*Lösungsraum
muss erweitert
werden*

und GR04 jeweils Ethanol ins Medium abgegeben wird, kann das Systemverhalten bei diesen Wachstumsraten durch die 13 MinModen nicht abgebildet werden.

Reaktions-MinModen Dieser Kritik begegnen wir durch Erweiterung des MinModen-Sets. Zum einen werden neben den Biomassevorläufermetaboliten, mögliche Nebenprodukte¹ als Zielmetabolite definiert, zum anderen wird das MinModen-Set um Reaktions-MinModen erweitert. Ziel der Reaktions-MinModen ist die Realisierung jeweils einer vorgegebenen Flussrichtung, wobei sowohl Biomassevorläufermetabolite als auch Nebenprodukte das System verlassen dürfen (siehe Kapitel 4).

Metab-MinModen Alternativ dazu soll die Vorhersagequalität bei Unkenntnis wichtiger Zielmetabolite untersucht werden. Dazu werden Metabolit-MinModen für alle Nebenprodukte und Metabolite, die dem Fließgleichgewicht unterliegen (interne Metabolite), bestimmt. Die Reaktions-MinModen dürfen in diesem Fall nur Nebenprodukte synthetisieren. Folgende MinModen-Sets stehen somit für die Linearkombination zur Verfügung:

- M:** MetabMinModen (Biomassevorläufer + Nebenprodukte)
- RM:** MetabMinModen (nur Biomassevorläufer) + ReaMinModen (Abfluss für Biomassevorläufer + Nebenprodukte)
- MM:** MetabMinModen (alle internen Metabolite + Nebenprodukte)
- RMM:** MetabMinModen (alle internen Metabolite + Nebenprodukte) + ReaMinModen (Abfluss für Nebenprodukte)

MinModen mit und ohne Glyoxalatshunt Die Modellannahmen, die den Flussbestimmungen der 4 Wachstumsratenexperimente (GR01,GR02,GR03,GR04) zugrunde liegen, weichen hinsichtlich der Aktivität des Glyoxalatshunts voneinander ab. Für die Berechnung der Minimalmoden wird deshalb jeweils eine MinMode mit und eine ohne Vernachlässigung des Glyoxalatshunts (Reaktionen 50 und 51) bestimmt.

Wahl der zu korrelierenden Enzymkonzentrationsänderungen

Da ein linearer Zusammenhang zwischen Flussänderung und Enzymkonzentrationsänderung nur für einen Teil der Enzyme gegeben ist, kann es sinnvoll sein, nicht alle gemessenen Enzymkonzentrationsänderungen in die Korrelation einzubeziehen. Es wird daher untersucht, inwieweit die Vorhersage durch eine Vorauswahl verwendeter Enzymkonzentrationsänderungen verbessert werden kann. Als Idealfall testen wir daher eine Auswahl von Enzymen, von denen wir wissen, dass die Änderung ihrer Umsatzrate linear mit der Enzymkonzentrationsänderung korreliert. Angestrebt ist jedoch, dass möglichst wenig enzymkinetisches Vorwissen in die Auswahl fließt. Da Reaktionen, die entfernt vom thermodynamischen Gleichgewicht (stark exergon) ablaufen, häufig von streng regulierten Schlüsselenzymen katalysiert werden, treffen wir weiterhin eine Vorauswahl basierend auf der Gleichgewichtskonstanten. Folgende Enzymkonzentrationsänderungen werden definiert:

- **Set0:** berücksichtigt alle Enzymkonzentrationsänderungen (insgesamt 42 Werte)
- **Set1:** berücksichtigt ausschließlich Enzyme, deren Konzentrationsänderungen¹ sehr gut mit den beobachteten Flussdifferenzen (bezogen auf die Wachstumsra-

¹Nebenprodukte: pyr, ac, for, succ, etoh, lac-D

¹ $E_i^{GR01}/E_i^{RF03_4}, \dots, E_i^{GR04}/E_i^{RF03_4}$

tenexperimente²) korrelieren, d.h. für die das Bestimmtheitsmaß R^2 größer 0.7 ist (insgesamt 14 Werte).

- **Set2:** berücksichtigt ausschließlich Enzyme, die eine stark exergone Reaktion katalysieren, d.h. $k > 500$ (insgesamt 17 Werte)

Tabelle 21 im Anhang gibt die verwendeten Enzymkonzentrationsquotienten E^* und die Set1 und Set2 zugeordneten Enzyme wieder.

Da reversible Reaktionen von der Korrelation ausgeschlossen werden (siehe Seite 85), variieren die Werte der für die Korrelation tatsächlich verwendeten Enzymkonzentrationsänderungen zwischen TR- und Fst-Rechnungen und zwischen den einzelnen MinModen-Sets: im Set0 von 26 bis 31, im Set1 von 10 bis 14 und im Set2 von 15 bis 17.

Testrechnungen

Um die erhaltenen Vorhersagen besser einschätzen zu können, werden parallel verschiedene **Testrechnungen** durchgeführt:

- α_{ideal} - **Ideale Gewichte:** Als Referenzpunkt wird analog zum Kapitel 3 die Linearkombination aus Minimalmoden mit den Differenzen der jeweiligen experimentellen Zielflüsse bestimmt (siehe Seite 56), d.h. für die g6p-MinMode wird für GR03 ein Gewicht von $0.219(0,5 - 0,2) = 0,065$ verwendet.
- $min : \alpha_i$ - **Verzicht auf Korrelation:** Um den Mehrwert der Vorhersage durch die Korrelationsmaximierung zu bestimmen, wird in diesem Test ausschließlich die Summe der α_i minimiert, d.h. Gleichung 5.8 ist nicht mehr Teil des Problems und die Optimierungsfunktion vereinfacht sich zu:

$$\text{minimize } \sum \Delta\alpha_i^2 \quad (5.12)$$

- E_{ideal}^* - **Ideale Datengrundlage:** Um die Methode unabhängig von der Unsicherheit bei Verwendung von Enzymkonzentrationen (Annahme Gleichung 5.11) zu untersuchen, wird für Δv_i^{max} die Differenz der experimentell-bestimmten, absoluten Flusswerte verwendet.

Zur Lösung der (quadratischen) Optimierungsprobleme verwenden wir den kommerziellen Solver Lindo (siehe Seite 23), dem wir das Problem als mpi-Datei übergeben. Die Details der Implementierung sind im Anhang Seite 118 enthalten.

5.2.1 Annahmen zur Einbindung der experimentellen Daten

Zuordnung experimentell bestimmter Enzymkonzentrationen

In der Studie von Ishii *et al.*[93] wurde für 57 Proteinketten des Zentralstoffwechsels via LC-MS/MS jeweils die Menge bestimmt (in mg-protein/g-Trockenmasse). Die Mes-

² $v_i^{GR01} - v_i^{RF03}, \dots, v_i^{GR04} - v_i^{RF03}$

sungen wurden den entsprechenden Genbezeichnungen zugeordnet. Um diese Daten den Reaktionen im Modell zuzuordnen, sind zwei Aspekte der Gen-Protein-Beziehung zu berücksichtigen: 1. Isozyme (mehrere Enzyme katalysieren dieselbe Reaktion) und 2. Oligomere (zwei o. mehrere Proteinketten katalysieren gemeinsam eine Reaktion). Diese beiden Fälle werden in der Gen-Zuordnung des *E.coli*-Modells (siehe Tabelle 8) entsprechend durch eine *ODER*- und *UND*-Verknüpfung dargestellt. Da die einzelnen Isozyme und Proteinketten unterschiedlich variieren können, stellt sich die Frage nach dem Bezugspunkt, d.h. nach dem "informativen Isoenzym" bzw. der "informativen Untereinheit".

Das Mitteln über die beteiligten Isozyme oder Proteinketten ist nicht sinnvoll, da anzunehmen ist, dass die Variation der Komponenten in beiden Fällen i.d.R. nicht gleichmäßig erfolgt. Im Fall von Isozymen verwenden wir stattdessen den Messwert des Isozyms mit der höchsten Varianz (innerhalb der von Ishii *et al.* gemessenen Proteinlevel). Ist die Katalyse von mehreren Proteinuntereinheiten abhängig, wird der Wert für die am geringsten verfügbare Untereinheit verwendet. Diese Festlegung folgt der Annahme, dass die geringverfügbaren Untereinheiten limitierend für die Aktivität des Enzyms sind und die Kontrolle enzymatischer Aktivität, sollte sie über die Proteinkettensynthese verlaufen, sich an diesen Untereinheiten orientiert. Die Aktivität der mengenmäßig überwiegenden Untereinheiten ist hingegen effizienter über die weniger energieaufwändige Phosphorylierung zu kontrollieren. Reaktionen, die nur von einem Enzym katalysiert werden, dass nicht aus verschiedenen Proteinketten besteht, wird die gemessene Enzymkonzentration direkt zugeordnet.

Eine Übersicht über die verwendeten Enzymkonzentrationen liefert Tabelle 20. Da die Proteinmengen der Wachstumsratenexperimente (GR01-GR04) alle am gleichen Tag, zusammen mit der Referenz RF03_4 gemessen wurden (siehe Tabelle S2), werden als Referenzwerte ausschließlich Proteinmengen für RF03_4 verwendet.

Validierung mit experimentellen Flusswerten

Die Vorhersagen werden mit den experimentell bestimmten Flüsse verglichen. Da die Proteinmengen der einzelnen Wachstumsratenexperimente zeitgleich mit denen des Referenzexperiments RF03 gemessen wurden, werden ausschließlich die RF03-Flusswerte verwendet. Die Flussverteilungen werden auf den gemessenen Glucoseeintrag normallisiert und die Differenzen ($v_{GR0x} - v_{RF03}$) gebildet.

Für zusammengefasste Reaktionen (siehe Seite 52) sind die Vorhersagen detaillierter als die experimentell bestimmten Flüsse. Die Flüsse der Reaktionen 48/49, 16/17 und 15/64 werden daher nicht verglichen. Da für den Stofffluss von *pep* → *oaa* (Reaktionen 18/52) sowohl ein Netto-, als auch ein *Exchange Flux* angegeben wird und beide Reaktionen sowohl in den Fst- als auch den TR-Rechnungen als irreversibel gelten (siehe Tabelle 3.4), kann diesen Flüssen ein experimenteller Wert zugeordnet werden:

$$v_{52} = v_{netto} + v_{exchange} \quad \text{bzw.} \quad v_{18} = v_{exchange} \quad (5.13)$$

Als Bewertungsmaß verwenden wir den Korrelationskoeffizienten R^2 einer linearen Regression der Flussvorhersagen mit den absoluten Differenzen der experimentell bestimmten Flüsse. Dabei werden Reaktionen ignoriert, deren Flusswerte durch vorgege-

Untersuchte Einflüsse

M/MM	MinModen für alle Metabolite (MM) oder nur für Biomassevorläufer (M)
-/RM	Erweiterung des MinModen-Sets durch Reaktions-MinModen (RM)
φ	Gewicht von $\sum \alpha_i$ in der Bewertungsfunktion: 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1
TR/Fst	Berücksichtigung der Thermodynamik (TR oder Fst-MinModen)
Set0,1,2	korrelierte Enzymkonzentrationsänderungen: entweder alle verfügbaren (Set0) oder eine Auswahl davon (Set1 und Set2)

Testrechnungen

α_{ideal}	Ideale Gewichte durch Verwendung vorgegebener α_i -Werte in Gleichung 5.7 (siehe Kapitel 3, Seite 56)
$min : \alpha_i$	Verzicht auf die Korrelation mit Enzymkonzentrationsänderungen
E_{ideal}^*	Ideale Datengrundlage, E_{ideal}^* : durch Verwendung experimenteller Flussänderungen anstelle der Änderung gemessener Enzymkonzentrationsänderungen

Tabelle 5.1: Übersicht über durchgeführte Testrechnungen und untersuchte Einflussfaktoren

	M				RM				MM				RMM			
	<i>TR</i> (38)		<i>Fst</i> (38)		<i>TR</i> (106)		<i>Fst</i> (96)		<i>TR</i> (79)		<i>Fst</i> (79)		<i>TR</i> (150)		<i>Fst</i> (142)	
E_{ideal}^*	28	22	30	24	25	57	28	48	25	41	26	43	25	60	25	62
<i>Set0</i>	29	22	31	24	26	57	29	48	26	41	27	43	26	67	26	62
<i>Set1</i>	13	22	14	24	10	47	12	45	11	34	11	36	11	56	10	52
<i>Set2</i>	17	21	17	23	15	53	15	47	17	37	16	38	17	63	15	57

Tabelle 5.2: Anzahl repräsentativer TR- und Fst-MinModen (2.Spalte) im Vergleich zur ursprünglichen MinModen-Anzahl (jeweils in Klammern); Spalte 1 gibt die Anzahl für die Korrelation relevanter Reaktionen wieder, die dieser Ähnlichkeitsbewertung zugrunde liegen (irreversible Reaktionen für die Enzymkonzentrationsänderungen vorliegen).

bene Austauschraten, vernachlässigte Flüsse oder Kopplung innerhalb linearer Reaktionsketten nicht unabhängig voneinander sind. Die Bewertung basiert daher auf den Flusswerten der Reaktionen: 2,3,8,12,13,18,22,25,27,28,30,34,40,42,51,52,62.

5.3 Ergebnisse

Im Folgenden wird der Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die Vorhersage geänderter Stoffwechselflüsse auf Basis gemessener Enzymkonzentrationsänderungen untersucht (für durchgeführte Rechnungen siehe Tabelle 5.1).

Die unterschiedlich definierten MinModen-Sets (M, RM, MM, RMM) erlauben die Synthese von Nebenprodukten (etoh,ac,for,pyr,succ,lac-D), Zielmetaboliten oder die Synthese jeden Metabolits im Netzwerk (MM und RMM). Die Anzahl der jeweils

*Repräsentative
MinModen*

enthaltenen MinModen reicht dabei von 38 (M) bis 150 (RMM). Die Ähnlichkeit dieser MinModen wird bestimmt und identische oder sehr ähnliche MinModen durch sogenannte *repräsentative MinModen*, kurz *rMFM* ersetzt. Zusammengefasst wurden dabei u.a. identische MinModen unterschiedlicher Modellannahmen (mit und ohne Glyoxalatshunt) und die Synthese von g6p und f6p (im Fst-Set). In den Vorhersagen des Fst-Sets werden g6p und f6p somit nun immer gemeinsam synthetisiert. Da sich die Ähnlichkeit nur auf die für die Korrelation relevanten Reaktionen bezieht, variiert die Anzahl repräsentativer MinModen in jeder Rechnung, und reicht je nach Set von 21 bis zu 67 rMFMs (siehe Tabelle 5.2).

Testrechnungen

Die Ähnlichkeit der vorhergesagten Flussdifferenzen mit den experimentell bestimmten Werten wird anhand des Korrelationskoeffizienten einer einfachen Regression ermittelt. Das Maß kann Werte zwischen 0 (schlechte Übereinstimmung) bis 1 (sehr gute Übereinstimmung) annehmen. Die Testrechnungen behandeln 2 Extremfälle: die experimentellen Beobachtungen fließen entweder nicht in die Rechnung ein (*min* : α_i) oder aber sie entsprechen durch direkte Verwendung der experimentell bestimmten Flussänderungen (statt Enzymkonzentrationsänderungen) einer idealen Korrelation (E_{ideal}^*).

Wahl von φ

Im ersten Test wird die Summe der quadrierten α_i minimiert und damit eine Lösung bevorzugt, in der möglichst viele rMFMs mit kleinem Gewicht (α_i) kombiniert werden. Das Gewicht, mit dem die Minimierung der α_i und die Maximierung des Korrelationskoeffizienten in die Optimierungsrechnung jeweils eingehen, wird über den Parameter φ gesteuert: mit zunehmendem φ steigt die Bedeutung, die der Minimierung der Summe der α_i zukommt. Der Parameter wurde von 0.0001 bis 1 variiert und die Vorhersagen unter idealen und realistischen Bedingungen anhand von R^2 verglichen (siehe Abbildung 5.5). Dabei zeigte sich, dass unter idealen Bedingungen die Maximierung des Korrelationskoeffizienten mindestens 100fach höher gewichtet sein muss ($\varphi \leq 0.01$), um eine entsprechend ideale Vorhersage zu erzielen. Dem entgegen verbessern sich unter realen Bedingungen die Vorhersagen, je mehr Bedeutung der Minimierung der α_i zukommt. Bei $\varphi = 1$ ist die Vorhersagequalität i.d.R. gleich der Qualität, die bei Verzicht auf Korrelationsmaximierung (*min* : α_i) erzielt wird. Bei maximaler Vorhersagequalität ist daher der Wert der Korrelation u.U. unbedeutend. Um den Schwerpunkt deutlich auf die Maximierung der Korrelation zu legen wurde für die folgenden Rechnungen $\varphi = 0,01$ gewählt.

ReaMinModen machen den Raum vielseitiger aber unspezifischer

Die Bewertung der Vorhersagen unter $\varphi = 0,01$ sind in Tabelle 5.3 abgedruckt. Die Ergebnisse variieren stark, aber es bleibt zu erkennen, dass die MinModen-Sets mit zusätzlichen Reaktions-MinModen (RM, RMM) einen "vielseitigeren" Lösungsraum eröffnen: eine unwillkürliche, gleichmäßige Kombination der Moden führt zu sehr schlechten Vorhersagen, die Verwendung idealer Werte aber zu nahezu perfekten Vorhersagen. Die MinModen-Sets, die ausschließlich optimale Metabolitsynthesen enthalten (M, MM), erlauben dagegen bereits ohne Berücksichtigung der Änderung von Enzymkonzentrationen gute bis sehr gute (allerdings unspezifische) Vorhersagen. Die zusätzliche Berücksichtigung experimenteller Daten (S0,S1 oder S2) führt dabei selten zu einer Verbesserung der Vorhersagequalität.

Enzymauswahl vorteilhaft

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass es durchaus vorteilhaft ist, nur bestimmte Enzymkonzentrationsänderungen in die Korrelation einzubeziehen: in 69% der Rechnungen sind die Vorhersagen der Auswahlsets S1 oder S2 besser als die Vorhersage basierend auf dem vollständigen Satz verfügbarer Enzymkonzentrationsänderungen. Dabei ist Set 1 in 47%, Set 2 in 41% der Rechnungen die bessere Wahl, oder anders gesagt:

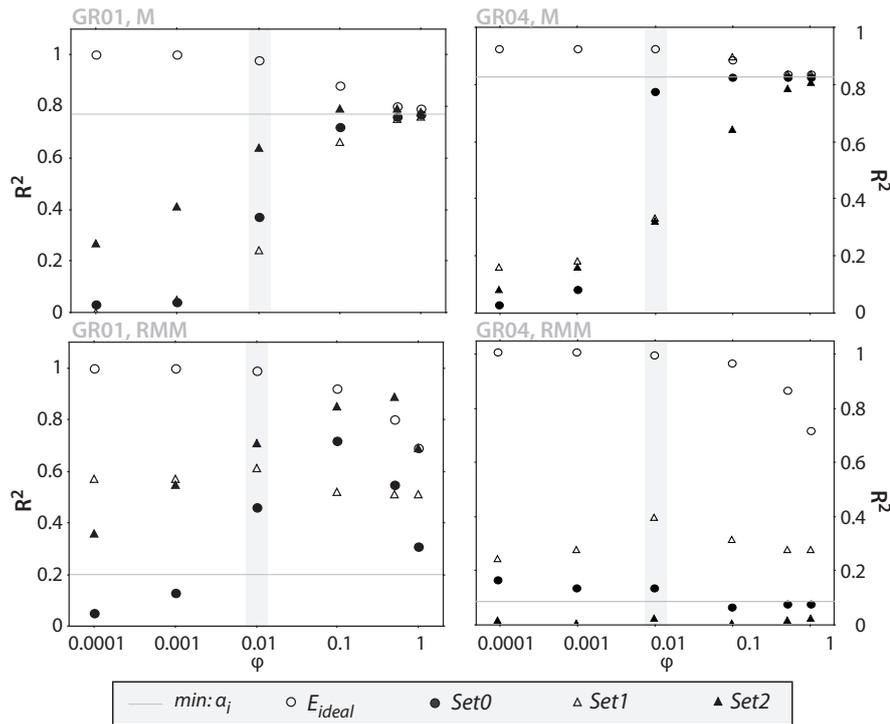


Abbildung 5.5: R^2 in Abhängigkeit der Wahl des Parameters φ (hier gezeigt für die Fst-MinModen-Sets M und RMM der Experimente GR01 und GR04)

beide Sets sind gleichermaßen suboptimal für die Anwendung in allen Rechnungen.

Die Details der Vorhersage werden am Beispiel der Fst-MinModen des M-Sets im Experiment GR03 erörtert. In Abbildung 5.6 sind die vorhergesagten Flussänderungen gegen die experimentell bestimmten Flussdifferenzen aufgetragen. Für die Testrechnung E_{ideal} ist die Übereinstimmung sehr gut, was zeigt: unter idealen Bedingungen kann im Lösungsraum des M-Sets eine sehr gute Lösung gefunden werden. In Abbildung 5.6 B sind ausschließlich die Flüsse der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Weges dargestellt. Die ebenfalls auf rechter Skala aufgetragenen Enzymkonzentrationsänderungen lassen erkennen, dass die Abweichungen zwischen $(E^* - 1)$ und Δv_{exp} umso größer werden, je größer der Betrag der Flussdifferenz ist; bei kleinen Flussdifferenzen stimmen die Werte annähernd überein.

Weiterhin wird gerade bei großen Flussänderungen sehr deutlich, dass bei Verwendung gemessener Enzymkonzentrationsänderungen (Set 0) tendenziell zu geringe Flussdifferenzen vorhergesagt werden. Diese Tendenz nimmt ab, wenn weniger Enzymkonzentrationen in die Korrelation eingehen (z.B. in Set 2). Als Folge der zu gering vorhergesagten Flussdifferenzen in Set 0 (z.B. für die Glykolyse), wird der überwiegende Teil der durch die Austauschflüsse vorgegebenen Erhöhung der Glucoseaufnahme, dem Pentose-Phosphat-Weg zugeschrieben. Die experimentellen Flussdifferenzen im Pentose-Phosphat-Weg sind relativ gering und stimmen annähernd mit den Änderungen der gemessenen Enzymkonzentrationen überein, d.h. für diesen Stoffwechselweg ist die Korrelationsannahme gerechtfertigt. Da in der Korrelation jedoch nur irreversible Reaktionen berücksichtigt werden und viele der Reaktionen im Pentose-Phosphat-Weg reversibel sind, werden die entsprechenden Enzymkonzentrationsänderungen nicht mit einbezogen. Maßgeblich sind daher die Konzentrationsänderungen der glykolytischen

Beobachtungen für Rechnung Fst-M-GR03

Korrelation für geringe Flussänderungen gerechtfertigt

GR01						
	$\min : \alpha_i$	E_{ideal}^*	Set0	Set1	Set2	
	M					
TR	0.46	0.96	0.28	0.26	0.57	
Fst	0.77	0.98	0.37	0.24	0.64	
	RM					
TR	0.00	0.99	0.37	0.03	0.67	
Fst	0.06	1.00	0.36	0.43	0.77	
	MM					
TR	0.50	0.95	0.32	0.40	0.48	
Fst	0.84	0.97	0.77	0.52	0.71	
	RMM					
TR	0.08	0.99	0.41	0.00	0.71	
Fst	0.20	0.99	0.46	0.61	0.71	

GR02						
	$\min : \alpha_i$	E_{ideal}^*	Set0	Set1	Set2	
	M					
TR	0.61	0.95	0.13	0.20	0.00	
Fst	0.55	0.76	0.11	0.00	0.25	
	RM					
TR	0.05	0.97	0.06	0.24	0.03	
Fst	0.04	0.99	0.04	0.01	0.09	
	MM					
TR	0.70	0.95	0.18	0.35	0.01	
Fst	0.46	0.92	0.39	0.66	0.56	
	RMM					
TR	0.14	0.99	0.16	0.51	0.00	
Fst	0.16	0.99	0.23	0.63	0.29	

GR03						
	$\min : \alpha_i$	E_{ideal}^*	Set0	Set1	Set2	
	M					
TR	0.83	0.98	0.63	0.31	0.46	
Fst	0.99	0.99	0.75	0.54	0.87	
	RM					
TR	0.04	0.99	0.73	0.03	0.37	
Fst	0.05	0.99	0.55	0.41	0.28	
	MM					
TR	0.85	0.97	0.69	0.54	0.42	
Fst	0.91	0.98	0.78	0.81	0.83	
	RMM					
TR	0.18	0.99	0.67	0.05	0.05	
Fst	0.21	0.99	0.63	0.69	0.35	

GR04						
	$\min : \alpha_i$	E_{ideal}^*	Set0	Set1	Set2	
	M					
TR	0.56	0.98	0.29	0.60	0.15	
Fst	0.82	0.92	0.77	0.33	0.32	
	RM					
TR	0.02	0.99	0.10	0.04	0.01	
Fst	0.02	1.00	0.29	0.15	0.00	
	MM					
TR	0.68	0.97	0.10	0.35	0.08	
Fst	0.89	0.97	0.44	0.77	0.32	
	RMM					
TR	0.08	0.12	0.09	0.02	0.00	
Fst	0.08	0.99	0.13	0.39	0.02	

Tabelle 5.3: Korrelationskoeffizient R^2 der Korrelation vorhergesagter Flussänderungen (unter $\varphi = 0.01$) mit absoluten Differenzen der experimentell bestimmten Flüsse (17 Werte, siehe Seite 90).

Enzyme, bei denen die Korrelationsannahme aufgrund der hohen Flüsse nicht gerechtfertigt ist.

Beschränken wir uns bei der Korrelation ausschließlich auf stark exergone Reaktionen (Set 2), werden in der Korrelation nur 2 Enzyme der Glykolyse (PFK:3 und FBA:5) und ein Enzym des Pentose-Phosphat-Wegs (PGL:23) berücksichtigt. Die zusätzliche Substrataufnahme bei erhöhter Wachstumsrate wird nun größtenteils dem erhöhten Fluss der Glykolyse statt dem Pentose-Phosphat-Weg zugeschrieben.

*Enzymauswahl,
Set2*

Die soeben beschriebenen Vorhersagen für das Experiment GR03 sind trotz der Abweichungen relativ gut - Voraussetzung für die sich anschließende Frage: Welche Änderung im Bedarf an Zielmetaboliten wird in den einzelnen Rechnungen vorhergesagt? Abbildung 5.7 A zeigt die vorhergesagten Änderungen der Zielflüsse Δv_z , die den entsprechenden Metaboliten aus dem System abführen, im Vergleich zu den experimentellen Flussdifferenzen. Die Erhöhung der Wachstumsrate geht im Experiment mit einem steigendem Bedarf aller Zielmetaboliten einher: die experimentellen Flussdifferenzen bewegen sich daher ausschließlich im positiven Bereich. Bei Vorhersage unter "idealen" Bedingungen (E_{ideal}^*) ähneln sich die Aussagen. Lediglich für den Abfluss von Acetyl-CoA weicht die Vorhersage stärker vom experimentellen Wert ab. Bei Korrelation mit gemessenen Enzymkonzentrationsänderungen wird jedoch sowohl steigender, als auch sinkender Bedarf einzelner Zielmetabolite vorhergesagt. Besonders Pyruvat und Acetyl-CoA werden demnach zum Wachstum benötigt, während die Synthese von Glucose-3-Phosphat und 2-Oxoglutarat zurückgefahren werden kann. Offensichtlich spiegelt sich die Bewertung der Vorhersage durch R^2 (siehe Tabelle 5.3) nicht in der Ähnlichkeit des Zielmetabolitbedarfs wieder: Obwohl die Vorhersage für Set 2 relativ gut ist, ist die Aussage eine deutlich andere, als die Aussage basierend auf den experimentellen Messungen.

*Vorhergesagte
Änderung der
Zielflüsse*

Die Menge der synthetisierten Zielmetabolite ergibt sich aus den Werten, mit denen die einzelnen MinModen in die Linearkombination eingehen, den α_i . Auftragung der α_i gegen die experimentell bestimmten Flussdifferenzen ergibt ein leicht verändertes Bild (Abbildung 5.7 B). Die MinModen im M-Set, die jeweils einen Zielmetaboliten synthetisieren, dürfen auch Nebenprodukte abgeben (z.B. Ethanol oder Acetat). Zusätzlich gibt es MinModen, die jeweils mindestens ein Nebenprodukt abgeben. Diese MinModen fließen auch in die Linearkombination ein, mit vorwiegend negativen Gewichten, wie in der Abbildung zu sehen ist. Die Flussdifferenz der Nebenproduktabflüsse ist vorgegeben (gleiche Δv_i in allen Rechnungen eines Experiments, siehe Abbildung 5.7 A). Die negativen α_i der Nebenprodukte stehen daher nicht für deren verminderten Export, vielmehr kompensieren sie die in den anderen MinModen überschüssig synthetisierten Nebenprodukte, um die vorgegebene Differenz der Austauschraten zu erfüllen. Weder Δv_z , noch die α_i lassen somit einen verlässlichen Rückschluss auf geänderte Ziele des Stoffwechsels zu.

*Vorhergesagte
Änderung des
Zielmetabolit-
bedarfs*

5.4 Diskussion

Obwohl die Expression eines Gens bekanntlich eine entsprechende Enzymaktivität nicht gewährleistet[171], spiegelt sie doch zu großen Teilen die Enzymaktivität wieder[154, 191] und Expressionsdaten werden zur Vorhersage von Flussverteilungen verwendet[193]. Die Verwendung von Enzymkonzentrationen, die deutlich aufwändiger

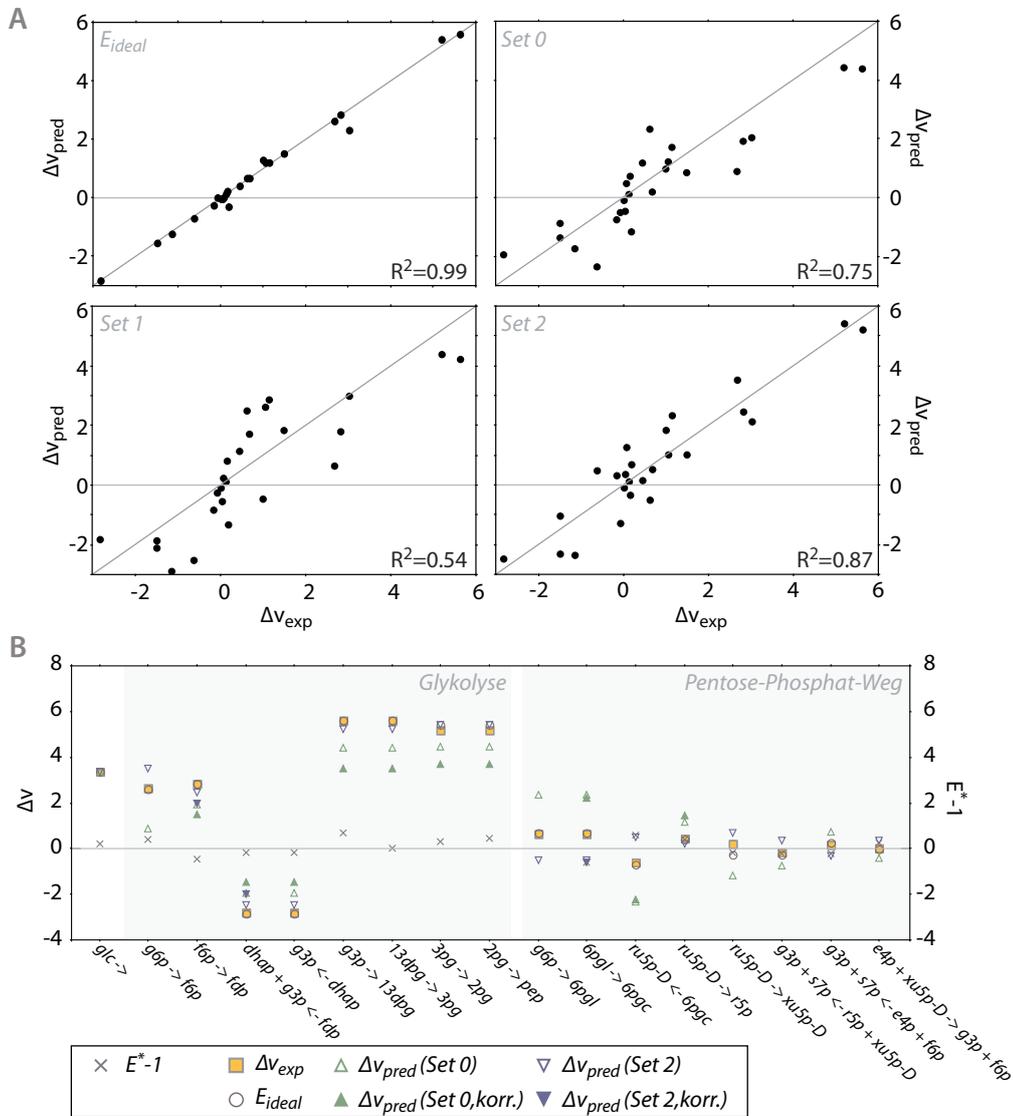


Abbildung 5.6: Gegenüberstellung der experimentellen und vorhergesagten Flussdifferenzen für die Fst-MinModen des M-Sets im Experiment GR03. A) Vorhersagen aller drei Varianten; B) Auszug der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Weges für Set0, Set2 und die Testrechnung E_{ideal} . Die gefüllten Dreiecke weisen die in der Korrelation verwendeten Enzymkonzentrationsänderungen aus.

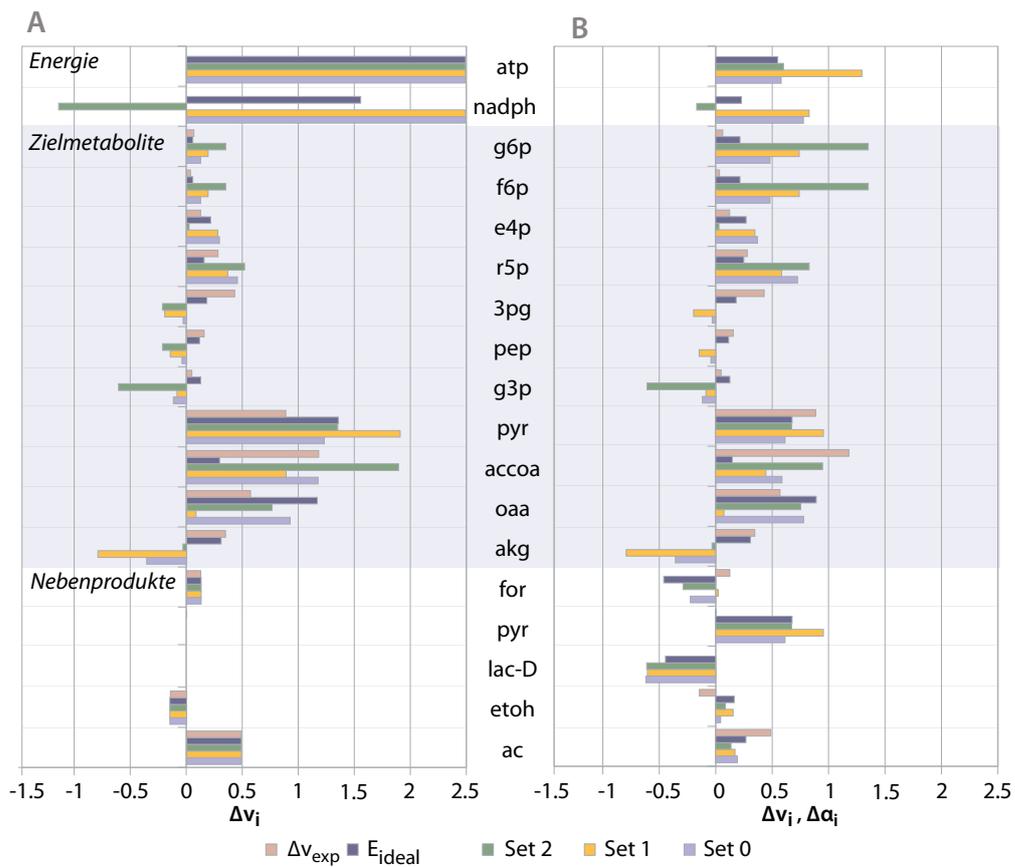


Abbildung 5.7: A) Syntheseraten der Zielmetabolite und Nebenprodukte (siehe Tab. 22), sowie B) in der Linearkombination verwendete α_i für Fst-MinModen des M-Sets im Experiment GR03

zu messen sind, sollte zu genaueren Vorhersagen führen. Die in diesem Kapitel vorgestellte Methode versucht aufgrund der Änderung von Enzymkonzentrationen (und Austauschraten), aber ohne detaillierte, kinetische Charakterisierung der beteiligten Enzyme, Flussänderungen vorherzusagen. Die Flussänderungen werden dabei als Ergebnis geänderter Stoffwechselziele verstanden, die mit einem veränderten Bedarf einzelner Metabolite einhergehen. Der Lösungsraum wird durch Flussverteilungen aufgespannt, die jeweils die optimale Synthese eines Stoffes beschreiben (bei repräsentativen MinModen evt. mehrerer ähnlicher Stoffe). Durch Kombination lassen sich komplexe Stoffwechselziele bzw. deren Änderungen darstellen. Gesucht wird nach einer Kombination, in der die resultierenden Flussänderungen möglichst gut mit den beobachteten Enzymkonzentrationsänderungen korrelieren.

Der Anstieg (oder Abfall) der Enzymkonzentration kann unterschiedlich motiviert sein: Eine gesteigerte Umsatzrate zur Befriedigung eines erhöhten Bedarfs eines Zielmetaboliten kann durch eine größere Menge an entsprechendem Enzym bewirkt werden. Dabei kann es jedoch sein, dass die Menge anderer, um das gleiche Substrat konkurrierender Enzyme, ebenfalls angehoben werden muss, nicht um deren Umsatzrate zu erhöhen, sondern um diese konstant zu lassen und damit andere Zielmetabolitsynthesen nicht zu beeinträchtigen (siehe Einleitung). Dementsprechend schwierig ist es, von Enzymkonzentrationsänderungen auf Flussänderungen zu schließen und erfolgreiche Ansätze zur Vorhersage von Flüssen oder Flussänderungen aufgrund von Enzymkonzentrationen oder deren Änderungen (ohne weitere kinetische Details) wurden meines Wissens nach bisher nicht veröffentlicht.

Die Annahme einer linearen Korrelation von Enzymkonzentrationsänderungen und Flussänderungen ist recht gewagt und nur im Kontext der Methodik zu rechtfertigen: Neben den Enzymkonzentrationen fließen gemessene Austauschraten in die Berechnung ein. Diese Substratzu- und Nebenproduktabflüsse geben einen starren, äußeren Rahmen vor, innerhalb dessen das den MinModen zugrunde liegende Optimierungskriterium und andere Nebenbedingungen (Fließgleichgewicht, Thermodynamik) die weiteren Fließmöglichkeiten bestimmen. Die möglichen Flusslösungen werden anhand des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten bewertet. Im Gegensatz zum (häufig verwendeten) quadratischen Abstand (RMSD), stützt sich der Pearsonsche Korrelationskoeffizient auf den Zusammenhang, der durch einzelne gut korrelierende Komponenten vermittelt wird. Um den Koeffizienten zu maximieren reicht es aus, wenn einige wenige Flussänderungen mit den gemessenen relativen Enzymkonzentrationsänderungen in Übereinstimmung gebracht werden können. Idealerweise betrifft diese Übereinstimmung genau die Enzyme, deren Aktivität tatsächlich über die Enzymkonzentration reguliert wird.

Unsere Ergebnisse geben dies leider nicht so wieder; die Annahme ist tatsächlich ein kritischer Punkt. Während die Testrechnung E_{ideal}^* gute Vorhersagen lieferte, eine gute Lösung im MinModen-Raum demzufolge enthalten ist, sinkt die Übereinstimmung sobald gemessene Enzymkonzentrationsänderungen verwendet werden. Von Nachteil ist dabei sicherlich auch, dass für die g6p-Deyhydrogenase (Reaktion 22), die den Fluss in den Pentose-Phosphat-Weg lenkt, keine Enzymkonzentrationsänderungen verfügbar waren.

Ein überraschendes Ergebnis ist die gute Vorhersage ohne jede Berücksichtigung von experimentellen Daten, d.h. ohne Korrelationsmaximierung ($min : \alpha_i$). Bei dieser Testrechnung werden möglichst viele MinModen mit möglichst kleinem Gewicht li-

near kombiniert. Die Zusammensetzung des MinModen-Sets und das den MinModen zugrunde liegende Optimierungskriterium einschließlich verwendeter Nebenbedingungen (Fließgleichgewicht, Thermodynamik) spielen bei der Vorhersage daher eine große Rolle. Dabei hat die Berücksichtigung von Reaktions-MinModen größeren Einfluss, als die korrekte Wahl der Zielmetabolite. Im Unterschied zu Metabolit-MinModen müssen Reaktions-MinModen keine Stoffe synthetisieren, wohl aber das Fließgleichgewicht berücksichtigen. Die Reaktions-MinModen realisieren daher im einfachsten Fall Zyklen, in denen Stoffe verbraucht und auf dem kürzesten Weg wieder regeneriert werden. Diese Zyklen sind thermodynamisch zulässig (andernfalls werden sie durch das TR-Kriterium ausgeschlossen), verbrauchen Energie und dienen häufig als Überlaufventil zum Schutz vor erhöhten (da toxischen) Konzentrationswerten bestimmter Intermediate. Sind die Zielflüsse eines Stoffwechselsystems nicht bekannt, so kann unseren Ergebnissen zufolge, durch Minimierung der α_i einer Linearkombination aus allen möglichen MinModen (MM-Set) und in Kombination mit gemessenen Austauschflüssen, zumindest für den Zentralstoffwechsel, ein erster Trend vorhergesagt werden.

Im Hinblick auf die Synthese von Zielmetaboliten stellen die Reaktions-MinModen meist suboptimale Alternativlösungen dar. Das bedeutet, der Lösungsraum wird u.a. durch MinModen mit leicht geänderten Schwerpunkt erweitert. Dies wird reflektiert durch eine unterschiedliche Häufigkeit, mit der einzelne Reaktionen in Reaktions- und Metabolit-MinModen verwendet werden. Am 1. Verzweigungspunkt des Netzwerks, an dem sich der Fluss zwischen Glykolyse und Pentose-Phosphat-Weg aufteilt (Flussverhältnis R_1), wird beispielsweise im einfachsten MinModen-Set (M) in 95% der MinModen Glucose vollständig in der Glykolyse weiter verstoffwechselt ($R_1=1$, siehe Abbildung 5.8). Lediglich in 2 von 38 MinModen ist der Pentose-Phosphat-Weg aktiv und die PGI (Reaktion 2) arbeitet in umgekehrter Richtung (R_1 ist daher negativ). Wird das MinModen-Set durch Reaktions-MinModen erweitert, sinkt dieser Anteil und es gibt MinModen, die ausschließlich den Pentose-Phosphat-Weg verwenden ($R_1=0$). In den Wachstumsratenexperimenten von Ishii *et al.* variiert dieses Verhältnis zwischen 0,57 und 0,88 (siehe Abbildung 3.6). Je größer die Anzahl der MinModen mit $R_1 < 0,57$, desto geringer die Wahrscheinlichkeit, dass bei gleichmäßiger Berücksichtigung der MinModen in der Linearkombination ein Verhältnis zwischen 0,57 und 0,88 vorhergesagt wird. Dieses Beispiel zeigt, dass durch Erweiterung der MinModen-Sets um Reaktions-MinModen einerseits die experimentell gemessene Lösung besser abgebildet werden kann, andererseits der umfassendere Lösungsraum viele nicht relevante (und suboptimale) Lösungen enthält und es bedarf qualitativ hochwertiger Messwerte (z.B. Enzymaktivitäten), um mittels Korrelation eine geeignete Lösung daraus auszuwählen.

Die Vorhersage geänderter metabolischer Ziele durch Auswertung der α_i erwies sich selbst bei sehr guter Datengrundlage als zu empfindlich und nicht sehr verlässlich. Der Vorteil der MinModen, ihnen einen Beitrag zur Erfüllung des Stoffwechselziels eindeutig zuordnen zu können, verliert für diese Methode damit an Bedeutung und der Lösungsraum könnte ebenso (oder besser) durch alternative Moden-Konzepte, wie Elementarmoden[184] oder Extreme Pathways[177, 147] aufgespannt werden. Dabei bleibt zu bedenken, dass ähnlich der Erweiterung mit Reaktions-MinModen, ein umfassender und vollständiger Lösungsraum nicht nur Vorteile bietet. Wie der vorherige Abschnitt gezeigt hat, kann je nach Datengrundlage die Verwendung eines Auswahlkriteriums zur Einschränkung des Lösungsraums durchaus sinnvoll sein.

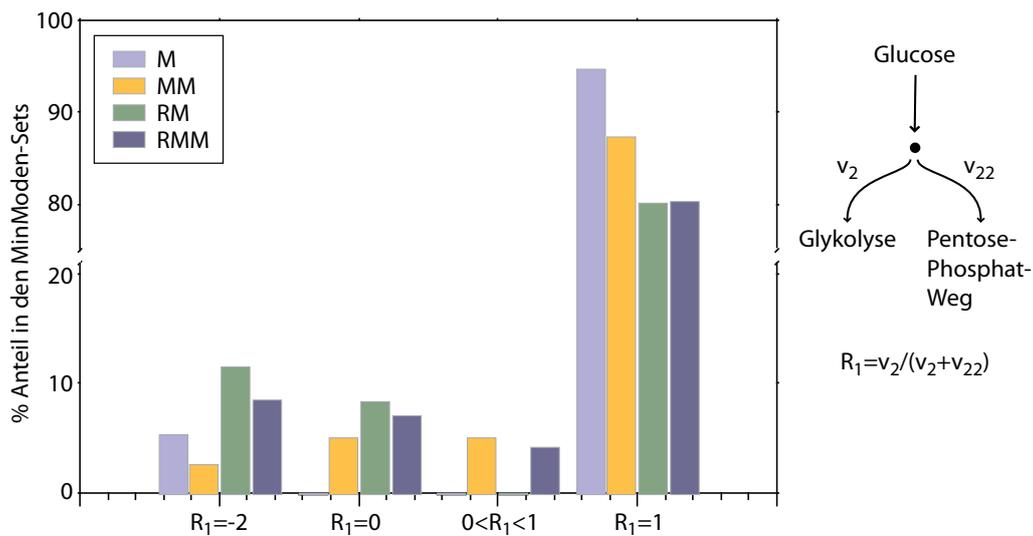


Abbildung 5.8: Häufigkeit des Glykolyse-Anteils in den einzelnen MinModen-Sets (R_1)

Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen: Sofern mit der Methodik nicht nur der Trend sondern auch der Wert von Flussänderungen vorhergesagt soll, ist sie nur in Verbindung mit zusätzlichen (kinetischen) Informationen hilfreich. Wie aus den häufig besseren Vorhersagen für Set 1 und Set 2 hervorgeht, ist es zudem sinnvoll die Korrelation auf Enzyme zu beschränken, deren Aktivität sehr wahrscheinlich über die verfügbare Enzymkonzentration reguliert wird. (Die Tatsache, dass keine der beiden Vorauswahlen die Vorhersage in allen Rechnungen zu steigern vermochte, weist darauf hin, dass ihre Definition noch verbessert werden kann). Die notwendigen (kinetischen) Informationen können durch zusätzliche Messungen erhoben werden oder, sofern die in der Literatur verfügbaren Daten übertragbar sind, dieser entnommen werden bzw. in Datenbanken wie der SABIO-RK[166, 197] recherchiert werden.

Für die Berücksichtigung kinetischer Daten könnte die Korrelation der relativen Änderung der Enzymkonzentration mit der relativen Änderung maximaler Enzymaktivität als Ansatz dienen:

$$E^* = \frac{E_2}{E_1} = \frac{v_2^{max}}{v_1^{max}} \quad (5.14)$$

Für die Differenz der v^{max} -Werte folgt daraus:

$$\Delta v^{max} = v_2^{max} - v_1^{max} = v_1^{max}(E^* - 1) \quad (5.15)$$

Die Änderung der maximalen Enzymaktivität hängt damit von der maximalen Enzymaktivität im Referenzzustand und der relativen Änderung der Enzymkonzentration ab. (Für $v_1^{max} = 1$ entspricht Gleichung 5.15 wohlgermerkt der dieser Arbeit zugrunde liegenden Annahme in Gleichung 5.11).

Abbildung 5.9 stellt die experimentell bestimmten Flussdifferenzen der Studie von Ishii *et al.* den gemessenen Enzymkonzentrationsänderungen gegenüber. Die Grafik zeigt, dass für sehr kleine Flussdifferenzen die vereinfachende Annahme: $v^{max} = 1$ gerechtfertigt ist; bei größeren Flussänderungen ist v^{max} jedoch wesentlich größer als eins. Die

Abbildung zeigt auch, dass die Experimente mit geringeren Wachstumsraten (GR01 und GR02) häufig negative Korrelation aufweisen: der Fluss steigt an und die Enzymkonzentrationen nehmen ab (GR02) oder umgekehrt (GR01), was die tendenziell schlechteren Vorhersagen für GR01 und GR02 im Vergleich zu den anderen beiden Experimenten erklärt.

Lineare Zusammenhänge zwischen Enzymkonzentrationsänderung und Flussänderung bezogen auf die 4 Wachstumsratenexperimente gibt es (insbesondere bei den Reaktionen 85 und 8, 42, siehe Abbildung 5.9 A, Ausschnitt). Einige davon sind in den Abbildungen 5.9 B-D gezeigt. Auch negative Korrelationen gibt es, wie das Beispiel der Citrat-Synthese (Abbildung 5.9 D) zeigt. Aus diesen Daten ließe sich für die einzelnen Enzyme ein v^{max} -Wert ableiten. Für die Umwandlung von g3p in 1,3dpg beträgt der Anstieg beispielsweise 10,6. Wird dieser Wert mit $(E^* - 1)$ multipliziert, so wird in der Korrelation ein Wert von 7,11 statt 0,67 angestrebt, dem experimentellen Flusswert von 5,63 deutlich näher kommend. Dies würde jedoch Fluss- und Enzymkonzentrationsmessungen für mindestens 4 (besser 5) ausreichend stabile Referenzzustände erfordern.

Die Anwendbarkeit der Methode erfordert daher entweder einen größeren, experimentellen Aufwand oder reduziert sich auf bereits gut charakterisierte Stoffwechselnetzwerke bzw. Teile für die sich experimentelle Flüsse bestimmen lassen. Interessante Alternativen bieten hier Methoden zur Abschätzung enzym-kinetischer Parameter, wie die von Steuer *et al.*[196] oder Grimbs *et al.*[72] entwickelten.

Sollte sich die hier entwickelte Methode in Kombination mit Methoden zur Vorhersage der Enzymregulation als erfolgreich erweisen, Wege und Bedingungen gefunden werden, unter denen die Korrelation von Enzymkonzentrationsänderung und Flussänderung zuverlässig als gegeben angenommen werden kann, dann wäre es durchaus möglich, Flussänderungen aufgrund geänderter mRNS-Expressionsraten vorherzusagen. An der Abschätzung des Anteils translaterter mRNS an der Gesamtmenge an mRNS wird geforscht, einen entsprechenden Ansatz bietet z.B. das Modell von Brockmann *et al.*[23].

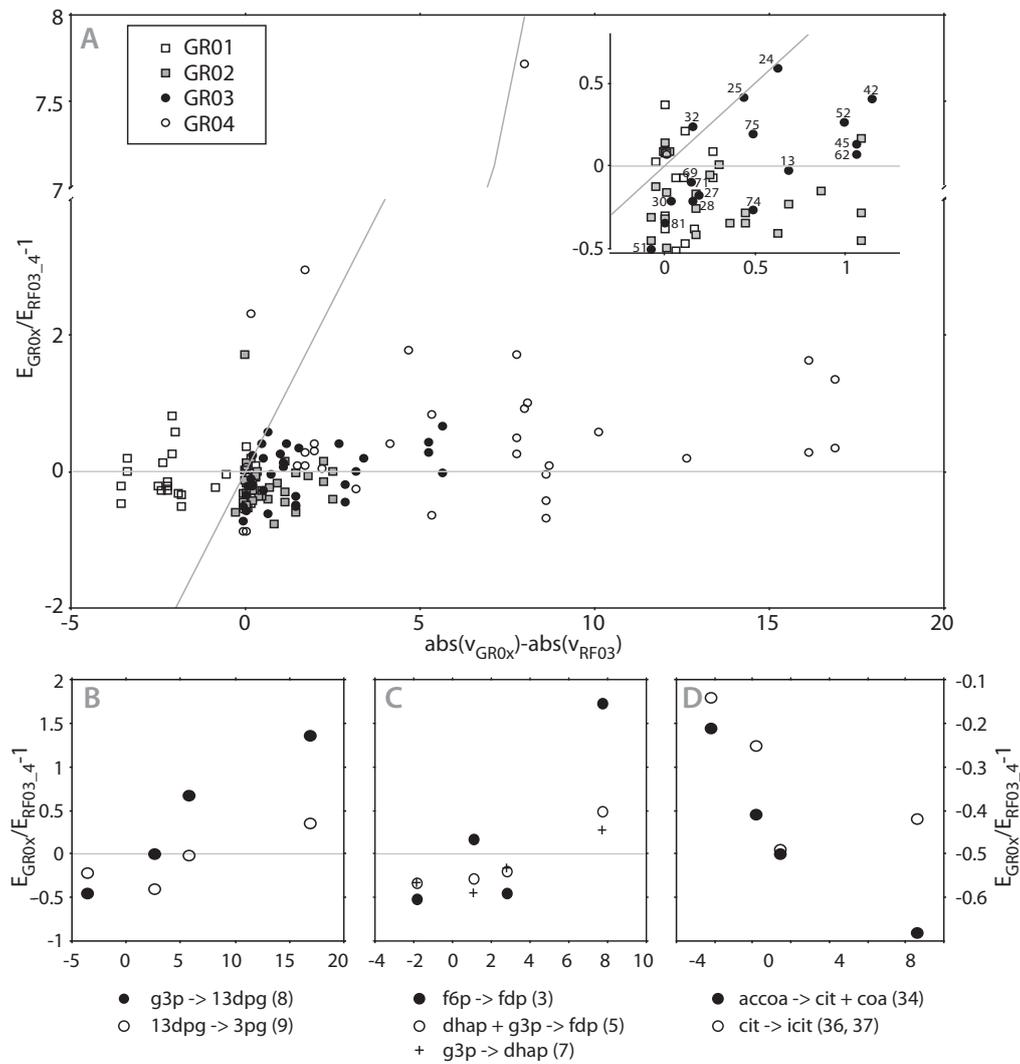


Abbildung 5.9: A) Gegenüberstellung experimenteller Flussdifferenzen und Enzymkonzentrationsänderungen. B), C) und D) zeigen den Zusammenhang für einzelne Enzyme in denen ein stationärer Fluss existiert.

6 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Flussbilanzanalyse Stoffwechselmodule vorhergesagt, die mit minimalem Flussaufwand die Synthese jeweils eines Metaboliten beschreiben. Diese sogenannten MinModen sind ein theoretisches Konstrukt, dass experimentell nur schwer überprüft werden kann¹. Ihre lineare Kombination (MinModen-Kombination) zur Repräsentation komplexer Stoffwechselfunktionen lässt sich dagegen mit anderen (global optimierten) Flussvorhersagen vergleichen und mit experimentell bestimmten Flüssen validieren.

Vorteile des MinModen-Konzepts: Schnelle Berechnung und Flexibilität

Die für die Flussbilanzanalyse charakteristische Flexibilität und Freiheit in der Wahl des Optimierungskriteriums und in der Berücksichtigung biochemischen Wissens als Nebenbedingung, gilt ebenfalls für die MinModen. Allerdings mit Einschränkungen, denn globale Messgrößen, die sich auf die Gesamtstoffwechsellistung beziehen, wie gemessene Austauschflüsse, können bei gleichzeitiger Vorhersage der Wichtungsfaktoren α_i für die Einzelzieloptimierungen nicht berücksichtigt werden. Stehen die Wichtungsfaktoren bereits fest, wie im Kapitel 2 und 3, ist dies durch gleichzeitige Berechnung aller MinModen theoretisch möglich. Enzymspezifische, metabolitspezifische oder reaktionsspezifische Informationen können in beiden Fällen jedoch relativ einfach integriert werden, wie die Berücksichtigung der Thermodynamik gezeigt hat.

Die kurze Berechnungszeit legt die Anwendung des Konzeptes für die Überprüfung der Konsistenz großer Netzwerke, speziell der Bestimmung blockierter Reaktionen und synthetisierbarer Metabolite nahe. Zusätzlich haben wir durch Entfernen blockierter Reaktionen das Netzwerk auf seinen aktiven und konsistenten Anteil reduziert. Dabei ist die Bedeutung, die dieser Schritt für die Netzwerkanalyse hat (Entfernen inkonsistenter Teile und fokussieren auf eine Fragestellung) vermutlich relevanter, als die dafür verwendete Methode selbst (da gibt es mehrere). Die hier verwendete Methode zur Identifizierung blockierter Reaktionen (über ReaMinModen) erlaubt es, schnell und einfach herauszufinden, ob eine Reaktion in Abhängigkeit der definierten Umgebungsbedingungen und Zielfunktionen (d.h. Zu- und Abflüssen) blockiert oder aber für die Erfüllung der vorgegebenen Stoffwechselziele notwendig (essentiell) ist.

Vorhersagequalität der MinModen-Kombination

Die Vorhersagen der MinModen-Kombination und globaler Optimierung sind sich, sowohl im Modell von *Methylobacterium extorquens* (Kapitel 2) als auch in dem von

¹Evt. durch Überproduktion des entsprechenden Zielmetaboliten.

Escherichia coli (Kapitel 3), sehr ähnlich. Wesentlicher Unterschied ist: die MinModen-Kombination sagt suboptimale Lösungen vorher, denn die individuelle Optimierung einzelner Ziele verwendet Wege, die unter global optimierten Gesichtspunkten eher von Nachteil sind (Netzwerkeffekt). Die Umwandlung von Phosphoenolpyruvat (pep) zu Pyruvat durch die Pyruvatkinase wird beispielsweise in den MinModen öfter verwendet, als in global optimierten Flusslösungen (R_2 , 3.Kapitel), weil durch den Zyklus bestehend aus pep-Carboxylase (Reaktion 52) und pep-Carboxykinase (Reaktion 18) das in den MinModen nicht abgeforderte atp "verschwendet" werden kann. Dies mag physiologisch unwahrscheinlich erscheinen, ist es aber nicht: dieser *Futile Cycle* ist als aktiver Weg zur atp-Verschwendung nachgewiesen[28].

Mit den uns verfügbaren Validierungsmöglichkeiten stellten wir Folgendes fest: unsere suboptimalen Flussvorhersagen waren keineswegs schlechter, in Teilen zeigte die MinModen-Kombination geringfügig bessere Ergebnisse. Nun ist der Anteil validierbarer Flussvorhersagen relativ gering und die experimentell bestimmten Flüsse abhängig vom jeweils verwendeten Netzwerkmodell der MFA-Analyse (siehe S.10). Alternativ können Austauschflüsse als unabhängige (bei Einzellern leicht zugängliche) Größe zum Vergleich verwendet werden: Die Glucoseaufnahmerate bei gleicher Biomasseproduktion ist in den suboptimalen Vorhersagen der MinModen-Kombination deutlich höher und näher an den experimentell beobachteten Raten als in den globalen Optimierungen (Abb. 4.7): In ihrer Ineffizienz kommen die suboptimalen Lösungen der "Realität" scheinbar näher, als die wesentlich effizienteren global optimierten Lösungen.

Mögliche Stoffwechselfunktionen und Vorhersage ihrer Änderung

Die Definition von Zielmetaboliten ist wesentlicher Bestandteil eines FBA-Modells. Ihre unzureichende Erfassung kann Ursache für abweichende Flussvorhersagen sein. So könnte die höhere, experimentelle Glucoseaufnahmerate auch auf das mit der Wachstumsrate zunehmend gebildete Glycogen zurückgeführt werden. In der Ishii-Studie werden für jedes Experiment die Beiträge zur Biomassesynthese mit der entsprechenden Wachstumsrate skaliert, d.h. es wird angenommen, dass sie in ihren Proportionen konstant bleiben. Da die experimentelle Bestimmung von Biomasseanteilen sehr aufwändig ist, ist dies eine häufig getroffene Annahme. Die Kenntnis von Stoffwechselfunktionen und die auf die aktuelle Situation angepasste Formulierung des Bedarfs entsprechender Vorläufermetabolite stellt, besonders im Hinblick auf die Modellierung des Stoffwechsels eukaryotischer Zellen, eine große Herausforderung dar.

Unsere Hoffnung, durch eine optimierungsbasierte Kombination der MinModen, Änderungen in diesen Stoffwechselfunktionen vorherzusagen, wurde leider nicht erfüllt bzw. die Zuverlässigkeit der Vorhersage ist - noch - unzureichend: Selbst bei perfekter Vorgabe von Flussänderungen (E_{ideal}) geben die Beiträge der einzelnen Module ein anderes Bild der Stoffwechselfunktion wieder, als der tatsächlich zugrunde liegende geänderte Bedarf einzelner Metabolite (Kapitel 5).

Mit Hilfe der MinModen können jedoch alle vom Netzwerk abgebildeten Stoffwechselfunktionen, im Sinne produzierbarer Metabolite, relativ schnell festgestellt werden (Kapitel 4). Aus diesen können einerseits relevante Funktionen ausgewählt werden. Andererseits kann bei Unkenntnis wichtiger Stoffwechselfunktionen unter der Annahme, die Synthese aller Metabolite sei gleich wichtig für die Stoffwechselfunktion, durch gleichmäßige Überlagerung aller möglichen Metabolit-MinModen eine gute Näherungs-

lösung vorhergesagt werden. Diese kann als Referenzlösung für alternative Gewichtungen von Stoffwechselfunktionen oder als Ausgangspunkt für die Bestimmung blockierter, essentieller oder häufig verwendeter Reaktionen dienen.

Berücksichtigung der Thermodynamik

Für die Berücksichtigung der Thermodynamik ließ sich folgendes feststellen: Die Verwendung der Gleichgewichtskonstanten zur Wichtung der Rückreaktion innerhalb der Flussminimierung[83] ist nicht zu empfehlen, da Umsetzungen, die entgegen dem chemischen Gleichgewicht ablaufen müssten, in der Vorhersage gemieden werden – Kompartimentierung und gezielte Stoffwechselregulation jedoch u.U. die für solche Umsetzungen notwendigen Bedingungen schaffen. Die empirische oder $\Delta_{\text{R}}G^{\circ}$ -Wert basierte Festsetzung von Reaktionsrichtungen[52] ist zuverlässiger. Es ist jedoch anzunehmen, dass mit der Ausweitung der Modelle auf weniger gut charakterisierte Bereiche des Stoffwechsels, diese Vorgehensweise an ihre Grenzen stoßen wird. Kapitel 3 zeigt, dass das von Hoppe *et al.*[87] vorgeschlagene Konzept der Thermodynamischen Realisierbarkeit (TR) durchaus eine wertvolle Alternative bietet - zumal verbesserte Methoden zur Abschätzung von $\Delta_{\text{R}}G^{\circ}$ -Werten[167, 96] und Initiativen, die beabsichtigen diese im großen Maßstab experimentell zu bestimmen¹, zuverlässigere $\Delta_{\text{R}}G^{\circ}$ -Werte in Aussicht stellen. Die fortschreitende Empfindlichkeit in der Messung von Metabolitprofilen und deren Aufarbeitung in Datenbanken, sollte den Aufwand der notwendigen Abschätzung realistischer Konzentrationsbereiche zunehmend vereinfachen.

Vorhersage von Flussänderungen

Da für Expressionsdaten, aber auch für Enzym- und Metabolitkonzentrationen relative Werte i.d.R. einfacher und zuverlässiger zu bestimmen sind, als absolute Größen, haben wir den Versuch gewagt, ohne detaillierte Enzymkinetiken, ausschließlich auf Basis gemessener Enzymkonzentrationsänderungen (und Austauschraten) auf Flussänderungen zu schließen. Flussänderungen wurden in anderen FBA-Ansätzen bereits berücksichtigt, z.B. um die Abweichungen von einem in den anderen Zustand zu minimieren (MOMA[190], ROOM[192]). FBA-Ansätze, die Flussänderungen vorhersagen, sind mir jedoch nicht bekannt.

Eine zuverlässige Vorhersage allein auf Basis von Enzymkonzentrationsänderungen ist uns leider nicht gelungen. Die Arbeit zeigt, dass die Verwendung des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten allein nicht ausreicht, um aus einer Menge gemessener Enzymkonzentrationsänderungen diejenigen Enzyme heraus zu filtern, deren Menge linear mit ihrer Umsatzrate korreliert (informativ Enzyme). Für die Vorhersagen von Flussänderungen bedarf es zusätzlicher Informationen, idealerweise kinetische. Ein hybrider Ansatz ist denkbar, in welchem die Vorauswahl informativer Enzyme, als auch die zu korrelierenden Terme auf verfügbaren Enzymkinetiken und gemessenen Enzymkonzentrationsänderungen beruhen.

¹Die Entwicklung und Anwendung von Hochdurchsatzverfahren zur quantitativen Messung von kinetischen Konstanten und Bindungsraten im genomweiten Maßstab ist wesentlicher Fokus des Manchester Centre for Integrative Systems Biology (MCISB): <http://www.mcisb.org/>

FBA-basierte Vorhersage (sub-)optimaler Stoffwechselmodule

Suboptimalität ist, wie wir gesehen haben, nicht unbedingt von Nachteil. Geht man davon aus, dass der Stoffwechsel z.T. Ergebnis zufälliger Genverluste ist, dann sind biologische Systeme nicht zwingend optimal[157]. So zeigen Studien mit *Bacillus subtilis*[60], in denen systematisch einzelne Gene blockiert wurden, dass es zumindest bei Bakterien Mutanten gibt, die schneller wachsen als der Wildtyp. Doch selbst, wenn die Genverluste genau gesteuert wären, ein optimaler Organismus also möglich wäre, ist er vielleicht aus gutem Grund nicht angestrebt worden. Lewontin weist darauf hin([92], Seite21), dass ein durchschnittlicher Phänotyp, der dem optimalen Phänotyp sehr ähnlich ist, aber eine hohe Varianz mit der Umgebung aufweist, nachteilig sein kann und ein stabiler aber sub-optimaler Phänotyp bevorzugt wird. Nach Huerta-Sanchez[88] erlaubt eine erhöhte Nachkommenschaft das Eingehen evolutionärer "Risiken", ermöglicht daher auch nicht optimale Phänotypen. Es geht also um einen Kompromiss zwischen Effizienz und Flexibilität.

Die modulare Organisation, ein wesentliches Merkmal robuster Systeme, erlaubt einigen Teilen eines komplexen Systems sich zu ändern, ohne mit anderen Teilen zu interferieren. Wie die erhöhte Glucoseaufnahmerate der Vorhersage der MinModen-Kombination zeigt, bringt Modularität eine gewisse Ineffizienz mit sich und ist eher langfristig gesehen optimal. Durch das Verschmelzen von Modulen kann die Effizienz gesteigert und Ressourcen eingespart werden, bis hin zur globalen Optimierung. Als Kompromiss zwischen Effizienz und Flexibilität ist eine Mischform zwischen globaler und Einzelzieloptimierung daher wahrscheinlich und die gemeinsame Optimierung von Metabolitsynthesen, die funktionell eng in Zusammenhang stehen, eine sinnvolle, weiterführende Untersuchung.

Optimierungskriterien: Auswahl und Kombination

Es ist bekannt, dass Bakterien unterschiedliche Wachstumsstrategien verfolgen[150] und die Ausrichtung des Stoffwechsels sich in Abhängigkeit der Substratverfügbarkeit ändert. So versuchen Bakterien unter substrat-limitierten Bedingungen mit den wenigen Ressourcen ein maximales Wachstum zu erreichen[182]. Ist das Substrat nicht der begrenzende Faktor, steht die ATP-Produktion im Vordergrund und es wird möglichst viel ATP unter Verwendung von möglichst wenigen Enzymen synthetisiert[137]. Bei Substratüberschuss hingegen wird ein ineffizienter "over-flow" Stoffwechsel gefahren, der viel Energie freisetzt und die katabolen Umsatzraten in die Höhe treibt[138]¹ (d.h. es wird eine maximale Wachstumsrate angestrebt). Die Untersuchung verschiedener Umgebungsbedingungen ist für die Bestimmung geeigneter Optimierungskriterien daher essentiell.

Das Kriterium der Flussminimierung wird begründet durch den Energie- und Ressourcenaufwand bei der Neusynthese von Enzymen und kommt der Minimierung enzymatischer Schritte sehr nahe. Es ist jedoch fragwürdig, ob die Flussminimierung für Modellorganismen, die nicht nur "im Überfluss leben", sondern sich an diesen auch angepasst haben, tatsächlich geeignet ist. So beobachten Fuhrer *et al*[64] einen hohen glykolytischen Fluss in den Modellorganismen *E.coli* und *B.subtilis*, während bei

¹Entsprechend den Theorien der "Non-equilibrium Thermodynamics", nach denen eine direkte Korrelation von $\Delta_R G$ -Werten mit Flussraten besteht

6 Nicht-Modellorganismen Glucose fast ausschließlich über den über den effizienteren und kürzeren Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg (ED-Weg) verstoffwechselt wird. Die Autoren führen dies auf die Anpassung der Modellorganismen *E.coli* und *B.subtilis* an Industrie- und Laborbedingungen zurück. Die Anpassung an die Ressourcenverfügbarkeit bei der Wahl eines geeigneten Optimierungskriteriums zu berücksichtigen, ist daher wichtig und die Entwicklung von FBA-Methoden, die multiple Optimierungskriterien verwenden, sinnvoll und unterstützenswert.

Das Phänomen unterschiedlicher Substratverfügbarkeit ist jedoch nicht nur außerhalb der Zelle anzutreffen. Innerhalb der Zelle könnten sehr langsame, oder aber sehr schnelle Umsetzungen ebenfalls zu einem Rückstau oder Mangel von Intermediaten führen. Es ist daher denkbar, dass die Synthese von Stoffen gleichzeitig verschiedene Kriterien berücksichtigt, d.h. dass es in der Organisation des Stoffwechsels Module gibt, die nach unterschiedlichen Kriterien optimiert sind. Die Unterteilung der Organisation des Stoffwechsels in hoch-konservierte Kernmodule und sehr variable Randmodule (siehe Abbildung 1.2), legt für Kernumwandlungen eine Optimierung auf Effizienz nahe, während für Randmodule kurze Synthesewege oder eine hohe Flussgeschwindigkeit bevorzugt werden. Beispielsweise könnte die Synthese von Pep aus Glucose dem Überschussprinzip unterliegen, während die Synthese von Oxaloacetat aus Pep nach substrat-limitierten Gesichtspunkten (Effizienz) stattfindet.

Fazit

Die Entwicklung angemessener Optimierungskriterien, die die Ausrichtung des Stoffwechsels umfassend und in all seiner Vielfältigkeit und Flexibilität beschreiben, bedarf noch einer intensiven Auseinandersetzung, erklärte Watson 1986 in der ersten Anwendung der Optimierungsrechnung auf biologische Systeme[213]. Diese Auseinandersetzung ist noch nicht abgeschlossen - im Gegenteil! Die derzeitige Erforschung multipler Optimierungskriterien[133, 134] deutet vielmehr auf eine tiefgehende und umfassende Auseinandersetzung mit Optimierungskriterien hin. Das hier entwickelte Konzept der MinModen unterstützt diese Auseinandersetzung durch die Herausarbeitung wesentlicher Punkte. Die Neuartigkeit des MinModen-Ansatzes besteht in der Berücksichtigung verschiedenartiger Aspekte:

- **Suboptimalität** bzw. **Modularität**: Einzelzieloptimierung (statt globaler Optimierung)
- **Datenverfügbarkeit**: Verzicht auf Enzymkinetiken (statt Verwendung detaillierter Enzymkinetiken)
- **Optimierungskriterium**: Flussminimierung (statt Zielmaximierung)
- **Datenzuverlässigkeit**: Vorhersage relativer (statt absoluter) Flüsse

Wie die Ergebnisse zeigen, ist die hier entwickelte Methode in all diesen Aspekten noch unausgereift und stellt weitestgehend eine Alternative zu bisherigen Konzepten dar, allerdings eine sehr ausbaufähige. Der Wert dieser Arbeit besteht daher in dem Aufzeigen alternativer Möglichkeiten optimierungsbasierter Flussvorhersage und der Entwicklung eines soliden Fundaments. Die Herausforderung besteht darin, (anhand von Hybridmodellen) bezüglich all dieser Aspekte einen sinnvollen Kompromiss zu finden.

Zusatzinformationen

1 Theoretische Grundlagen

1.1 Das Lösen von Optimierungsproblemen

Der durch die Ungleichungen beschränkte Lösungsraum lässt sich bei zweidimensionalen Problemen relativ einfach als Fläche darstellen (nur 2 Variablen). Der Lösungsraum multidimensionaler Probleme wird entsprechend durch ein mehrdimensionales Polyeder beschrieben. Unabhängig vom gewählten Algorithmus kann es: i) genau eine optimale Lösung (Lösung entspricht einer Ecke am Polyeder), ii) mehrere optimale Lösungen (Lösungen finden sich entlang einer Kante des Polyeders) oder iii) keine optimale Lösung (der Lösungsraum ist unbegrenzt) geben. Abbildung 1 stellt diese Möglichkeiten für zweidimensionale Probleme dar.

Arten der Lösung

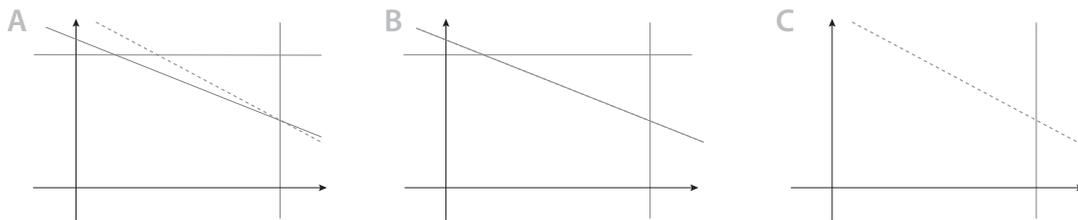


Abbildung 1: Mögliche Anzahl optimaler Lösungen: A) genau eine, B) mehrere, C) keine.

Enthalten sowohl die Nebenbedingungen, als auch die Zielfunktion ausschließlich lineare Terme, spricht man von linearer Optimierung (englisch *linear programming*, LP). Enthält die Zielfunktion dagegen quadratische Terme (z.B. x^2), spricht man von Quadratischer Optimierung (QP). Die Variablen der linearen Optimierung nehmen reelle Zahlen an. Sollen ihnen ausschließlich ganzzahlige (integer) Werte zugewiesen werden, spricht man von ganzzahliger Optimierung (IP). Beide Möglichkeiten finden sich in der Gemischt-Ganzzahligen-Optimierung (MILP), welche wir im 3.Kapitel verwenden.

Termini

Den Durchbruch erlangte die Lineare Optimierung mit der Entwicklung des Simplex-Algorithmus, eines der bis heute meist genutzten Verfahren zur Lösung linearer Optimierungsprobleme. Der Simplex-Algorithmus wurde 1947 von G.B. Dantzig entwickelt¹ und etwas später veröffentlicht[37]. Grundlegende Idee dieser Methodik ist es, auf den Kanten des Polyeders in Richtung auf- oder absteigenden Zielwert sich der optimalen Lösung stetig zu nähern. Als Beispiel sei die (geometrische) Lösungsfindung des auf Seite 22 genannten zweidimensionalen Problems mit Hilfe des Simplex-Algorithmus gezeigt (siehe Abbildung 2).

Simplex-Algorithmus

¹der damals militärische Abläufe bei der U.S. Air Force optimierte

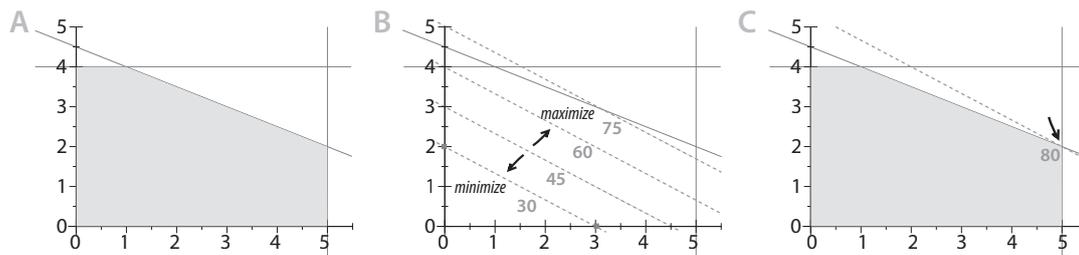


Abbildung 2: Geometrische Lösung eines 2-dimensionalen Optimierungsproblems mittels Simplex-Algorithmus. A) Abgrenzen des zulässigen Bereichs (farblich markiert) durch Ungleichungen, B) Verbindung zweier Lösungen gleichen Zielwerts zur Isoniveaulinie, Parallelverschiebung führt zu Lösungen höheren oder niedrigeren Zielwerts, C) Parallelverschiebung bis an den Rand des zulässigen Lösungsbereichs, um die Lösung mit maximalem Zielwert zu finden (globales Maximum)

Innere Punkt Methode

Einen alternativen Lösungsansatz bietet die 1984 durch Narendra Karmarkar entwickelte Innere Punkt Methode[102]. Anders als beim Simplex-Algorithmus ist hier die dem Algorithmus zugrunde liegende Idee, sich im Inneren des zulässigen Polyeders in einer den Zielwert verbessernden Richtung zu bewegen - und nicht an dessen Rand entlang. Der optimalen Lösung wird sich somit asymptotisch angenähert.

Für kleinere Probleme: Simplex

Der Lösungsweg, im Sinne notwendiger Rechenschritte, ist beim Simplex-Algorithmus länger als beim Innere-Punkt-Verfahren; das Innere-Punkt-Verfahren nähert sich deshalb schneller dem Optimum, findet u.U. aber keine exakte Lösung. Für kleinere Probleme ist die Simplex-Methode deshalb besser geeignet. Allerdings wird in einigen Fällen keine Lösung in akzeptabler Zeit gefunden (worst-case). An der Verbesserung existierender und Entwicklung neuer Lösungsstrategien wird weiterhin geforscht.

1.2 Geschichte der Flussbilanzanalyse

In einer der ersten FBA-Anwendungen 1986, verwendete Watson[213] als Optimierungskriterium den minimalen Verlust freier Energie (thermodynamische Effizienz), ausgedrückt durch:

$$\text{minimize } \sum_{i=1}^r c_i v_i > z \tag{1}$$

Dabei entspricht der Koeffizient c_i dem Aufwand an freier Energie, um einen Fluss $v_i = 1$ zu realisieren. Das Model sucht die gewichtete Summe der Flüsse zu minimieren.

Während Watson der linearen Programmierung und der Verwendung diskreter, statischer Modelle noch kritisch gegenüberstand, sie für Lehrzwecke ausreichend befand, für den Erkenntnisgewinn aber kinetische Modelle für nicht-ersetzbar hielt, begannen Fell und Small mit Hilfe der Optimierungsrechnung die Synthese von Fetten im Fettgewebe zu untersuchen[54]. In dieser Veröffentlichung wird die Verwendung der Kostenfaktoren c_i klarer: um einzelne Flüsse zu minimieren bedarf es positiver Faktoren, um sie zu maximieren, negativer. Für den überwiegenden Teil der Stoffflüsse ist dieser Faktor jedoch null. Gleichung 1 stellt daher eine allgemeine Form dar, auf die sich fast alle uns heute bekannten Formen der Flussbilanzanalyse zurückführen lassen. Im Falle der

Fettsynthese wurde die Menge an Glucose, die für die Synthese eines Triacylglycerols notwendig ist, minimiert, also $c_{Glucose} = 1$ gesetzt.

Es sei angemerkt, dass bereits in der Arbeit von Watson Zelleistungen über wohl definierte Metabolitverbrauchsflüsse b_i (siehe Gleichung 1.8) berücksichtigt werden, deren Proportionen sich an der gemessenen Biomassezusammensetzung orientieren. Der Metabolitverbrauch bzw. -bedarf bestimmt sich aus dem Produkt aus Wachstumsrate μ und Metabolitkonzentration $[M_i]$:

$$b_i = \mu[M_i] \quad (2)$$

2 Hintergrundinformationen zum 3.Kapitel

2.1 Erweiterung des *E.coli*-Modells von Schütz *et al.*

Im Schütz-Modell besitzt jedes Genprodukt einen eigenen Reaktionsindex. Um eine Liste von Reaktionen ausschließlich unterschiedlicher Stöchiometrien zu erhalten, wurden die Genbezeichnungen separat geführt (siehe Tabelle 8) und einige Reaktionen zusammengefasst. Der niedrigste der Schütz-Indizes wurde jeweils beibehalten (z.B. Reaktionen 3 und 4 werden zu 3).

Zusammengefasste Reaktionen

Bei allen Metaboliten wurde analog zum Modell von Feist *et al.*[52] der Index der BiGG-Datenbank[176] verwendet, um einen automatischen Vergleich der Netzwerke vornehmen zu können. Konkret wurden folgende Metabolite umbenannt:

Änderung der Metabolitkürzel

ga3p→g3p	glc→glc-D	d6pgl→6pgl	x5p→xu5p-D
rl5p→ru5p-D	lac→lac-D	acal→acald	2kd6pg→2ddg6p
mal→mal-L	cac→acon-C	q→q8	

Zur Vereinfachung wurde sich bei der Elektronenübertragung auf das Ubiquinon/Ubiquinol-System beschränkt, d.h. q und qh2 wurde durch q8 und q8h2 ersetzt.

Im Schütz-Modell wurden vereinfachend sämtliche Erhaltungsgrößen zu einem (eher virtuellen) Metaboliten zusammengefasst. Um den Metaboliten später gemessene Konzentrationsbereiche zuordnen zu können, wurden im gesamten Modell die Metabolitpärchen wieder detailliert aufgenommen, d.h. ATP wird zu atp/adp, NADH zu nadh/nad, NADPH zu nadph/nadp, Hxt zu h(e)/h, sowie 2 ATP zu atp/amp. Lediglich an einer Stelle wurde einer dieser virtuellen Metabolite, ATP, unter der Bezeichnung "atpEnergy" beibehalten, um die Gewinnung metabolischer Energie später gezielt als Stoffwechselziel fordern zu können (Reaktion 97). Um den Metaboliten amp ins Modell einzubinden, wurde aus dem Nukleotidbergungsstoffwechsel die Adenylatkinase, die reversibel die Bildung von 2 adp Molekülen aus je einem Molekül amp und atp katalysiert, hinzugenommen (Reaktion 113, ADK1).

Abbildung von Erhaltungsgrößen

Um evt. stöchiometrische Inkonsistenzen aufdecken und Elemente bilanzieren zu können, wurden die Massenbilanzen der Reaktionen durch Hinzufügen nichttranslozierter Protonen, Wasser und Phosphat ausgeglichen. Um diese Metabolite, insbesondere Phosphat, ins Modell einzubinden, wurden Reaktionen hinzugenommen: Zum einen wurde ein Enzym zur Spaltung von Diphosphat in 2 Orthophosphate eingeführt (Reaktion 114), zum anderen wurde ein reversibler protonengradientgetriebener Phos-

Bilanzierung der Masse

phattransporter ins Modell mit aufgenommen (Reaktion 115). Die nichttranslozierten Protonen, sowie Sauerstoff, werden nicht bilanziert. Für hp und h₂o sind deshalb keine zusätzlichen Reaktionen notwendig.

Annotation der Reaktionskürzel

Anhand der gegebenen Stöchiometrie und Genannotation wurden den Reaktionen entsprechende Indizes im Feist-Modell zugeordnet. In den meisten Fällen war dies automatisch möglich, einige Fälle bedurften jedoch besonderer Aufmerksamkeit aufgrund konzeptioneller Unterschiede in beiden Modellen. Dies betrifft insbesondere Reaktionen, bei denen das unspezifische Quinon (q) im Schütz-Modell stellvertretend für alle anderen alternativen Elektronenübertragungskomplexe durch Ubiquinon (q8) ersetzt wurde. Weiterhin wurde FADH als Elektronenakzeptor aus dem Modell entfernt und an entsprechender Stelle direkt durch das Ubiquinonsystem q8/q8h₂ ersetzt. Die Anzahl der gepumpten Elektronen innerhalb der Atmungskette wurde ebenfalls an das Feist-Modell angepasst. Details zu den konzeptionellen Änderungen finden sich in Tabelle 4.

Hinzufügen von L-Lactat

Im Modell von Schütz wurde die Bildung von Lactat in der D-Form bereits berücksichtigt. Da in den Metabolitprofilen häufig auch das physiologisch bedeutungsvollere L-Lactat gemessen wird, wurde dieser Metabolit ebenfalls ins Modell aufgenommen (auch wenn Lactat zunächst nicht als Substrat zur Verfügung stehen soll). L-Lactat erfährt Anbindung an das Modell durch die entsprechende Lactat-Dehydrogenase, die die Umwandlung von Pyruvat in sowohl L- als auch D-Lactat katalysiert (Reaktion 116). Allerdings arbeitet dieses Enzym laut Fachliteratur irreversibel, d.h. Lactat wird nur verstoffwechselt und nicht gebildet. Für die Aufnahme von L-Lactat (und theoretisch auch für die Abgabe) wurde ein zusätzlicher Transporter eingeführt (Reaktion 117).

Genassoziationen

Für die Zuordnung experimenteller Daten ist es notwendig, den katalysierten Reaktionen ein entsprechendes Enzym zuzuweisen. Während dafür traditionell die EC-Nummer verwendet wurde, erfolgt die Verknüpfung mit experimentellen Daten, sei es nun Protein- oder Transkriptmessungen, meist über die Genbezeichnung. Sowohl im Schütz-Modell als auch im Feist-Modell werden Genbezeichnungen angegeben, allerdings in unterschiedlichen Formaten: Feist verwendet den Blattner Genbank record identifier (Format: b1234) und Schütz einen klingenden Gennamen (Pathway Tools gene name), welcher auch in dieser Arbeit verwendet wird. Die Feist-Bezeichner wurden mit Hilfe der auf EcoCyc¹ zur Verfügung gestellten Tabelle[198] konvertiert. Zwischen den beiden Modellen gab es einige Diskrepanzen, die in Tabelle 5 im Detail erläutert werden. Die gesamte Zuordnung findet sich in Tabelle 8.

Stöchiometrie

Die Stöchiometrie des von Schütz *et al.* zur Verfügung gestellten Modelles (Reaktionsschema als sbml und xls-Datei verfügbar) wurde geringfügig verändert und einige Metabolite und Reaktionen entsprechend dem genomweiten Ecoli-Modell von Feist *et al.*[52] umbenannt. Das resultierende Modell umfasst insgesamt 76 Reaktionen und erlaubt den Austausch von Glucose, Pyruvat, Formate, D- und L-Lactat, Succinat, Ethanol, Acetat, sowie Nitrit und Nitrat. Die Reaktionen sind in Tabelle 6 aufgeführt, die enthaltenen Metabolite in Tabelle 7. Im Folgenden werden einige Besonderheiten des Modells näher erläutert, die für das aerobe Wachstum auf Glucose (als einzige Kohlenstoffquelle) von Bedeutung sind.

Glucose-Stoffwechsel

Die Glucose kann zunächst über das Phosphotransferase-System (PTS, Reaktion 85) unter Umwandlung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat aufgenommen werden. Al-

¹Encyclopedia of Escherichia coli K-12 Genes and Metabolism: <http://ecocyc.org/>

ternativ steht ein ATP-abhängiger und hochaffiner Glucosetransporter zur Verfügung (Reaktion 96), der allerdings nur bei sehr geringen Glucosekonzentrationen exprimiert wird[57]. Die aufgenommene Glucose kann auf drei verschiedenen Wegen in Pyruvat umgewandelt werden, die sich hinsichtlich ihrer Energieausbeute unterscheiden:

Glykolyse	2 atp + 2 nadh
Pentose-Phosphat-Weg (PP)	1 atp + 1 nadh + 2 nadph
Entner-Doudoroff-Weg (ED)	1 atp + 1 nadh + 1 nadph

Topologisch betrachtet stellt der ED-Weg, wie auch der PP-Weg eine Alternative zum oberen Teil der Glykolyse dar. Er ist eine Besonderheit des bakteriellen Stoffwechsels; für viele Bakterien ist er der Hauptweg zur Verstoffwechslung der Glucose[64]. Seine Bedeutung in E.coli für das Wachstum auf Glucose ist allerdings umstritten. Fakt ist, dass der Weg für das Wachstum auf Gluconat, Glucuronat, oder Galacturonat - jeweils Vorstufen der Metabolite 6-Phosphogluconat (6pgc) und 2-Dehydro-3-deoxy-D-gluconate 6-phosphate (2ddg6p) - eine wichtige Rolle spielt[127].

Das entstandene Pyruvat kann direkt ins Medium abgegeben werden, in Lactat, Acetat oder Ethanol umgewandelt werden oder auf einem der beiden verfügbaren Wege (64 oder 15) in Acetyl-CoA weiter verstoffwechselt werden um den Zitratzyklus zu speisen. Die Umwandlung von Pyruvat zu Malat via Malic Enzyme verläuft in der Regel in umgekehrter Richtung, weshalb dies eher ein Zufluss als ein Abfluss zum Pyruvat darstellt. Neben den glykolytischen Enzymen sind, zumindest bis zum Glucose-6-Phosphat, die Enzyme der Gluconeogenese, die die Umkehrreaktion der Glykolyse, sprich den Aufbau von Glucose aus Pyruvat ermöglichen, ebenfalls im Modell enthalten (Reaktionen 18,19,21). Das Modell enthält weiterhin den Zitratzyklus, den Glyoxalatshunt, sowie die Synthese von Ethanol und Acetat aus Acetyl-CoA.

*Pyruvat-
Stoffwechsel*

Ein für den Zentralstoffwechsel eher untypisches Enzym, die Methylglyoxal-Synthase (84), wird ebenfalls berücksichtigt. Sie katalysiert die Umsetzung des in der Glykolyse entstehenden Dihydroxyacetonephosphat (dhap) zu Phosphat und Methylglyoxal - einem toxischen Intermediat - welches unter Verwendung des Cofaktors Gluthathion von einem weiteren Enzym weiter in D-Lactat umgesetzt wird. In der Entwicklung des Zellstoffwechsels diente dieser Weg vermutlich als Zulieferer für Intermediate des Zitratzyklus[99]. Die heutige Bedeutung der Methylglyoxal-Synthase in E.coli ist jedoch nicht ganz klar. Töttemeyer *et al.*[203] vermuten, dass der erste Schritt dieses Weges bei Phosphatlimitierung (u.a. bei hohem Wachstum) sowohl einer Akkumulation von Triosephosphaten vorbeugt, als auch zur schnellen Regeneration von Phosphat dient. Fakt ist, dass die Methylglyoxal-Synthase stark reguliert wird und eine extrem geringe Aktivität besitzt, die Reaktion also nur bei einer sehr hohen Konzentration von Dihydroxyacetonephosphate (dhap) in der Funktion eines "Überlaufventils" einen nennenswerten Flussbeitrag leistet¹.

*Methylglyoxal-
Synthase*

Zur Energiegewinnung steht, neben der Substratphosphorylierung, die Veratmung von wahlweise Sauerstoff und Nitrat als Energiequelle zur Verfügung. Dazu enthält das Modell zwei Cytochrome, CYTBO3_4pp und CYTBDpp, die die von den Substraten abgegebenen Protonen und Elektronen von den Quinonen empfangen und auf Sauerstoff oder Nitrat übertragen. In E.coli gibt es drei Arten von Quinonen: das zu den

*Energie-
gewinnung*

¹ Z.B. durch mangelnde Aktivität glykolytischer Enzyme (insbesondere der PGK), Mutationen, Enzymdeaktivierungen oder plötzliche, drastische Änderung der äußeren Substratkonzentration mit kurzzeitigem Verlust der Kontrolle über die Kohlenstoffzufuhr[58].

Benzoquinonen gehörende Ubiquinon (q) und die zu den Naphtoquinonen gehörenden Menaquinone (mqn) und Demethylmenaquinone (dmmqn). Die Mitglieder dieser Klassen können jeweils in der Anzahl ihrer Isoprenyl-Untereinheiten variieren, wobei die Quinone, die hauptsächlich gefunden werden, 8 Untereinheiten enthalten (q8, mqn8, dmmqn8)[33]. In geringem Maße sind die Quinone funktionell austauschbar - ihr vor allem unterschiedliches Redoxpotential führt zu spezifischer Funktionalität: Während Menaquinon (mqn) besser geeignet ist für Elektronenakzeptoren mit niedrigem Potential, wie Fumarat, eignet sich Ubiquinon besser für die Sauerstoff- und Nitratatmung. Demethylmenaquinon ist lediglich für die Dimethylsulfoxid(DMSO)-Atmung unverzichtbar. Unter aeroben Bedingungen übernimmt somit Ubiquinon die Hauptrolle¹. Diese Aufgabenverteilung spiegelt sich auch in den Mengenverhältnissen wieder. In aerob gewachsenen Zellen ist die Ubiquinonkonzentration vier bis fünfmal höher als die der Menaquinone. Unter anaeroben Bedingungen hingegen, sind die Ubiquinonlevel 10fach kleiner und stellen nur noch 1/3 der Menaquinon-Konzentration dar[211, 221]. In diesem Modell wird ausschließlich Ubiquinon-8 (q8) berücksichtigt. Die Reduktion von Fumarate durch das Menaquinon ist nicht im Modell enthalten. Da dieses Enzym ausschließlich unter anaeroben Bedingungen exprimiert wird[27], ist diese Vereinfachung unter den hier verwendeten aeroben Bedingungen akzeptabel.

Zielmetabolite Eine *E.coli*-Zelle, die bei 37°C aerob in Glucoseminimalmedium wächst und sich ungefähr alle 40 Minuten verdoppelt, enthält (anteilig am Trockengewicht) im Durchschnitt 55% Protein, 20,5% RNA, 3,1% DNA, 9,1% Fette, 3,4% Lipopolysaccharide, 2,5% Peptidoglykan, 2,5% Glycogen, 0,4% Polyamine und 3,5% andere Metabolite, Cofaktoren und Ionen[136]. Tabelle 1 enthält die Metabolite, die für die Berücksichtigung der wichtigsten Stoffwechselfunktionen im Zentralstoffwechsel von *E.coli* zu den notwendigen Vorläufern und Grundbausteinen gezählt werden.

2.2 Annahmen im Modell von Ishii *et al.*

Den Flussberechnungen von Ishii *et al.* sind Annahmen bezüglich der enzymatischen Aktivität zugrunde gelegt, die wir zum Teil übernehmen. Folgende enzymatische Umsetzungen werden von ihm (und uns) vernachlässigt:

- Aufnahme von Glucose über den atp-abhängigen ABC-Transporter (96)
- Dephosphorylierung von Fructose-Bisphosphat durch die Fructose-Bisphosphat-Phosphatase FBP (19), ein Enzym der Gluconeogenese
- Die atp-abhängige Phosphorylierung von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat durch die Phosphoenolpyruvatsynthase, PPS (21)
- Der Entner-Doudoroff-Weg (82,83) - dieser ist ausschließlich in der PGI-Mutante aktiv.
- Die Stickstoffatmung, inklusive entsprechender Austauschreaktionen (60,88,89)
- Die direkte Umsetzung von Pyruvat nach Acetat durch die Pyruvatoxidase, POX (61)

¹In Mutanten ohne Ubiquinon (ubiA-) kann Menaquinon diese Rolle übernehmen (menA-Gen), allerdings nicht, wenn Succinat die einzige Kohlenstoffquelle ist, d.h. Menaquinon und Demethylmenaquinon können das Ubiquinon funktionell nicht komplett ersetzen.

Glucose-6-Phosphat (g6p)	Glycogen	a)
3-Phosphoglycerat (3pg)	Serine, Cystein, Glycin	b)
Pyruvat (pyr)	Alanin, Valin, Lysin	b)
Phosphoenolpyruvat (pep)	Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan	b)
Erythrose-4-Phosphat (e4p)	Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan	b)
Ribose-5-Phosphat (r5p)	Histidin, Purine(ATP,GTP), Folate(THF)	b,c)
Oxalacetat (oaa)	Aspartat, Asparagin, Threonin, Methionin, Lysin, Isoleucin	b,c)
2-Oxoglutarat (akg)	Glutamat, Glutamin, Prolin, Arginin, Pyrimidine (UTP,CTP,dTTP)	b,c)
Acetyl-CoA (accoa)	Arginin, Palmitat	b,d)
Glyceraldehyde 3-Phosphat (g3p)	Glycerol	e)
Fructose-6-Phosphat (f6p)	N-acetylglucosamine	e)

Tabelle 1: Zielmetabolite im Modell von *E.coli* (links), die als Vorläufer anderer Metabolite (Mitte) folgenden Stoffwechselfunktionen dienen: a) Speicherung von Glucose als Glycogen, b) Proteinsynthese, c) DNS- und RNS-Synthese, d) Synthese von Fetten und Fettsäuren, e) Synthese von Membranbestandteilen (insbes. Phospholipide und Peptidoglykane) (nach Pramanik et al.[155]).

- Die Gewinnung von Acetyl-CoA aus Acetat über die Acetyl-Synthetase, ACS (79)
- Die Verwendung von sowohl L-Lactat, als auch D-Lactat als Substrat durch die Lactat-Dehydrogenase, LDH (80,116,117)
- Der Methylglyoxalweg (84)
- Der Glyoxalatshunt (50,51) bei erhöhter Wachstumsrate des Wildtyps, d.h. bei $0,4, 0,5$ und $0,7h^{-1}$

Für die vernachlässigten Aktivitäten wird in der reduzierten Modellversion der entsprechende Flusswert auf null gesetzt, was den Stillstand dreier weiterer Reaktionen zur Folge hat: die Hexokinase HEX (1), die Pyrophosphatadenylase PPA (114) und die Adenylatkinase ADK1 (113). Lediglich 4 Umwandlungen, die detaillierter als bei Ishii *et al.* modelliert werden (siehe Seite 52), unterscheidet das reduzierte Modell vom Ishii-Modell.

2.3 Gibbs-Energie von protonengetriebenen Membranprozessen

Bei der Zuweisung von Standard-Gibbs-Energien verdienen Transporte über die Zellmembran besondere Beachtung, da neben der Ausbildung eines Konzentrationsgradienten u.U. auch eine Ladungstrennung erfolgen kann, die zusätzliche, elektrische Kräfte induziert. Dies gilt insbesondere für Protonen. Um die Funktionsweise des Protonengradienten zu verstehen, muss man wissen, dass sich die Kraft des Protonengradienten an einer biologischen Membran aus zwei Komponenten zusammensetzt. Zum einen gibt es durch die vorliegende Membranspannung ($\Delta\Psi$) einen elektrischen Anteil, der die Energie darstellt, die ein Teilchen beim Durchqueren des elektrischen Feldes aufnimmt.

Da es sich dabei um viele Teilchen handelt, werden etwa $6,022 \cdot 10^{23}$ Teilchen zu einem *mol* zusammengefasst (Avogadro-Konstante, N_A) und die Energie pro mol Teilchen bestimmt. Ein Proton ist einfach geladen, kann also eine sogenannte Elementarladung ($e = 1,602176462 \cdot 10^{-19}C$) transportieren¹:

$$\mu_{Elek} = N_A \cdot e \cdot \Psi$$

Zum anderen wirkt durch den Konzentrationsunterschied an beiden Seiten der Membran das Bestreben der Teilchen, diesen durch Diffusion auszugleichen (diffusibler Anteil):²

$$\mu_{Diff} = R \cdot T \cdot \ln \frac{\text{Konzentration}_{\text{innen}}}{\text{Konzentration}_{\text{au\ss en}}}$$

Diese Energie ist somit nicht nur konzentrations- sondern auch temperaturabhängig. D.h. bei geringerer Temperatur sind die Teilchen träger und ihr Bestreben zur anderen Seite zu diffundieren lässt geringfügig nach. Da die Protonenkonzentration meist in Form des pH-Wertes³ angegeben wird, ist folgende Umformung nützlich:

$$\mu_{Diff} = R \cdot T \cdot 2,303 \cdot \Delta pH_{\text{au\ss en-innen}}$$

Die gesamte Energie, die in dem Konzentrationsgradienten gespeichert ist, ergibt sich aus der Summe dieser beiden Kräfte ($\Delta\mu_{H^+}$) und diese Summe kann auf umgekehrtem Wege in ein dementsprechendes (theoretisches) Feldpotential wieder umgerechnet werden:

$$\Delta P = - \frac{\Delta\mu_{H^+}}{N_A \cdot e}$$

Am besten wird dies an einem Beispiel deutlich. In einer Arbeit von Zilberstein *et al.*[224] wurde bei pH7.2 (entspricht einer äußeren Protonenkonzentration von $[h_e] = 6,3 \cdot 10^{-8}M$) wachsenden Ecoli-Zellen ein innerer pH von 7.8 (entspricht einer inneren Protonenkonzentration von $[h] = 1,6 \cdot 10^{-8}M$) festgestellt und ein Membranpotential $\Delta\Psi$ von -86mV gemessen. In Ruhe ist dieses Potential etwas größer, nämlich -125mV. Daraus resultiert eine elektrische Kraft von -8,3kJ/mol, bzw. -12kJ/mol in Ruhe. Die Kraft aufgrund der Konzentrationsunterschiede ist mit -3.42kJ/mol wesentlich geringer. In der Summe muss beim Transport gegen das Konzentrationsgefälle somit eine Kraft von $\Delta\mu_{H^+} = -11.718kJ/mol$, bzw. im Ruhezustand von ca. -15kJ/mol aufgewendet werden. Dies entspricht einem erhöhtem Feldpotential von -121,26mV bzw. -159,8mV in Ruhe.

3 Erstellung des im 4.Kapitel verwendeten *E.coli*-Modells

Allgemeine Modifikationen

Das von Reed *et al.*[163] veröffentlichte Modell (xls-Datei) wurde geringfügig modifiziert, um biologisch sinnvolle Flussverteilungen, insbesondere bei Verwendung des TR-Kriteriums zu erhalten (ecoliModel.csv). Folgende Modifikationen waren notwendig:

- Entfernen der Sonderzeichen (Ersetzungen: L,D durch LD; D,D durch DD; o2-

¹1J=1C*V

²R=8,314472 J/mol*K, die allgemeine Gaskonstante; T=298,15K, die Temperatur in Kelvin bei 25°C

³pH $\approx -\lg\left(\frac{[H_3O]^+}{mol/dm^3}\right)$

durch o2neg; _EC durch EC und lipa_cold durch lipacold)

- Unterscheidung von zytosolischen Protonen und Protonen, die an der Protonen-delokalisation beteiligt sind
- Entfernen extrazellulär ablaufender Reaktionen und nicht benötigter Transporter
- Hinzufügen der von Henry *et al.*[79] definierten "lumped reactions"
- Hinzufügen der Biomassesynthesegleichung

Im Ecoli-Modell[163] werden 19 putative und 163 Transporter beschrieben (insgesamt: 182), welche für den Austausch von 143 Stoffen benötigt werden. Dabei gibt es Beschränkungen für den Austausch der Stoffe:

Definition der Umgebung

- **Freier Austausch:** co2, fe2, h, h2o, k, na1, nh4, so4, pi
- **Mögliche Aufnahme:** ac, akg, glc-D, lac-D, lac-L, glyc, mal-L, o2, pyr, succ
- **Nur Abgabe:** Die verbleibenden 124 Stoffe können produziert werden.

Entsprechend wurden drei Medien definiert, das einfachste unter ihnen, ein Glucose-Minimalmedium E_{gluc} , mit folgender Zusammensetzung (Konzentrationen nach Henry *et al.*[78]):

Stoff	Konzentration
Phosphat (pi)	0.056M
Sulfat (so4)	0.0030M
Ammonium (nh4)	0.0190M
Natrium (na1)	0.1600M
Kalium (k)	0.022M
Fe ²⁺ (fe2)	0.062M
CO2 (co2)	0.0001M
Sauerstoff (o2)	8.2e-06M
Glucose (glc-D)	0.02M
H+(ext) (h)	1e-7
Wasser (h2o)	1M

Das Medium E_{rich} enthält zusätzlich ac(e), akg(e), glyc(e), lac-D(e), lac-L(e), mal-L(e), pyr(e) und succ(e) jeweils in gleicher Konzentration wie Glucose (0,02M). Das Komplexmedium E_{cplx} enthält die 123 noch zusätzlich austauschbaren Metabolite, jeweils in einer Konzentration von 1M. Der pH-Wert wurde auf einen mittleren Wert von 7.0 gesetzt.

Die Gibbs-Energien wurden aus der Veröffentlichung von Henry *et al.*[78] bezogen. Im Supplement dieser Arbeit werden für das iJR904 Ecoli-Modell geschätzte bzw. berechnete $\Delta_R G^\circ$ -Werte basieren auf einem verbesserten und erweiterten Mavrovouniotis-Algorithmus[96] zur Verfügung gestellt.

Gibbs-Energie

4 Implementierung der Korrelationsmaximierung (5.Kapitel)

Das mpi-Fileformat ist ein relativ altes und umständliches Format, das einige Umformungen zur Aufstellung des hier zu lösenden Optimierungsproblems notwendig macht. Klammern werden nicht unterstützt, weshalb die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten unter Verwendung der Variablen “zaehler” und “nenner” aufgesplittet und, sofern möglich, die Konstanten entsprechend aufbereitet werden; die Differenz aus Enzymkonzentrationsänderung und dem Mittelwert aller Enzymkonzentrationen $\Delta E_i - \Delta E_{av}$ wird beispielsweise durch die Konstanten c_i ausgedrückt und s repräsentiert die Summe der Quadrate dieser c_i . Für drei rMFMs: $M_1 (v_{11}, v_{21}, v_{31})$, $M_2 (v_{12}, v_{22}, v_{32})$, und $M_3 (v_{13}, v_{23}, v_{33})$, und drei Enzymkonzentrationsänderungen mit c_1, c_2, c_3 , lautet die Umformung somit wie folgt:

$$zaehler - c_1 dv_1 r - c_2 dv_2 r - c_3 dv_3 r = 0 \quad (3)$$

$$nenner - s dv_1 r^2 - s dv_2 r^2 - s dv_3 r^2 = 0 \quad (4)$$

wobei

$$dv_1 r - dv_1 + dv_{av} = 0 \quad (5)$$

$$dv_2 r - dv_2 + dv_{av} = 0 \quad (6)$$

$$dv_3 r - dv_3 + dv_{av} = 0 \quad (7)$$

mit dem Durchschnitt der Flussänderungen als

$$3dv_{av} - dv_1 - dv_2 - dv_3 = 0 \quad (8)$$

Die Linearkombination der Flussdifferenzen ergibt sich dann als:

$$dv_1 - da_1 v_{11} - da_2 v_{12} - da_3 v_{13} = 0 \quad (9)$$

$$dv_2 - da_1 v_{21} - da_2 v_{22} - da_3 v_{23} = 0 \quad (10)$$

$$dv_3 - da_1 v_{31} - da_2 v_{32} - da_3 v_{33} = 0 \quad (11)$$

nicht zu vergessen

$$da_1^2 + da_2^2 + da_3^2 = 1 \quad (12)$$

Die Optimierungsfunktion lautet dann:

$$\max \quad zaehler / \sqrt{nenner} \quad (13)$$

Wenn mindestens die Hälfte der NichtNull-MinModenflüsse negativ sind wird die Reaktion gedreht, d.h. alle Flüsse mit $w=-1$ multipliziert.

Das Optimierungsproblem im mpi-Format

Im mpi-Format lässt sich dieses quadratische Optimierungsproblem wie folgt ausdrücken (“!” leitet Kommentare ein):

```

BEGINMODEL correlation
!NumObjs
!NumCons
!NumVars

VARIABLES
!Name c_low s_m c_high Type
zaehler -1e+030 0 1e+030 C
nenner -1e+030 0 1e+030 C
dvav -1e+030 0 1e+030 C
da1 -1e+030 0 1e+030 C
da2 -1e+030 0 1e+030 C
da3 -1e+030 0 1e+030 C
dv1 -1e+030 0 1e+030 C
dv2 -1e+030 0 1e+030 C
dv3 -1e+030 0 1e+030 C
dv1r -1e+030 0 1e+030 C
dv2r -1e+030 0 1e+030 C
dv3r -1e+030 0 1e+030 C

OBJECTIVES
!
!Define Objective Function as:
!max zaehler/Wurzel(nenner)
!
OBJ00000 MAXIMIZE
    EP_PUSH_VAR zaehler
    EP_PUSH_VAR nenner
    EP_SQRT
    EP_DIVIDE

CONSTRAINTS
!
!zaehler-c1*dv1r-c2*dv2r-c3*dv3r=0
!
    zaehlerNB E
    EP_PUSH_VAR zaehler
    EP_PUSH_NUM 0.10
    EP_NEGATE
    EP_PUSH_VAR dv1r
    EP_MULTIPLY
    EP_MINUS
    EP_PUSH_NUM 1.63
    EP_PUSH_VAR dv2r
    EP_MULTIPLY
    EP_MINUS
    EP_PUSH_NUM 1.51
    EP_NEGATE
    EP_PUSH_VAR dv3r
    EP_MULTIPLY
    EP_MINUS
!
!nenner-c4*dv1r^2-c4*dv2r^2-c4*dv3r^2=0
!
    nennerNB E
    EP_PUSH_VAR nenner
    EP_PUSH_VAR dv1r
    EP_PUSH_NUM 2
    EP_POWER
    EP_PUSH_NUM 187.2
    EP_MULTIPLY
    EP_MINUS
    EP_PUSH_VAR dv2r
    EP_PUSH_NUM 2
    EP_POWER
    EP_PUSH_NUM 187.2
    EP_MULTIPLY
    EP_MINUS
    EP_PUSH_VAR dv3r
    EP_PUSH_NUM 2
    EP_POWER

    EP_PUSH_NUM 187.2
    EP_MULTIPLY
    EP_MINUS
    EP_PUSH_VAR dv1r
    EP_PUSH_NUM 3
    EP_PUSH_VAR dvav
    EP_MULTIPLY
    EP_PUSH_VAR dv1
    EP_MINUS
    EP_PUSH_VAR dv2
    EP_MINUS
    EP_PUSH_VAR dv3
    EP_MINUS
!
!sum of alpha=1: da1^2+da2^2+da3^2-1=0
!
    daNB E
    EP_PUSH_NUM 1.0
    EP_NEGATE
    EP_PUSH_VAR da1
    EP_PUSH_NUM 2
    EP_POWER
    EP_PLUS
    EP_PUSH_VAR da2
    EP_PUSH_NUM 2
    EP_POWER
    EP_PLUS
    EP_PUSH_VAR da3
    EP_PUSH_NUM 2
    EP_POWER
    EP_PLUS
!
!Define MFM-Linearcombination:
!dv1-da1*v11-da2*v12-da3*v13=0;
!dv2-da1*dv21-da2*v22-da3*v23=0;...
!
    MFMlincomp1NB E
    EP_PUSH_VAR dv1
    EP_PUSH_VAR da1
    EP_PUSH_NUM 1.0
    EP_MULTIPLY
    EP_MINUS
    EP_PUSH_VAR da2

```

```

EP_PUSH_NUM      2.0
EP_MULTIPLY
EP_MINUS
EP_PUSH_VAR      da3
EP_PUSH_NUM      0.0
EP_MULTIPLY
EP_MINUS
MFMincomp2NB E
EP_PUSH_VAR      dv2
EP_PUSH_VAR      da1
EP_PUSH_NUM      0.0
EP_MULTIPLY
EP_MINUS
EP_PUSH_VAR      da2
EP_PUSH_NUM      0.0
EP_MULTIPLY
EP_MINUS
EP_PUSH_VAR      da3
EP_PUSH_NUM      0.333333
EP_NEGATE
EP_MULTIPLY
EP_MINUS
MFMincomp3NB E
EP_PUSH_VAR      dv3
EP_PUSH_VAR      da1
EP_PUSH_NUM      0.0
EP_MULTIPLY
EP_MINUS
EP_PUSH_VAR      da2
EP_PUSH_NUM      0.0
EP_MULTIPLY
EP_MINUS
EP_PUSH_VAR      da3
EP_PUSH_NUM      0.333333
EP_NEGATE
EP_MULTIPLY
EP_MINUS

```

Evt. folgen Vorgaben zu den Austauschflüssen (hier die tatsächlich verwendeten Größen für GR03-RFav):

```

!
!Measured Differences in Exchange Fluxes:
!
!Glucose: dv85+dv96-3.36=0
      ExchangeGlucoseNB E
      EP_PUSH_VAR      dv85
      EP_PUSH_NUM      3.36
      EP_MINUS
!
!Acetate: dv91-0.49=0
      ExchangeAcetateNB E
      EP_PUSH_VAR      dv91
      EP_PUSH_NUM      0.49
      EP_MINUS
!
!DLactate: dv93-0=0
      ExchangeDLactateNB E
      EP_PUSH_VAR      dv93
      EP_PUSH_NUM      0.0
      EP_MINUS
!
!Pyruvate: dv94=0
      ExchangePyruvateNB E
      EP_PUSH_VAR      dv94
      EP_PUSH_NUM      0.0
      EP_MINUS
!
!Formate: dv95=0.13
      ExchangeFormateNB E
      EP_PUSH_VAR      dv95
      EP_PUSH_NUM      0.13
      EP_MINUS

```

ENDMODEL

Zusätzliche Tabellen

Tabelle 2: Zulässige Metabolitkonzentrationsbereiche (hard bounds, siehe 4.Kapitel)

Metabolit	untere Grenze	obere Grenze	Metabolit	untere Grenze	obere Grenze
default	5.00E-06	2.00E-03	g6p	1.00E-05	1.00E-02
co2(e)	1.00E-04	1.00E-04	glu-D	1.00E-04	1.00E-01
fe2(e)	6.20E-02	6.20E-02	glu-L	1.00E-04	1.00E-01
h(e)	1.00E-07	1.00E-07	glyc3p	1.00E-05	1.00E-02
h2o(e)	1.00E-00	1.00E-00	h	2.51E-11	2.51E-04
k(e)	2.20E-02	2.20E-02	h2o	1.00E-00	1.00E-00
na1(e)	1.60E-01	1.60E-01	hco3	1.00E-07	2.50E-02
nh4(e)	1.90E-02	1.90E-02	mal-L	1.00E-05	1.00E-01
pi(e)	5.60E-02	5.60E-02	nh4	1.00E-06	1.00E-02
so4(e)	3.00E-03	3.00E-03	no2	1.00E-07	2.50E-02
glc-D(e)	2.00E-02	2.00E-02	no3	1.00E-07	2.50E-02
o2(e)	8.20E-06	8.20E-06	o2	1.00E-07	1.00E-03
12dgrEC	1.00E-07	1.00E-02	oaa	1.00E-07	1.00E-03
6pgl	1.00E-05	1.00E-02	paEC	1.00E-07	1.00E-02
accoa	1.00E-06	1.00E-02	peEC	1.00E-07	1.00E-02
agpeEC	1.00E-07	1.00E-02	pep	1.00E-06	1.00E-02
akg	1.00E-06	1.00E-02	pgEC	1.00E-07	1.00E-02
apgEC	1.00E-07	1.00E-02	pgpEC	1.00E-07	1.00E-02
asp-L	1.00E-06	1.00E-02	pi	1.00E-04	1.00E-01
cit	1.00E-04	1.00E-01	ppi	1.00E-07	2.50E-02
clpnEC	1.00E-07	1.00E-02	psEC	1.00E-07	1.00E-02
co2	1.00E-03	1.00E-01	pyr	1.00E-06	1.00E-02
dhap	1.00E-06	1.00E-01	r5p	1.00E-06	1.00E-02
f6p	1.00E-05	1.00E-02	so3	1.00E-07	2.50E-02
fdp	1.00E-05	1.00E-02	so4	1.00E-07	2.50E-02
g3p	1.00E-06	1.00E-02	udpg	1.00E-05	1.00E-01

#	Reaktionsgleichung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	I	II	
Formaldehydstoffwechsel																					
1	MeOH + Q → HCHO + QH ₂	2	5	1	1	5	1	6.6	2.8	0.4	4	5.8	3.55	4	3.36	3.6	1	4.09	32.63	23.59	
2	HCHO + H ₄ F → CH ₂ =H ₄ F	1	3	0	1	2	1	2	1	0	2	2	2	2	2	2	0	2	10.23	10.23	
3	CH≡H ₄ F + NADPH ↔ CH ₂ =H ₄ F + NADP	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.19	-0.19	
4	CH≡H ₄ F ↔ CHO-H ₄ F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.19	0.19	
5	HCOOH + H ₄ F + ATP ↔ CHO-H ₄ F + ADP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	HCOOH + NAD → CO ₂ + NADH	1	2	0	0	3	0	4.6	1.8	0.4	2	3.8	1.55	2	1.36	1.6	0	2.09	12.09	13.37	
7	HCHO + H ₄ MPT → CH ₂ =H ₄ MPT	1	2	0	0	3	0	4.6	1.8	0.4	2	3.8	1.55	2	1.36	1.6	0	2.09	12.09	13.37	
8	CH ₂ =H ₄ MPT + NAD → CH≡H ₄ MPT + NADH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1.62	0	
9	CH ₂ =H ₄ MPT + NADP → CH≡H ₄ MPT + NADPH	1	2	0	0	3	0	4.6	1.8	0.4	2	3.8	1.55	1	1.36	1.6	0	2.09	10.47	13.37	
10	CHO-H ₄ MPT ↔ CH≡H ₄ MPT	-1	-2	0	0	-3	0	-4.6	-1.8	-0.4	-2	-3.8	-1.55	-2	-1.36	-1.6	0	-2.09	-12.09	-13.37	
11	HCOOH + H ₄ MPT ↔ CHO-H ₄ MPT	-1	-2	0	0	-3	0	-4.6	-1.8	-0.4	-2	-3.8	-1.55	-2	-1.36	-1.6	0	-2.09	-12.09	-13.37	
Serinzyklus																					
12	Serine + H ₄ F ↔ Glycine + CH ₂ =H ₄ F	-1	-3	0	0	-2	0	-2	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	0	-2	-10	-10	
13	Serine + GlyOx ↔ Glycine + H-Pyruvate	1	3	0	0	2	0	2	2	0	2	2	2	2	2	2	0	2	10.23	10.23	
14	H-Pyruvate + NADH → Glycerate + NAD	0	1	0	0	2	-1	4.4	2.2	0.6	1	3.2	2	2	2	2.4	0	2	11.26	10.23	
15	H-Pyruvate + NADPH → Glycerate + NADP	1	2	0	0	1	-2.4	-0.2	-0.6	1	-1.2	0	0	0	0	-0.4	0	0	-1.02	0	
16	Glycerate + ATP → 2-PG + ADP	1	3	0	0	2	0	2	2	0	2	2	2	2	2	2	0	2	10.23	10.23	
17	PEP ↔ 2-PG	-1	-3	0	0	-1	0	-1	-1	0	-2	-1	-2	-2	-2	-1	0	-1	-9.28	-9.28	
18	PEP + CO ₂ → OAA	1	1	0	1	0	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3.27	1.01	
19	OAA + NADH → Malate + NAD	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1.65	0	
20	Malate + CoA + ATP → Malyl-CoA + ADP	1	3	0	0	2	0	2	2	0	2	2	2	2	2	2	0	2	10.23	10.23	
21	Acetyl-CoA + GlyOx ↔ Malyl-CoA	-1	-3	0	0	-2	0	-2	-2	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	0	-2	-10.23	-10.23	
Zitratzyklus																					
22	Pyruvate + CoA + NAD → Acetyl-CoA + NADH + CO ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
23	Acetyl-CoA + OAA → Cit + CoA	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0.3	
24	Iso-C ↔ Cit	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.3	-0.3	
25	α-KG + CO ₂ + NADPH ↔ Iso-C + NADP	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.3	-0.3	
26	α-KG + CoA + NAD → Succ-CoA + CO ₂ + NADH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
27	Succ + CoA + GTP ↔ Succ-CoA + GDP	0	-1	0	0	-1	0	-1	-1	0	0	-1	-1	0	-1	-1	1	-1	-2.05	-2.77	
28	Succ-CoA → Succ + CoA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.72	0	
29	Succ + FAD ↔ Fum + FADH	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	2.88	2.88	

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Tabelle 3: (Fortsetzung)

#	Reaktionsgleichung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	I	II
30	F _{um} ↔ Malate	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	2.88	2.88
Glucosegenese und Pentose-Phosphat-Weg																				
31	2-PG ↔ 3-PG	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0.95	0.95
32	1,3-DPG + ADP ↔ 3-PG + ATP	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	-1	-0.59	-0.59
33	1,3-DPG + NADH ↔ TP + NAD	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.59	0.59
34	2 TP → Fru-1,6-BP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	Fru-1,6-BP ↔ Fru-6-P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	Fru-6-P ↔ Glc-6-P	0	0	0	0	-1	0	-2	0	0	0	-2	0	0	0	0	0	0	-1.02	-1.02
37	Glc-6-P + NADP ↔ 6-PG + NADPH	0	0	0	0	-1	0	-3	0	0	0	-2	0	0	0	0	0	0	-1.31	-1.31
38	Pento-P + CO ₂ + NADPH ↔ 6-PG + NADP	0	0	0	0	1	0	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1.31	1.31
39	TP + S7P ↔ 2 Pento-P	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.47	0.47
40	TP + S7P ↔ Ery-4-P + Fru-6-P	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	-0.47	-0.47
41	Ery-4-P + Pento-P ↔ TP + Fru-6-P	0	0	0	0	-1	0	-1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	-0.56	-0.56
42	Malate + NAD ↔ Pyruvate + CO ₂ + NADH	0	-2	0	0	-1	0	-1	0	0	0	-1	-1	-2	-1	-1	0	-1	-5.7	-7.35
43	PEP + ADP → Pyruvate + ATP	0	2	0	0	1	0	1	1	0	1	1	2	2	2	1	0	1	6.43	8.08
44	Pyruvate + CO ₂ + ATP ↔ OAA + ADP	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	OAA + GTP ↔ PEP + GDP + CO ₂	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.61	0
PHB-Synthese und Acetyl-CoA-Oxidation																				
46	2 Acetyl-CoA ↔ Acetoac-CoA + CoA	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	4.5	4.5
47	Acetoac-CoA + NADPH → 3HB-CoA + NADP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1.62	1.62
48	3HB-CoA → PHB + CoA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1.62	1.62
49	PHB → 3HB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	Acetoac + NADH ↔ 3HB + NAD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	Acetoac-CoA + Succ ↔ Acetoac + Succ-CoA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	Crot-CoA ↔ 3HB-CoA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	L3HB-CoA ↔ Crot-CoA	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	2.88	2.88
54	Acetoac-CoA + NADH → L3HB-CoA + NAD	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	2.88	2.88
55	Crot-CoA + NADPH ↔ But-CoA + NADP	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	2.88	2.88
56	But-CoA + NAD → Prop-CoA + CO ₂ + NADH	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	2.88	2.88
57	Mema-CoA + ADP ↔ Prop-CoA + ATP + CO ₂	0	-1	0	0	-1	0	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-2.88	-2.88
58	Mema-CoA ↔ Succ-CoA	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	2.88	2.88
Energiestoffwechsel																				
59	NADH + Q ↔ NAD + QH ₂ + 2 H	0	-1	0	0	-1	1	-1.8	-0.4	-0.2	0	-1.4	-0.91	-1	-1.27	-0.8	0	-0.82	-4.72	-2.16
60	QH ₂ ↔ Q + 2 H	2	5	1	1	5	2	5.8	3.4	0.2	5	5.4	3.64	3	3.09	3.8	1	4.27	30.78	24.31
61	FADH-S + Q ↔ FAD-S + QH ₂	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	2.88	2.88
62	ADP + 2 H ↔ ATP	2	4	1	1	4	3	4	3	0	5	4	3	2	2	3	1	4	26.26	23.29
63	GDP + ATP ↔ GTP + ADP	0	-1	0	1	-1	3	-1	-1	0	0	-1	-1	0	-1	-1	1	-1	-1.44	-2.77
64	NADH + NADP + H → NADPH + NAD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.55	0	-0.36	0	0	-1.09	-0.41	-2.28
Serin-Biosynthese																				

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Tabelle 3: (Fortsetzung)

#	Reaktionsgleichung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	1	II
65	PHP + NADH ↔ 3-PG + NAD	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	-0.36	-0.36
66	α-KG + 3-Pser ↔ PHP + Glu	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	-0.36	-0.36
67	3-Pser ↔ Serine	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.36	0.36
68	α-KG + NADPH → Glu + NADP	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.36	0.36
Austauschreaktionen																				
69	CO ₂ (out) → CO ₂	0	0	0	0	-1	0	-0.6	-0.8	-0.4	0	-0.8	-0.55	0	-0.36	-0.6	0	-1.09	-4.77	-6.05
70	Formate(out) → Formate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71	Glycine(out) → Glycine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	HCHO(out) → HCHO	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	-10.31	0
73	Pyruvate(out) → Pyruvate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74	Serine(out) → Serine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75	MeOH(out) → MeOH	2	5	1	1	5	1	6.6	2.8	0.4	4	5.8	3.55	4	3.36	3.6	1	4.09	32.63	23.59
76	Succ(out) → Succ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Austauschreaktionen mit Biosynthesewegen außerhalb der Systemgrenzen																				
77	glycine → glycine_biomass	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.23	0.23
78	ATP → ATP_biomass + ADP	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10.2	10.2
79	NADPH → NADPH_biomass + NAD	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4.1	4.1
80	Succ-CoA → Succ-CoA_biomass + Succ + CoA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.12	0.12
81	Acetyl-CoA → Acetyl-CoA_biomass + CoA	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.93	0.93
82	CH ₂ =H ₄ F → CH ₂ =H ₄ F_biomass + H ₄ F	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03	0.03
83	CHO-H ₄ F → CHO-H ₄ F_biomass + H ₄ F	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.19	0.19
84	pyruvate → pyruvate_biomass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.73	0.73
85	serine → serine_biomass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.13	0.13
86	PEP → PEP_biomass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.19	0.19
87	OAA → OAA_biomass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.72	0.72
88	α-KG → α-KG_biomass	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0.3
89	TP → TP_biomass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.03	0.03
90	Glc-6-P → Glc-6-P_biomass	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.29	0.29
91	Pento-P → Pento-P_biomass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.18	0.18
92	Ery-4-P → Ery-4-P_biomass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.09	0.09
93	PHB → PHB_biomass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1.62	1.62

Tabelle 3: Berechnete MinModen im Zentralstoffwechselmodell von *Methylobacterium extorquens* (Kapitel 2). Die letzten zwei Spalten geben die Vorhersagen der MinModen-Kombination (I) und der globalen Optimierung (II) für die Biomassessynthese wieder.

Tabelle 4: Notwendige Änderungen und Anpassungen des Modells von Schütz et al. Die erste Zeile gibt jeweils die Reaktionsgleichung im erweiterten Ecoli-Modell an, die zweite entspricht der Formulierung im Schütz-Modell, bzw. in der 3. Zeile, der im Feist-Modell.

RID	Name	Reaktionsgleichung	$\Delta G \frac{kJ}{mol}$
49	MDH2	mal-L+q8→q8h2+oaa	-45,67
49	mqo	mal-L+q→qh2+oaa	
MDH2	Malate dehydrogenase (mit q8)	mal-L+q8→q8h2+oaa	-45,67
MDH3	Malate dehydrogenase (mit mqn8)	mal-L+mqn8→mql8+oaa	-64,53
Für Reaktion 49 gäbe es im großen Ecoli-Modell eine weitere Reaktion, welche durch das Genprodukt von mqo katalysiert wird und mit Menaquinone 8 (mqn8) als Elektronenakzeptor arbeitet (MDH3). Da ich im kleinen Modell mich aber auf das Ubiquinonsystem beschränke, wird MDH3 hier vernachlässigt.			
43	FRD2	succ+q8←fum+q8h2	-8,8
62	SUCDi	succ+q8→fum+q8h2	-8,8
43,44	frdABCD,sdhAB	succ↔fum+fadh	
62	sdhABCD	succ+q↔fum+qh2	
63	sdhABCD	fadh+q↔fum+qh2	
FRD3	fumarate reductase	2dmmql8+fum→2dmmq8+succ	21,37
FRD2	fumarate reductase	fum+mql8→mqn8+succ	27,65
SUCDi	succinate dehydrogenase (irrev.)	q8+succ→fum+q8h2	-8,8
Die Reaktionen 43,44 und 63 im Schütz-Modell setzen, ebenso wie Reaktion 62, Succinat zu Fumarat um. Allerdings verwendet die Fumaratreductase dabei andere Komplexe der Atmungskette als die Succinat-Dehydrogenase. Da im kleinen Ecoli-Modell nur ein Komplex der Atmungskette verwendet werden soll (Ubiquinon) sind die Reaktionen bei entsprechender Zusammenfassung (d.h. ohne fadh) stöchiometrisch äquivalent. Reaktion 43 wird deshalb entfernt. Da dieses Enzym lediglich unter anaeroben Bedingungen exprimiert wird[27] dürfte das unter den verwendeten Bedingungen okay sein. In anderen Reaktionen, die ebenfalls mit fadh arbeiten, wie LDH_D2 (80) wird fadh ebenfalls durch eine direkte Interaktion mit dem Ubichinonsystem ersetzt.			
66	FDH4pp+FORtppi	for+hp+h+q8→co2+h(e)+q8h2	-74,2
66,67,68	fdhF,fdoGHI,fdnGHI	for→co2+nadh	
57	ndh	nadh+q→qh2	
FHL	Formate-hydrogen lyase	for+h→co2+h2	21,37
FDH4pp	Format dehydrogenase (mit q8)	for[p]+(2)h+q8→co2+h[p]+q8h2	-85,9
FDH5pp	Format Dehydrogenase (mit mqn8)	for[p]+(2)h+mqn8→co2+h[p]+mql8	-104,75
FORtppi	Formatdiffusion	for[c]→for[p]	0,0
Im Schütz-Modell wird der Wasserstoff, der bei der vollständigen Verbrennung von Format zu CO2 frei wird zunächst auf nad übertragen. Laut Berrios-Rivera et al.[16] gibt es eine native nad-abhängige Format-Dehydrogenase jedoch nicht. Die Reaktion wird deshalb analog zum großen Ecoli-Modell direkt an den im Modell enthaltenen Komplex der Atmungskette und den Protonengradienten gekoppelt. Der $\Delta_R G^\circ$ -Wert dieser Reaktion entspricht dann dem von FDH4pp plus dem Energieaufwand pro transloziertem Proton von 11,7kJ, insgesamt also -74,2kJ/mol. Zusätzlich wird die Diffusion von Format ins Periplasma integriert (FDH4pp+FORtppi)			
53	THD2pp	(2)h(e)+nadh+nadp→(2)h+nad+nadph	-22,14
53	pntAB	NADH+Hxt→NADPH	
THD2pp	NAD(P) transhydrogenase	(2)h[p]+nadh+nadp→(2)h+nad+nadph	1,26
Die Stöchiometrie wurde von Feist übernommen. Die Pumpaktivität scheint nicht umstritten[149], einen Beleg für die Festsetzung auf 2 gepumpte Protonen wird bei Feist et al. jedoch nicht angegeben.			
55	ATPS4rpp	(3)h(e)+adp+pi+hp→atp+(3)h+h2o	-7,45
55	atp	(4)Hxt→atp	
ATPS4rpp	ATP synthase	adp+(4)h[p]+pi→atp+(3)h+h2o	27,65

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Tabelle 4: (Fortsetzung)

RID	Name	Reaktionsgleichung	$\Delta G \frac{kJ}{mol}$
Im Feist-Modell fließt ein Proton direkt in die Reaktion ein, drei weitere werden gepumpt, belegt durch entsprechende Referenzen im Supplement von Feist et al.			
56	NADH16pp	$nadh+hp+q8+(3)h \rightarrow q8h2+(3)h(e)+nad$	-37,81
56	nao	$NADH+Q \rightarrow QH2+(4)Hxt$	
NADH16	NADH dehydrogenase (ubiquinone-8)	$(4)h+nadh+q8 \rightarrow (3)h[p]+nad+q8h2$	-72,91
Die Stöchiometrie wurde von Feist übernommen, allerdings scheint die genaue Anzahl an gepumpten Protonen noch immer kontrovers. Dies ist somit nur eine mögliche Definition. Weitere Informationen gibt es im Supplement von Feist et al. und Maliniemi et al.[126]. Allerdings wurde berichtet, dass diese NADH Dehydrogenase I (nuo-Gene) essentiell für die Menaquinon-abhängige Fumaratatmung, sowie die DMSO-Atmung ist, wohingegen NADH Dehydrogenase II (ndh-Gene, Reaktion 57) für die Ubiquinolabhängige aerobe Atmung eine wichtigere Rolle spielt[202]. Die Reaktion wird aber dennoch ins Modell aufgenommen.			
84	MGSA+GLYOX3	$dhap+h2o \rightarrow lac-D+(2)hp+pi$	-113,97
84	mgsA	$dhap \rightarrow lac-D$	
63	sdhABCD	$fadh+q8 \leftrightarrow fum+q8h2$	
MGSA	methylglyoxal synthase	$dhap \rightarrow h+mthgx1+pi$	-47,77
GLYOX3	glyoxalase III	$h2o+mthgx1 \rightarrow h+lac-D$	-66,20
Die Reaktionen MGSA und GLYOX3 des Glyoxalasesystems zur Entgiftung von Methylglyoxalat, welches in E.coli durch die Methylglyoxalatsynthase aus Dihydroxyacetone phosphate (dhap) gebildet wird, werden im Schütz-Modell zusammengefasst. Da in dieser Zusammenfassung das verwendete Glutathion gleichzeitig verbraucht und wieder recycled wird, wird es in der stöchiometrischen Gleichung vernachlässigt (ebenso wie Methylglyoxalat). Es wird somit angenommen, dass Glutathion immer ausreichend vorhanden ist. Der Delta-G-Wert dieser Reaktion ergibt sich als Summe beider Einzelreaktionen.			
96	GLCabcpp	$glc-D(e)+atp+h2o \rightarrow glc-D+adp+hp+pi$	-27,65
96	mglABC	$GLCxt+Hxt \rightarrow GLC$	
GLCabcpp	D-glucose transport via ABC system	$atp+glc-D[p]+h2o \rightarrow glc-D+adp$	-27,65
Hier wird die ausführliche Variante des ABC-Transporters mit atp aus dem Feist-Modell übernommen. Diese Reaktion ist allerdings nur bei sehr geringen Glucosekonzentrationen (im μM -Bereich) aktiv, wenn die Affinität des PTS-Systems (sonst Haupttransporter) nicht mehr ausreicht[57]			

Tabelle 5: Überarbeitete Genzuordnung des Modells von Schütz et al. Fettgedruckt ist jeweils die final verwendete Zuordnung.

Rid	Genverknüpfungen bzw. Bemerkung
10	gpmM or ytjC=gpmB or gpmA
Schütz	gpmA, ytjC, gpmB
Feist	gpmM or ytjC or gpmA
	Die Bezeichnung ytjC ist Synonym zu gpmB (vermutlich ein Tippfehler im Schütz-Modell).
17	maeA=sfcA
Schütz	sfcA
Feist	maeA
	Die Bezeichnung sfcA ist synonym zu maeA.
27	rpe
Schütz	rpe
Feist	sgcE or rpe
	Die Funktion des sgcE-Gens ist noch nicht nachgewiesen, weshalb es hier nicht berücksichtigt wird.
34	gltA or prpC

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 5: (Fortsetzung)

Rid	Genverknüpfungen bzw. Bemerkung
Schütz Feist	gltA, prpC gltA
	Das Gen prpC kodiert für eine Methylcitrat-Synthase mit geringer Citrat-Synthase-Aktivität. Das Enzym unterscheidet sich grundlegend von der gltA-kodierten Citrat-Synthase und wird bei Wachstum auf Propionat induziert, um im Propionatstoffwechsel eine Reaktion im Methylcitratzyklus zu katalysieren.
51 Schütz Feist	aceB or glcB aceB aceB or glcB
	Die Produkte beider Gene sind bekannt als Malat Synthase - die ODER Beziehung wurde durch Doppel-knockoutexperimente nachgewiesen.
54 Schütz Feist	sthA=udhA or (pntB and pntA) udhA sthA or (pntB and pntA)
	Es gibt eine Membranständige Transhydrogenase, die den Protonengradient nutzt, um den Wasserstoff von nadh auf nadph zu übertragen (pntA/pntB), und eine lösliche, die die Wasserstoffübertragung von nadph nach nadh ohne zusätzlichen, energetischen Aufwand katalysiert (sthA synonym zu udhA). Die Reaktion 54 beschreibt die Umwandlung ohne Verwendung des Protonengradienten. Bei der Genzuordnung gehen wir (analog zu Feist et al.) davon aus, dass das membranständige Enzym in umgekehrter Richtung ohne Aufbau eines Protonengradienten arbeiten kann und somit das Genprodukt von udhA ersetzen kann.
55 Schütz Feist	((atpF and atpE and atpB) and (atpC and atpD and atpG and atpA and atpH)) or ((atpF and atpE and atpB) and (atpC and atpD and atpG and atpA and atpH) and atpI) atp ((atpF and atpE and atpB) and (atpC and atpD and atpG and atpA and atpH)) or ((atpF and atpE and atpB) and (atpC and atpD and atpG and atpA and atpH) and atpI)
	Die möglichen Zusammensetzungen der ATPase Untereinheiten wurden aus dem Feist-Modell (ohne weiteren Check) übernommen.
56 Schütz Feist	nuoN and nuoM and nuoL and nuoK and nuoJ and nuoI and nuoH and nuoG and nuoF and nuoE and nuoC and nuoB and nuoA nuo nuoN and nuoM and nuoL and nuoK and nuoJ and nuoI and nuoH and nuoG and nuoF and nuoE and nuoC and nuoB and nuoA
	Die möglichen Zusammensetzungen der NADH-Dehydrogenase-Untereinheiten wurden aus dem Feist-Modell (ohne weiteren Check) übernommen.
59 Schütz Feist	(appC and appB) or (cydA and cydB) cydAB (appC and appB) or (cydA and cydB)
	Für die Katalyse der Reaktion 59 gibt es 2 Isoenzyme, I und II, kodiert durch das Zusammenspiel von jeweils zwei Genen.
60 Schütz Feist	(narV and narW and narY and narZ) or (narG and narH and narJ and narI) narGHI (narV and narW and narY and narZ) or (narG and narH and narJ and narI)
	Hier wurde die vollständigere Variante aus dem Modell von Feist <i>et al.</i> übernommen.
64 Schütz Feist	((pflA and pflB) and yfiD) or (pflA and pflB) or (pflA and tdcE) or (pflD and pflC) pflB, tdcE ((pflA and pflB) and yfiD) or (pflA and pflB) or (pflA and tdcE) or (pflD and pflC)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 5: (Fortsetzung)

Rid	Genverknüpfungen bzw. Bemerkung
	Das Genprodukt pflB ist eine inaktive Pyruvat-Format-Lyase, die durch das Genprodukt von pflA (vermutlich durch Radikalbildung) aktiviert wird; das Gen yfiD kodiert für eine stressinduzierte alternative Pyruvat-Format-Lyase-Untereinheit, die die Pyruvat-Format-Lyase nach oxidativem Stress wieder reaktivieren kann. PflC und pflD kodieren, so vermutet man (putative), für ein zweites Isoenzym. Die Angaben von Feist <i>et al.</i> wurden vollständig übernommen, wenn auch die Definition der ersten Klammer zu überprüfen bleibt.
71	adhC=frmA or adhP or adhE)
Schütz	adhE, adhP, adhC
Feist	frmA or adhP or adhE
	Die Bezeichnung frmA ist synonym zu adhC.
74	eutD or pta
Schütz	pta
Feist	eutD or pta
	Das Gen eutD kodiert für eine Phosphotransacetylase Untereinheit, die - zumindest für die eng verwandte Salmonellaspezies das Genprodukt von pta ersetzen kann [22].
75	tdcD or ackA or purT
Schütz	ackA, ackB, tdcD, purT
Feist	tdcD or ackA or purT
	Die Verknüpfung des Gens ackB mit ackA durch UND oder ODER ist nicht bekannt - ackB wird deshalb vorerst vernachlässigt.
81	ldhA
Schütz	ldhA
Feist	dld or ldhA
	Das dld Gen kodiert für eine NAD-unabhängige Lactat-Dehydrogenase, welche meist irreversibel lactat in pyruvat umsetzt. Im Model wird zwischen den Umsetzungen dieser Genprodukte unterschieden und der eine separate Reaktion für dld definiert (80).
84	mgsA
Schütz	mgsA
Feist	mgsA
	Da für die Glyoxalase III noch kein Gen bekannt zu sein scheint, wird hier lediglich das Gen für das erste Enzym (mgsA) referenziert.
85	(crr and ptsG and ptsH and ptsI) or (manX and manY and manZ and ptsH and ptsI) or (crr and malX and ptsH and ptsI)
Schütz	ptsG/H/I
Feist	(crr and ptsG and ptsH and ptsI) or (manX and manY and manZ and ptsH and ptsI) or (crr and malX and ptsH and ptsI)
	Die erste Klammer beschreibt das Glucose-spezifische PTS-System, die zweite Klammer das für Mannose und die dritte Klammer das für Maltose. Die beiden letzteren sind nach ebenfalls in der Lage Glucose zu transportieren[168].
86	phoE or ompF or ompN or ompC
Schütz	transport
Feist	phoE or ompF or ompN or ompC
	Die Gene kodieren für (vermutlich unspezifische) Porenproteine der äußeren Membran. Es kann sein, dass es noch Gene gibt, die spezifisch für den jeweiligen Transport sind.

Tabelle 6: Reaktionsschema des Gesamtmodells (3.Kapitel)

RID	Name	Reaktionsgleichung	K_{eq}	ΔG_{mol}^{kJ}
1	HEX1	[c]glc-D + atp* → g6p + adp* + hp*	616	-15,9
2	PGI	[c]g6p ⇌ f6p	4	-3,4
3	PFK	[c]f6p + atp* → fdp + adp* + hp*	616	-15,9
5	FBA*	[c]dhap + g3p ⇌ fdp	1211	-17,6
7	TPI*	[c]g3p ⇌ dhap	11	-5,9
8	GAPD	[c]g3p + nad* + pi* ⇌ hp* + nadh* + 13dpg	1	-0,4
9	PGK*	[c]13dpg + adp* ⇌ 3pg + atp*	114	-11,7
10	PGM*	[c]3pg ⇌ 2pg	1	0,0
12	ENO	[c]2pg ⇌ pep + h2o*	5	-3,8
13	PYK	[c]pep + adp* + hp* → pyr + atp*	7771	-22,2
15	PDH	[c]pyr + coa* + nad* → accoa + co2* + nadh*	1.2E+06	-34,8
16	ME2*	[c]pyr + nadph* + co2* ← mal-L + nadp*	15	-6,7
17	ME1*	[c]pyr + nadh* + co2* ← mal-L + nad*	9	-5,4
18	PPCK*	[c]pep + co2* + adp* ← oaa + atp*	1	-0,8
19	FBP	[c]fdp + h2o* → f6p + pi*	114	-11,7
21	PPS	[c]pyr + atp* + h2o* → pep + amp* + (2) hp* + pi*	8	-5,0
22	G6PDH2r	[c]g6p + nadp* ⇌ 6pgl + nadph* + hp*	15	-6,7
23	PGL	[c]6pgl + h2o* → 6pgc + hp*	5542	-21,4
24	GND*	[c] nadph* + co2* + ru5p-D ← 6pgc + nadp*	5	-3,8
25	RPI*	[c]ru5p-D ⇌ r5p	2	-2,1
27	RPE	[c]ru5p-D ⇌ xu5p-D	1	0,0
28	TKT1*	[c]g3p + s7p ⇌ r5p + xu5p-D	25	-8,0
30	TKT2	[c]xu5p-D + e4p ⇌ f6p + g3p	18	-7,1
32	TALA	[c]g3p + s7p ⇌ e4p + f6p	18	-7,1
34	CS	[c]accoa + oaa + h2o* → coa* + cit + hp*	2.1E+06	-36,0
36	ACONTa*	[c]acon-C + h2o* ⇌ cit	13	-6,3
37	ACONTb	[c]acon-C + h2o* ⇌ icit	1	-0,8
40	ICDHyr*	[c]co2* + nadph* + akg ⇌ icit + nadp*	313	-14,2
41	AKGDH	[c]akg + coa* + nad* → co2* + nadh* + succoa	1.2E+06	-34,8
42	SUCOAS	[c]atp* + coa* + succ ⇌ succoa + adp* + pi*	5	-4,2
45	FUM	[c]fum + h2o* ⇌ mal-L	3	-2,5
48	MDH*	[c]nadh* + oaa + hp* ⇌ mal-L + nad*	49883	-26,8
49	MDH2	[c]mal-L + q8 → q8h2 + oaa	1.0E+08	-45,7
50	ICL*	[c]glx + succ ⇌ icit	3952	-20,5
51	MALS	[c]glx + accoa + h2o* → mal-L + coa* + hp*	2.4E+06	-36,5
52	PPC	[c]pep + co2* + h2o* → oaa + pi* + hp*	98079	-28,5
53	THD2pp*	nadh[c] + (2) h[e] + nadp[c] → nadph[c] + (2) h[c] + nad[c]	7573	-22,1
54	NADTRHD	[c]nadph + nad → nadh + nadp	2	-1,3
55	ATPS4rpp*	(3) h[e] + adp[c] + pi[c]* + hp*[c] → atp[c] + (3) h[c] + h2o[c]*	20	-7,4
56	NADH16pp	nadh[c] + hp*[c] + q8[c] + (3) h[c] → q8h2[c] + (3) h[e] + nad[c]	4.2E+06	-37,8
57	NADH5	[c]nadh + q8 + hp* → q8h2 + nad	5.9E+12	-72,9
58	CYTBO3_4pp	(2) q8h2[c] + (1) o2[c] + (8) h[c] → (2) q8[c] + (8) h[e] + (2) h2o[c]*	8.1E+10	-62,3
59	CYTBDpp	(2) q8h2[c] + (1) o2[c] + (4) h[c] → (2) q8[c] + (4) h[e] + (2) h2o[c]*	1.3E+19	-109,1
60	NO3R1pp	q8h2[c] + no3[c] + (2) h[c] → q8[c] + no2[c] + (2) h[e] + h2o[c]*	6.6E+08	-50,3
61	POX	[c]pyr + q8 + h2o* → ac + q8h2 + co2*	1.0E+24	-137,0
62	SUCDi	[c]succ + q8 → fum + q8h2	35	-8,8
64	PFL	[c]pyr + coa* ⇌ accoa + for	5542	-21,4
66	FDH4pp,FORTppi	for[c] + hp*[c] + h[c] + q8[c] → co2[c] + h[e] + q8h2[c]	1.0E+13	-74,2
69	ACALD	[c]acald + coa* + nad* ⇌ accoa + nadh* + hp*	1698	-18,4
71	ALCD2x*	[c]acald + nadh* + hp* ⇌ etoh + nad*	25371	-25,1
74	PTAr*	[c]actp + coa* ← accoa + pi*	616	-15,9
75	ACKr*	[c]actp + adp* ⇌ atp* + ac	1434	-18,0
79	ACS	[c]ac + atp* + coa* → accoa + amp* + ppi	5	-3,8
80	LDH_D2	[c]lac-D + q8* → pyr + q8h2*	1.0E+08	-45,7
81	LDH_D*	[c]nadh* + pyr + hp* ⇌ lac-D + nad*	49883	-26,8
82	EDD	[c]6pgc → 2ddg6p + h2o*	1.2E+06	-34,8
83	EDA*	[c]g3p + pyr ← 2ddg6p	3	-2,9
84	MGSA, GLYOX3	[c]dhap + h2o* → lac-D + (2) hp* + pi*	9.3E+19	-114,0
85	GLCptspp	glc-D[e] + pep[c] → g6p[c] + pyr[c]	4.8E+06	-38,1
86	CO2tex*	co2[c] → co2[e]	1	0,0
87	O2tex	o2[e] → o2[c]	1	0,0
88	NO3tex*	no3[e] → no3[c]	1	0,0

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 6: (Fortsetzung)

RID	Name	Reaktionsgleichung	K_{eq}	$\Delta G \frac{kJ}{mol}$
89	NO2tex*	no2[c] → no2[e]	1	0,0
90	ETOHtex*	etoh[c] ⇌ etoh[e]	1	0,0
91	ACtex*	ac[c] ⇌ ac[e]	1	0,0
92	SUCCtex*	succ[c] → succ[e]	1	0,0
93	D-LACTtex*	lac-D[c] → lac-D[e]	1	0,0
94	PYRtex*	pyr[c] → pyr[e]	1	0,0
95	FORtex*	for[c] → for[e]	1	0,0
96	GLCabcpp	glc-D[e] + atp[c]* + h2o[c]* → glc-D[c] + adp[c]* + hp[c]* + pi[c]*	69946	-27,7
97	ATPM	atp[c] + h2o[c]* → atpEnergy[e] + adp[c] + hp[c]* + pi[c]*	69946	-27,7
113	ADK1	[c]amp + atp ⇌ (2) adp	1	-0,4
114	PPA	[c]h2o* + ppi → hp* + (2) pi	5542	-21,4
115	Plt2rpp	h[e] + pi[e] ⇌ h[c] + pi[c]	112	-11,7
116	L-LACD2	[c]lac-L + q8 → pyr + q8h2	1.0E+08	-45,7
117	L-LACTtex*	lac-L[c] → lac-L[e]	1	0,0

Tabelle 7: Metabolite im Gesamtmodell (4.Kapitel)

cID	Konz.Klasse	Summenformel	Name
2ddg6p	default	C6H9O9P	2-Dehydro-3-deoxy-D-gluconate 6-phosphate
2pg	2pg	C3H5O7P	D-Glycerate 2-phosphate
3pg	3pg	C3H5O7P	3-Phosphoglycerate
6pgc	6pgc	C6H11O10P	6-Phosphogluconate
6pgl	6pgl	C6H10O9P	6-phospho-D-glucono-1,5-lactone
13dpg	13dpg	C3H6O10P2	3-Phospho-D-glyceroyl phosphate
ac	default	C2H3O2	Acetate
acald	default	C2H4O	Acetaldehyde
accoa	accoa	C23H35N7O17P3S	Acetyl-CoA
acon-C	acon_C	C6H3O6	cis-Aconitate
actp	actp	C2H4O5P	Acetyl phosphate
adp	adp	C10H13N5O10P2	Adenosindiphosphat
akg	akg	C5H4O5	2-Oxoglutarate
amp	amp	C10H13N5O7P	Adenosinmonophosphat
atp	atp	C10H13N5O13P3	Adenosintriphosphat
atpEnergy	constant		Energieäquivalent (virtuell)
cit	cit	C6H5O7	Citrate
co2	co2	CO2	Kohlenstoffdioxid
coa	coa	C21H33N7O16P3S	Coenzym-A
dhap	dhap	C3H6O6P	Dihydroxyacetone phosphate
e4p	e4p	C4H8O7P	D-Erythrose 4-phosphate
etoh	default	C2H6O	Ethanol
f6p	f6p	C6H12O9P	Fructose-6-phosphat
fdp	fdp	C6H12O12P2	D-Fructose 1,6-bisphosphate
for	default	CHO2	Format
fum	fum	C4H2O4	Fumarat
g3p	g3p	C3H6O6P	Glyceraldehyde 3-phosphate
g6p	g6p	C6H12O9P	D-Glucose 6-phosphate
glc-D	glc_D	C6H12O6	D-Glucose
glx	default	C2HO3	Glyoxylate
h	h	H	Wasserstoff (membrangebunden)
h2o	constant	H2O	Wasser
hp	constant	H	Wasserstoff (im Plasma)
icit	default	C6H5O7	Isocitrat
lac-D	lac_D	C3H5O3	D-Lactat
lac-L	lac_L	C3H5O3	L-Lactat
mal-L	mal_L	C4H4O5	L-Malat
nad	nad	C21H26N7O14P2	Nicotinamide adenine dinucleotide
nadh	nadh	C21H27N7O14P2	Nicotinamide adenine dinucleotide - reduced
nadp	nadp	C21H26N7O17P3	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
nadph	nadph	C21H26N7O17P3	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - reduced
no2	default	NO2	Nitrit
no3	default	NO3	Nitrat
o2	o2	O2	Sauerstoff
oaa	oaa	C4H2O5	Oxaloacetat
pep	pep	C3H3O6P	Phosphoenolpyruvate
pi	pi	HO4P	Phosphat
ppi	ppi	H2O7P2	Diphosphat
pyr	pyr	C3H3O3	Pyruvat
q8	default	C49H74O4	Ubiquinone-8
q8h2	default	C49H76O4	Ubiquinol-8
r5p	r5p	C5H10O8P	alpha-D-Ribose 5-phosphate
ru5p-D	ru5p_D	C5H10O8P	D-Ribulose 5-phosphate
s7p	s7p	C7H14O10P	Sedoheptulose 7-phosphate
succ	succ	C4H4O4	Succinat
succoa	succoa	C25H36N7O19P3S	Succinyl-CoA
xu5p-D	xu5p_D	C5H10O8P	D-Xylulose 5-phosphate

Tabelle 8: Genzuweisungen im reduzierten Modell (3.Kapitel, für Details siehe Tab.5).

ID	Name	Stoffwechselffad	Eigene Gen-Zuordnung
1	HEX1	Glycolysis/Gluconeogenesis	glk
2	PGI	Glycolysis/Gluconeogenesis	pgi
3	PFK	Glycolysis/Gluconeogenesis	(pfkA or pfkB)
5	FBA*	Glycolysis/Gluconeogenesis	(fbaB or fbaA or ydjI)
7	TPI*	Glycolysis/Gluconeogenesis	tpiA
8	GAPD	Glycolysis/Gluconeogenesis	gapA
9	PGK*	Glycolysis/Gluconeogenesis	pgk
10	PGM*	Glycolysis/Gluconeogenesis	(gpmM or ytjC or gpmA)
12	ENO	Glycolysis/Gluconeogenesis	eno
13	PYK	Glycolysis/Gluconeogenesis	(pykA or pykF)
15	PDH	Glycolysis/Gluconeogenesis	(aceE and aceF and lpd)
16	ME2*	Anaplerotic Reactions	maeB
17	ME1*	Anaplerotic Reactions	maeA=sfcA
18	PPCK*	Anaplerotic Reactions	pck
22	G6PDH2r	Pentose Phosphate Pathway	zwf
23	PGL	Pentose Phosphate Pathway	pgl
24	GND*	Pentose Phosphate Pathway	gnd
25	RPI*	Pentose Phosphate Pathway	(rpiA or rpiB)
27	RPE	Pentose Phosphate Pathway	rpe
28	TKT1*	Pentose Phosphate Pathway	
30	TKT2	Pentose Phosphate Pathway	
32	TALA	Pentose Phosphate Pathway	(talA or talB)
34	CS	Citric Acid Cycle	(gltA or prpC)
36	ACONTa*	Citric Acid Cycle	(acnA or acnB)
37	ACONTb	Citric Acid Cycle	(acnB or acnA)
40	ICDHyr*	Citric Acid Cycle	icd
41	AKGDH	Citric Acid Cycle	(lpd and sucA and sucB)
42	SUCOAS	Citric Acid Cycle	(sucC and sucD)
45	FUM	Citric Acid Cycle	(fumA or fumB or fumC)
48	MDH*	Citric Acid Cycle	mdh
49	MDH2	Citric Acid Cycle	mgo
50	ICL*	Anaplerotic Reactions	aceA
51	MALS	Anaplerotic Reactions	(aceB or glcB)
52	PPC	Anaplerotic Reactions	ppc
53	THD2pp*	Oxidative Phosphorylation	(pntB and pntA)
54	NADTRHD	Oxidative Phosphorylation	(sthA=udhA or (pntB and pntA))
55	ATPS4rpp*	Oxidative Phosphorylation	((atpF and atpE and atpB) and (atpC and atpD and atpG and atpA and atpH)) or ((atpF and atpE and atpB) and (atpC and atpD and atpG and atpA and atpH) and atpI))
56	NADH16pp	Oxidative Phosphorylation	(nuoN and nuoM and nuoL and nuoK and nuoJ and nuoI and nuoH and nuoG and nuoF and nuoE and nuoC and nuoB and nuoA)
57	NADH5	Oxidative Phosphorylation	ndh
58	CYTBO3_4pp	Oxidative Phosphorylation	(cyoD and cyoC and cyoB and cyoA)
59	CYTBDpp	Oxidative Phosphorylation	((appC and appB) or (cydA and cydB))
62	SUCDi	Oxidative Phosphorylation	(sdhC and sdhD and sdhA and sdhB)
64	PFL	Pyruvate Metabolism	((pflA and pflB) and yfiD) or (pflA and pflB) or (pflA and tdcE) or (pflD and pflC))
66	FDH4pp, FORtppi	Oxidative Phosphorylation	((fdol and fdoH and fdoG) or (fdnG and fdnH and fdnI))
69	ACALD	Pyruvate Metabolism	(adhE or mhpF)
71	ALCD2x*	Pyruvate Metabolism	(adhC=frmA or adhP or adhE)
74	PTAr*	Pyruvate Metabolism	(eutD or pta)
75	ACKr*	Pyruvate Metabolism	(tdcD or ackA or purT)
81	LDH_D*	Pyruvate Metabolism	ldhA
85	GLCptssp	Transport, Inner Membrane	((crr and ptsG and ptsH and ptsI) or (manX and manY and manZ and ptsH and ptsI) or (crr and malX and ptsH and ptsI))
86	CO2tex*	Transport, Outer Membrane Porin	(phoE or ompF or ompN or ompC)
87	O2tex	Transport, Outer Membrane Porin	(phoE or ompF or ompN or ompC)
90	ETOHtex*	Transport, Outer Membrane Porin	(phoE or ompF or ompN or ompC)
91	ACTex*	Transport, Outer Membrane Porin	(phoE or ompF or ompN or ompC)
92	SUCtex*	Transport, Outer Membrane Porin	(phoE or ompF or ompN or ompC)
93	D-LACTex*	Transport, Outer Membrane Porin	(phoE or ompF or ompN or ompC)
94	PYRtex*	Transport, Outer Membrane Porin	(phoE or ompF or ompN or ompC)
95	FORtex*	Transport, Outer Membrane Porin	(phoE or ompF or ompN or ompC)

Tabelle 9: Zulässige Konzentrationsbereiche (hard bounds) der definierten Metabolitklassen (3.Kapitel)

Konz.Klasse	untere Grenze	Referenz	obere Grenze	Referenz
default	5.00E-06	[87]	2.00E-03	[87]
constant	1.00E+00		1.00E+00	
6pgl	2.00E-04	[119]	1.00E-03	[119]
accoa	2.79E-05	[93]	1.14E-03	[93]
akg	3.01E-05	[93]	1.00E-03	[119]
cit	1.62E-06	[93]	2.73E-02	[15]
co2	1.00E-05	[131]	1.00E-05	[131]
dhap	1.20E-06	[141]	5.00E-03	[119]
f6p	1.27E-05	[93]	8.84E-04	[93]
fdp	6.59E-06	[93]	1.64E-02	[15]
g3p	1.60E-06	[141]	1.00E-03	[119]
g6p	2.73E-05	[141]	4.00E-03	[119]
glc_D	5.00E-03	[119]	2.50E-02	[119]
mal_L	1.97E-05	[141]	1.00E-02	[119]
o2	1.00E-06	[119]	1.00E-04	[119]
oaa	1.00E-06	[119]	1.00E-04	[119]
pep	1.00E-05	[119]	1.73E-03	[15]
pyr	1.00E-04	[119]	4.78E-04	[93]
r5p	6.10E-06	[141]	1.00E-03	[119]
2pg	7.59E-05	[141]	5.10E-04	[175]
3pg	4.43E-05	[93]	4.95E-03	[15]
13dpg	1.10E-04	[175]	5.80E-04	[175]
xu5p_D	1.00E-06	[175]	1.10E-04	[175]
ru5p_D	8.00E-06	[141]	6.46E-03	[93]
atp	2.00E-04	[93]	1.17E-02	[15]
adp	8.02E-05	[15]	1.21E-03	[93]
nad	2.09E-04	[93]	1.30E-02	[15]
nadp	1.40E-07	[15]	1.85E-04	[93]
nadh	2.30E-06	[141]	8.55E-04	[15]
nadph	8.60E-06	[141]	2.05E-03	[15]
h	1.00E-08	[224]	2.00E-08	[224]
amp	3.16E-05	[15]	1.46E-03	[93]
ppi	2.19E-05	[141]	6.02E-05	[141]
pi	1.00E-03	[119]	2.00E-02	[119]
actp	3.90E-04	[15]	2.80E-03	[15]
lac_D	5.74E-04	[141]	9.53E-04	[141]
coa	6.02E-06	[93]	9.34E-04	[93]
s7p	1.00E-05	[141]	2.69E-03	[93]
6pgc	1.40E-06	[141]	3.85E-03	[15]
e4p	1.40E-06	[141]	5.80E-06	[141]
acon_C	6.00E-07	[141]	1.74E-04	[15]
succoa	3.86E-06	[93]	2.54E-05	[93]
succ	2.92E-05	[93]	2.19E-03	[15]
fum	3.00E-06	[15]	1.06E-02	[15]
lac_L	5.74E-04	[141]	9.53E-04	[141]
lac_L_e	1.00E-40		3.37E-05	[93]
etoh_e	1.00E-40		4.90E-04	[93]
for_e	1.00E-40		4.22E-04	[93]
lac_D_e	1.00E-40		1.05E-05	[93]
no2_e	1.00E-40		1.00E-02	[95]
no3_e	1.00E-40		1.00E-02	[95]
pyr_e	1.00E-40		9.50E-06	[93]
succ_e	1.00E-40		8.14E-05	[93]
ac_e	1.00E-40		3.12E-03	[93]
pi_e	7.00E-02		7.00E-02	[93]
h_e	6.30E-08	[224]	6.30E-08	[224]
o2_e	5.60E-05	≅ 40mmHg [41]	2.22E-04	≅ 157, 5mmHg (Luft)
glc_D_e	2.00E-02		2.00E-02	[93]
co2_e	7.00E-06	≅ 0, 255mmHg (Luft)	8.70E-04	≅ 30mmHg [41]

Tabelle 10: Konzentrationen des Toleranzbereiches (soft bounds) und der Sollwerte aus der Arbeit von Ishii et al. Bei fett abgedruckten Werten entspricht der Toleranzbereich dem zulässigen Konzentrationsbereich (3.Kapitel)

Konz.Klasse	Untere Toleranzgrenze	Sollwert(GR03)	Sollwert(GR04)	Obere Toleranzgrenze
3pg	4.43E-05	1.73E-04	7.89E-04	7.89E-04
6pgc	2.02E-06	3.67E-05	8.98E-06	6.68E-04
accoa	2.79E-05	1.53E-04	3.84E-04	1.14E-03
acon_C	2.94E-06	5.45E-06	5.45E-06	1.01E-05
adp	1.73E-04	3.91E-04	9.65E-04	1.21E-03
akg	3.01E-05	5.78E-05	5.78E-05	1.11E-04
amp	2.20E-04	6.53E-04	1.46E-03	1.46E-03
atp	2.00E-04	3.12E-04	8.28E-04	2.48E-03
cit	1.62E-06	1.22E-05	1.22E-05	9.22E-05
coa	6.02E-06	1.56E-05	6.85E-05	9.34E-04
dhap	2.17E-06	1.19E-04	1.92E-04	2.71E-04
f6p	1.27E-05	2.00E-05	3.21E-05	8.84E-04
fdp	6.59E-06	5.56E-05	5.56E-05	4.69E-04
fum	2.36E-05	5.08E-05	8.88E-05	1.28E-04
g6p	4.90E-05	1.74E-04	6.64E-05	2.95E-03
mal_L	3.35E-05	6.09E-05	1.82E-04	3.41E-04
nad	2.09E-04	4.08E-04	1.37E-03	1.37E-03
nadh	2.45E-05	7.42E-05	7.42E-05	2.24E-04
nadp	2.58E-05	6.88E-05	1.34E-04	1.85E-04
nadph	5.76E-05	9.69E-05	9.69E-05	1.63E-04
pep	1.30E-05	4.77E-05	1.49E-04	2.30E-04
pyr	1.13E-04	2.33E-04	2.69E-04	4.78E-04
r5p	6.83E-06	1.85E-05	7.90E-05	6.92E-04
ru5p_D	4.11E-05	7.10E-05	1.68E-04	6.46E-03
s7p	6.13E-05	1.25E-04	1.98E-04	2.69E-03
succ	2.92E-05	4.75E-05	2.02E-04	2.02E-04
succoa	3.86E-06	6.62E-06	2.23E-05	2.54E-05
ac_e	1.00E-40	1.64E-03	3.12E-03	3.12E-03
etoh_e	1.00E-40	4.90E-04	2.48E-04	4.90E-04
for_e	1.00E-40	4.22E-04	1.29E-04	4.22E-04
lac_D_e	1.00E-40	1.00E-40	6.68E-06	1.05E-05
lac_L_e	1.00E-40	1.00E-40	1.79E-07	3.37E-05
pyr_e	1.00E-40	3.67E-06	9.02E-06	9.50E-06
succ_e	1.00E-40	4.07E-05	1.00E-40	8.14E-05

Zielmetabolit	g6p						nadph										
	$\sum v_i$			v_i			$\sum v_i$			v_i							
	Keq	rev	TR	Fst	TR	max	TR	Fst	TR	min	TR	Fst	TR	max	TR	Fst	
Beschreibung																	
Berücksichtigung der Thermodynamik																	
Optimierungskriterium																	
rID																	
g6p→f6p	-0.29	0	0	1	0	1	0	1	0	-0.29	-0.17	-0.29	-0.3	0.56	-0.18	-0.19	
f6p→g3p	0	0	0.11	1	0.06	1	0.06	1	0	0	0	0	0	0.56	0	0	
g3p→3pg	0.14	0	0.27	2	0.16	2	0.16	2	0	0.14	0.08	0.14	0.15	1.13	0.09	0.09	
3pg→pep	0.14	0	0.27	2	0.16	2	0.16	2	0	0.14	0.08	0.14	0.15	1.13	0.09	0.09	
pep→pyr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
pyr→accoa	0	0	0.27	0	0.16	0	0.16	0	0	0	0.08	0	0	0	0.09	0.09	
pyr→mal-L	0.86	0	0.89	0	0.94	0	0.94	0	0	0	0	0	0	-0.56	0	0	
pyr→mal-L	0.14	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
pep→oaa	-1	0	-0.89	0	-0.94	0	-0.94	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	
g6p→ru5p-D	0.43	0	0.16	0	0.1	0	0.1	0	0	0.43	0.25	0.43	0.44	0	0.27	0.28	
ru5p-D→r5p	0.14	0	0.05	0	0.03	0	0.03	0	0	0.14	0.08	0.14	0.15	0	0.09	0.09	
ru5p-D→xu5p-D	0.29	0	0.11	0	0.06	0	0.06	0	0	0.29	0.17	0.29	0.3	0	0.18	0.19	
r5p+xu5p-D→e4p+f6p	-0.14	0	-0.05	0	-0.03	0	-0.03	0	0	-0.14	-0.08	-0.14	-0.15	0	-0.09	-0.09	
e4p+xu5p-D→g3p+f6p	0.14	0	0.05	0	0.03	0	0.03	0	0	0.14	0.08	0.14	0.15	0	0.09	0.09	
accoa+oaa→akg	0	0	0	0	0.16	0.03	0.16	0.03	0	0	0.08	0	0	0	0.09	0.09	
akg→mal-L	0	0	0	0	0.16	0.03	0.16	0.03	0	0	0.08	0	0	0	0.09	0.09	
41,42,45,62	0	-1	0	0	-0.03	0	-0.03	0	0	-0.08	0	0	0	0.56	-0.09	-0.09	
oaa→mal-L	1	0	0.89	0	1.1	0	1.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
mal-L→oaa	0	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.56	0	0	
pep→oaa	0	0	0.56	0	0.59	0	0.59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
nadh+nap→nadh+nad	0	0	0	0	0	0	0	0	6.5	0	0	0.14	0.11	0.47	0.75	0.34	
nadh+nap→nadh+nad	0	0	0	0	0	0	0	0	6.5	-0.14	-0.42	0	0	0	0	0	
adp→atp	0.86	0	0.45	0	0.68	0	0.68	0	0	0	0	0	0	0	-0.18	0	
nadh+q8→q8h2+nad	0	0	-0.01	0.14	-0.11	0	-0.11	0	2	0	0	0.03	0.13	-0.02	0.04	0	
nadh+q8→q8h2+nad	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.08	0	0	0	0	0	
q8h2+o2→q8+h(e)	0.39	0.25	0.44	0.07	0.57	0.1	0.57	0.1	1	0	0	0	0.02	0.06	0.03	0.07	
q8h2+o2→q8+h(e)	0.11	-0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
pyr→accoa	0	0	0	0	0	0.17	0	0.17	0	0	0	0	0	0	0	0	
for+q8→q8h2+h(e)	0	0	0	0	0	0.17	0	0.17	0	0	0	0	0	0	0	0	
g/c→	1.14	1	1.16	2	1.1	2	1.1	2	2	0.14	0.08	0.14	0.15	0.56	0.09	0.09	
→ co2	0.43	0	0.44	0	0.57	0.24	0.57	0.24	0	0.43	0.5	0.43	0.44	0	0.53	0.57	
o2→	0.5	0	0.44	0.07	0.57	0.1	0.57	0.1	1	0	0	0	0.02	0.06	0.03	0.07	
→ etoh	0	0	0	0	0	0.17	0	0.17	0	0	0	0	0	0	0	0	
→ ac	0	0	0.27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
→ lac-D	0	0	0	1.86	0	1.83	0	1.83	0	0	0	0	0	0	0	0	
→ pyr	0.14	0	0	0.14	0	0	0	0	2	0.14	0	0.14	0.15	1.13	0	0	
→ for	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
→ atpEnergy	0	0	0	1	0	1.03	0	1.03	0	0.14	0.17	0.05	0.15	0.56	0	0.19	
identisch zu				TRs*		TRs*		TRs*					TRs*		TRs*		

Tabelle 14: Minimale Flussmoden (MinModen) der Metabolite g6p und nadph. TRs* bezeichnet die MinMode für das Experiment GR04, TRs für GR03, alle anderen MinModen sind unabhängig vom Experiment. Identische MinModen wurden zusammengefasst (3.Kapitel).

Zielmetabolit	g3p						r5p								
	$\sum_{v_i}^{min}$			v_i			$\sum_{v_i}^{min}$			v_i					
	Keq	rev	TR	Fst	TR	TRs*	Keq	rev	TR	Fst	TRs	TRs*			
Beschreibung															
Optimierungskriterium															
Berücksichtigung der Thermodynamik															
rID															
g6p→f6p	-2	0.44	0.28	1	0.26	1	0	0.6	0.44	1.67	1	0	0.45	1.67	1
f6p→g3p	0	0.49	0.46	1	0.45	1	0	0.12	0.09	1	1	0	0.09	1	1
g3p→3pg	0	0	0.01	1	0	1	0	0	0	1.67	2	0	0	1.67	2
3pg→pep	0	0	0.01	1	0	1	0	0	0	1.67	2	0	0	1.67	2
pep→pyr	0	-0.37	0	0	0	0	0	-0.31	0	0	0	0	0	0	0
pyr→accoa	0	0	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pyr→mal-L	1	0.14	0.54	0	0.55	0	1	0.57	0.91	0	0	0	0.91	0	0
pyr→mat-L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pep→oaa	-1	0.86	-0.54	0	-0.55	0	-1	0	-0.91	0	0	0	-0.91	0	-1
g6p→ru5p-D	3	0.07	0.27	0	0.28	0	1	0.29	0.48	0	1	0	0.45	0	1
ru5p-D→r5p	25	1	0.02	0.09	0	0.09	1	0.76	0.83	0.67	1	0	0.82	0.67	1
ru5p-D→xu5p-D	27	2	0.05	0.18	0	0.19	0	-0.48	-0.35	-0.67	0	0	-0.36	-0.67	0
r5p+xu5p-D→e4p+f6p	28,32	-1	-0.02	-0.09	0	-0.09	0	0.24	0.17	0.33	0	0	0.18	0.33	0
e4p+xu5p-D→g3p+f6p	30	1	0.02	0.09	0	0.09	0	-0.24	-0.17	-0.33	0	0	-0.18	-0.33	0
accoa+oaa→akg	34,36,37,40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.06	0
akg→mal-L	41,42,45,62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.06	0
oaa→mal-L	48	0	-0.14	-0.54	0	-0.55	0	0	0	0	0	0	-0.91	-0.06	0
mal-L→oaa	49	1	0	0	0	0	1	0.57	0.91	0	0	0	0	0	1
pep→oaa	52	0	-1	0	0	0	0	-0.57	0	0	0	0	0	0	1
nadh+nap→nadh+nad	53	0	0	0	0	0	0	0	-0.04	0	0	0	0	0	0
nadh+nap→nadh+nad	54	5	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0.06	15.5
adp→atp	55	3.67	0	0.98	0	1	1	0.43	1	0	1	0	1	0	0
nadh+q8→q8h2+nad	56	0	0.14	0.56	0.14	0.57	0	0	0.04	0.14	0	0	0.12	0	4
nadh+q8→q8h2+nad	57	5	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0.79	0	0
q8h2+o2→q8+h(e)	58	0	0.07	0.28	0.07	0.28	0	0.29	0.48	0.07	0	0	0.45	0	2
q8h2+o2→q8+h(e)	59	3	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0.18	0
pyr→accoa	64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.29	0
for+q8→q8h2+h(e)	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.29	0
glc→	85	1	0.51	0.55	1	0.55	1	0.88	0.91	1.67	2	0	0.91	1.67	2
→co2	86	3	0.07	0.28	0	0.28	1	0.29	0.48	0	1	0	0.45	0.41	1
o2→	87	3	0.07	0.28	0.07	0.28	1	0.29	0.48	0.07	1	0	0.45	0.18	2
→etoh	69,71,90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.24	0
→ac	74,75,91	0	0	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
→lac-D	81,93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
→pyr	94	0	0	0	0.86	0	0	0	0	1.52	2	0	0	1.74	0
→for	95	0	0	0	0.14	0	0	0	0	0.14	0	0	0	0	0
→atpEnergy	97	2.67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
identisch zu															

Tabelle 15: Minimale Flussmoden (MinModen) der Metabolite g3p und r5p. TRs* bezeichnet die MinMode für das Experiment GR04, TRs für GR03, alle anderen MinModen sind unabhängig vom Experiment. Identische MinModen wurden zusammengefasst (3.Kapitel).

Tabelle 16: *Linearkombination der flussminimierten MinModen für das Experiment GR03 (3.Kapitel)*

Reaktion	Berücksichtigung der Thermodynamik		Keq	allrev	TR	Fst	TRs
	ID	$v_{exp}(GR03)$					
g6p→f6p	2	83.34	-182.32	49.3	28.09	47.41	93.38
f6p→g3p	3,5,7	86.71	0	71.62	66.58	75.08	92.89
g3p→3pg	8,9	172.71	89.31	150.78	149.43	161.66	183.98
3pg→pep	10,12	161.71	81	134.59	136.1	151.24	177.06
pep→pyr	13	34.21	0	21.97	32.09	25.1	16.66
pyr→accoa	15	111.61	0	60.65	6.48	13.89	9.22
pyr→mal-L	16	0	39.58	23.03	29.4	0	-43.06
pyr→mal-L	17	0	0.26	4.95	0	0	0
pep→oaa	18	0	-22.01	23.01	-23.48	0	0
g6p→ru5p-D	22,23,24	15.06	281.1	48.31	69.94	51.05	5.6
ru5p-D→r5p	25	10.89	98.18	24.84	30.5	22.64	5.6
ru5p-D→xu5p-D	27	4.18	182.92	23.48	39.44	28.41	0
r5p+xu5p-D→e4p+f6p	28,32	-3.69	-92.69	-14.13	-21.69	-15.75	-1.02
e4p+xu5p-D→g3p+f6p	30	0.49	90.23	9.34	17.75	12.66	-1.02
accoa+oaa→akg	34,36,37,40	71.81	6.75	16.02	16.75	8.47	5.62
akg→mal-L	41,42,45,62	62.91	0	2.86	5.92	0	0
oaa→mal-L	48	0	0	-5.94	-2.23	0	43.06
mal-L→oaa	49	62.91	39.84	24.89	33.09	0	0
pep→oaa	52	23.5	0	-16.25	22.67	22.37	57.9
nadh+nap→nadph+nad	53	0	0	0	31.05	13.24	36.32
nadph+nad→nadp+nadh	54	0	437.44	-89.52	10.83	8.47	16.82
adp→atp	55	0	371.16	94.87	101.84	59.68	48.01
nadh+q8→q8h2+nad	56	0	0	0.94	2.57	5.7	9.89
nadh+q8→q8h2+nad	57	0	526.48	124.82	141.27	96.61	80.03
q8h2+o2→q8+h(e)	58	0	0.71	4.42	7.37	2.85	4.95
q8h2+o2→q8+h(e)	59	0	282.45	72.34	84.06	48.31	40.01
pyr→accoa	64	0	29.66	0	47.57	44.3	24.69
for+q8→q8h2+h(e)	66	0	0	0	0	0	0
glc→	85	100	100	100	100	100	100
→ co2	86	237.9	270.02	93.1	70.5	51.05	5.6
o2→	87	196.8	283.16	76.75	91.43	51.16	44.96
→ etoh	69,71,90	2.21	0	0	0	20.99	9.22
→ ac	74,75,91	7.39	0	0	0.56	0	0
→ lac-D	81,93	0	0	0	0	26.5	25.11
→ pyr	94	0.02	13.39	0	21.2	18.93	86.44
→ for	95	1.9	29.66	0	47.57	44.3	24.69
→ atpEnergy	97	0	438.46	221.87	199.77	171.36	155.76
→ biomass	biomass	7.38	5.6	10.9	8.97	7.02	4.66

ID	Linearkombination										global optimierte Flussverteilungen									
	Zielmaximierung					Flussminimierung					Zielmaximierung					Substratminimierung				
	TR	Fst	TRs	Keq	allrev	TR	TR+X	TR+Xb	TRs	TRs+X	TRs+Xb	TR+X	Fst+X	TRs+X	TRs+X	TR+X	Fst+X	TRs+X	TRs+X	
2	47.82	63.46	52.28	-179.59	82.02	90.96	55.1	68.62	90.96	93.72	94.26	88.3	98.2	93.72	93.72	98.2	55.1	93.72	93.72	93.72
3,5,7	72.32	79.95	75.51	0	80.67	84.49	76.36	81.6	84.49	89.23	90.15	87.42	90.72	89.23	89.23	90.72	76.36	89.23	89.23	89.23
8,9	153.64	165.66	159.93	87.65	156.48	161.81	160.61	167.2	161.81	173.49	175.74	171.68	174.98	173.49	173.49	174.98	160.61	173.49	173.49	173.49
10,12	139.13	154.56	147.83	78.06	137.68	144.18	148.38	156	144.18	161.25	164.54	159.44	162.74	161.25	161.25	162.74	148.38	161.25	161.25	161.25
13	0	0	0	0	0	0	17.71	27.93	0	30.58	36.48	0	0	0	0	0	17.71	0	0	0
15	14.64	11.64	28.06	0	6.93	0	90.59	102.96	11.95	103.47	111.51	101.66	0	103.47	103.47	104.96	90.59	103.47	103.47	103.47
16	32.18	-26.73	-17.49	46	0	0	0	0	0	0	0	-28.77	0	-30.58	0	0	0	0	-30.58	0
17	-34.94	0	0	0	9.46	0	0	0	0	0	0	0	-32.07	0	0	-32.07	0	0	0	0
18	-25.73	0	-77.42	-25.41	30.88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22,23,24	50.04	34.91	45.94	278.17	15.21	6.44	43.09	29.72	6.44	4.47	4.09	9.9	0	4.47	4.47	0	43.09	4.47	4.47	4.47
25	24.51	17.62	21.84	97.9	15.21	11.65	20.96	15.95	11.65	8.09	7.4	9.9	6.6	8.09	8.09	6.6	20.96	8.09	8.09	8.09
27	25.53	17.28	23.96	180.27	0	-5.21	22.13	13.78	-5.21	-3.62	-3.31	0	-6.6	-3.62	-3.62	-6.6	22.13	-3.62	-3.62	-3.62
28,32	-14.91	-10.28	-13.84	-91.56	-2.78	-5.21	-12.87	-8.54	0	0	0	-1.81	1.49	0	0	1.49	-12.87	0	0	0
30	10.62	7	10.26	88.72	-2.78	14.32	49.17	64.41	14.32	62.05	72.95	60.24	63.54	62.05	62.05	63.54	49.17	62.05	62.05	62.05
34,36,37,40	32.88	21.43	21.77	7.8	0	0	39.23	55.31	0	52.1	63.85	50.29	53.59	52.1	52.1	53.59	39.23	52.1	52.1	52.1
41,42,45,62	21.09	12.41	11.93	0	-15.28	0	0	0	0	0	0	0	-21.52	0	0	0	-39.23	0	0	0
48	7.91	44.92	17.21	0	5.82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	26.24	30.6	11.65	46	0	0	39.23	55.31	0	52.1	63.85	21.52	21.52	0	21.52	21.52	0	21.52	0	21.52
52	59.62	50.55	120.87	0	0	37.81	26.25	24.02	37.81	26.25	24.02	55.02	58.32	56.83	56.83	58.32	26.25	56.83	56.83	56.83
53	701.5	171.16	626.02	0	7.64	123.12	0	0	167.77	64.36	42.72	1269.85	71.82	1267.14	1482.77	0	26.25	0	1267.14	0
54	582.35	166.31	573.7	412	-169.94	-44.65	0	0	0	0	277.06	1243.3	0	1233.36	1410.95	0	0	1233.36	1233.36	1233.36
55	-10.61	0	-18.94	378.99	0	0	262.4	305.54	0	219.49	277.06	0	484.54	0	0	-145.24	262.4	0	0	0
56	147.54	5.17	147.69	0	0	35.18	0	0	47.93	0	330.6	321.78	235.04	319.97	318.48	318.48	0	319.97	0	319.97
57	9.12	50.18	0	522.48	0	0	315.14	347.69	0	289.39	0	196.8	0	196.8	196.8	196.8	0	196.8	0	196.8
58	105.22	22.34	85.64	0	0	17.59	0	0	23.97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59	0	38.52	0	284.24	0	0	196.8	229.15	0	196.8	229.15	1.9	106.86	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
64	58.23	73.14	43.2	34.24	44.9	62.9	1.9	1.9	50.95	1.9	1.9	1.9	106.86	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
66	6.45	23.38	0	0	15.28	0	0	0	0	0	0	0	104.96	0	0	0	0	0	0	0
85	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
86	93.97	79.93	81.73	276.22	3.03	2.86	209.65	241.02	14.81	209.65	241.02	209.65	209.65	209.65	209.65	209.65	209.65	209.65	209.65	209.65
87	105.22	60.86	85.64	284.24	0	17.59	196.8	229.15	23.97	196.8	229.15	196.8	196.8	196.8	196.8	196.8	196.8	196.8	196.8	196.8
69,71,90	0	32.83	16.13	0	0	0	2.21	2.21	0	2.21	2.21	2.21	2.21	2.21	2.21	2.21	2.21	2.21	2.21	2.21
74,75,91	0	0	0	0	0	0	7.39	7.39	0	7.39	7.39	7.39	7.39	7.39	7.39	7.39	7.39	7.39	7.39	7.39
81,93	0	21.81	0	0	0	0.81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94	0	0	21.31	0	0	0	0.02	0.02	0.81	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
95	51.79	49.76	43.2	34.24	29.61	62.9	1.9	1.9	50.95	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
97	66.07	98.12	0	441.23	91.4	77.32	410.98	481.77	77.32	393.82	470.37	141.94	629.79	143.75	143.75	0	410.98	143.75	143.75	143.75
biomass	9.77	7.48	8.15	6.46	12.66	11.87	8.24	7.54	11.87	8.24	7.54	8.24	8.24	8.24	8.24	8.24	8.24	8.24	8.24	8.24

Tabelle 17: Linearkombination der zielwertmaximierten MinModen und Flussvorhersagen bei globaler Optimierung für das Experiment GR03 (3.Kapitel)

Tabelle 18: *Linearkombination der flussminimierten MinModen für das Experiment GR04 (3.Kapitel)*

Reaktion	Berücksichtigung der Thermodynamik		Keq	allrev	TR	Fst	TRs
	ID	$v_{exp}(GR04)$					
g6p→f6p	2	56.39	-182.32	49.3	28.09	47.41	94.39
f6p→g3p	3,5,7	79.94	0	71.62	66.58	75.08	93.21
g3p→3pg	8,9	169.91	89.31	150.78	149.43	161.66	184.27
3pg→pep	10,12	162.12	81	134.59	136.1	151.24	177.33
pep→pyr	13	42.55	0	21.97	32.09	25.1	16.72
pyr→accoa	15	126.51	0	60.65	6.48	13.89	9.25
pyr→mal-L	16	-0.04	39.58	23.03	29.4	0	-43.21
pyr→mal-L	17	0	0.26	4.95	0	0	0
pep→oaa	18	0	-22.01	23.01	-23.48	0	0
g6p→ru5p-D	22,23,24	42.46	281.1	48.31	69.94	51.05	4.59
ru5p-D→r5p	25	18.35	98.18	24.84	30.5	22.64	5.28
ru5p-D→xu5p-D	27	24.1	182.92	23.48	39.44	28.41	-0.68
r5p+xu5p-D→e4p+f6p	28,32	-13.2	-92.69	-14.13	-21.69	-15.75	-0.68
e4p+xu5p-D→g3p+f6p	30	10.9	90.23	9.34	17.75	12.66	-1.37
accoa+oaa→akg	34,36,37,40	89.4	6.75	16.02	16.75	8.47	5.64
akg→mal-L	41,42,45,62	83.07	0	2.86	5.92	0	0
oaa→mal-L	48	0	0	-5.94	-2.23	0	43.21
mal-L→oaa	49	83.03	39.84	24.89	33.09	0	0
pep→oaa	52	16.75	0	-16.25	22.67	22.37	58.1
nadh+nap→nadph+nad	53	0	0	0	31.05	13.24	36.45
nadph+nad→nadp+nadh	54	0	437.44	-89.52	10.83	8.47	14.83
adp→atp	55	0	371.16	94.87	101.84	59.68	47.49
nadh+q8→q8h2+nad	56	0	0	0.94	2.57	5.7	10.22
nadh+q8→q8h2+nad	57	0	526.48	124.82	141.27	96.61	78.25
q8h2+o2→q8+h(e)	58	0	0.71	4.42	7.37	2.85	5.11
q8h2+o2→q8+h(e)	59	0	282.45	72.34	84.06	48.31	39.12
pyr→accoa	64	0	29.66	0	47.57	44.3	24.78
for+q8→q8h2+h(e)	66	0	0	0	0	0	0
glc→	85	100	100	100	100	100	100
→co2	86	324.72	270.02	93.1	70.5	51.05	4.59
o2→	87	0	283.16	76.75	91.43	51.16	44.24
→etoh	69,71,90	0	0	0	0	20.99	9.25
→ac	74,75,91	0	0	0	0.56	0	0
→lac-D	81,93	0	0	0	0	26.5	24.56
→pyr	94	0	13.39	0	21.2	18.93	87.03
→for	95	0	29.66	0	47.57	44.3	24.78
→atpEnergy	97	0	438.46	221.87	199.77	171.36	155.27
→biomass	biomass	5.25	5.6	10.9	8.97	7.02	4.68

ID	Linearkombination											global optimierte Flussverteilungen														
	Zielmaximierung											Flussminimierung											max Bio		min Gic	
	TR	Fst	TRs	TRs	allrev	TR	TR+X	TR+Xb	Fst+X	TRs	TRs+X	TRs+Xb	TR+X	Fst+X	TR+X	Fst+X	TR+X	Fst+X	TR+X	Fst+X						
2	47.82	63.46	48.13	48.13	82.02	90.96	36.02	89.09	41.69	90.96	92.49	96	92.49	97.84	92.49	97.84	92.49	97.84	92.49	41.69						
3,5,7	72.32	79.95	73.38	73.38	80.67	84.49	68.29	90.84	70.18	84.49	87.11	93.14	87.11	88.9	87.11	88.9	87.11	88.9	87.11	70.18						
8,9	153.64	165.66	156.45	156.45	156.48	161.81	149.45	180.82	151.34	161.81	168.28	183.12	168.28	170.06	168.28	170.06	168.28	170.06	168.28	151.34						
10,12	139.13	154.56	143.29	143.29	137.68	144.18	134.81	173.03	136.7	144.18	153.64	175.33	153.64	155.42	153.64	155.42	153.64	155.42	153.64	136.7						
13	0	0	0	0	0	0	0	53.5	0	16.93	16.93	55.8	16.93	0	0	0	0	0	0	0						
15	14.64	11.64	30.5	30.5	6.93	0	67.29	136.78	69.18	11.95	86.12	139.09	86.12	0	0	0	0	0	0	69.18						
16	32.18	-26.73	-10.31	-10.31	46	0	1.89	0	0	0	0	0	-16.93	0	-16.93	0	-16.93	0	-16.93	0						
17	-34.94	0	0	0	9.46	0	0	0	0	0	0	0	0	-18.72	0	-18.72	0	-18.72	0	0						
18	-25.73	0	-84.15	-84.15	30.88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
22,23,24	50.04	34.91	49.93	49.93	278.17	15.21	61.82	9.76	56.15	6.44	5.35	2.85	5.35	0	5.35	0	5.35	0	5.35	56.15						
25	24.51	17.62	23.74	23.74	15.21	11.65	28.5	7.45	26.61	11.65	9.68	5.15	9.68	7.9	9.68	7.9	9.68	7.9	9.68	26.61						
27	25.53	17.28	26.05	26.05	180.27	0	-5.21	33.32	2.3	-5.21	-4.33	-2.3	-4.33	-7.9	-4.33	-7.9	-4.33	-7.9	-4.33	29.54						
28,32	-14.91	-10.28	-15.04	-15.04	-2.78	-2.78	-18.82	-2.3	-16.93	0	0	0	0	1.78	0	1.78	0	1.78	0	-16.93						
30	10.62	7	11.15	11.15	88.72	-2.78	14.5	0	12.6	-5.21	-4.33	-2.3	-4.33	-6.11	-4.33	-6.11	-4.33	-6.11	-4.33	12.6						
34,36,37,40	32.88	21.43	23.66	23.66	7.8	0	14.32	11.9	100.27	13.79	30.72	102.57	30.72	32.51	30.72	32.51	30.72	32.51	30.72	13.79						
41,42,45,62	21.09	12.41	12.97	12.97	-15.28	0	0	93.94	1.89	0	18.82	96.24	18.82	20.61	18.82	20.61	18.82	20.61	18.82	1.89						
48	7.91	44.92	18.71	18.71	5.82	0	0	0	0	0	0	0	0	-1.89	0	-1.89	0	-1.89	0	-1.89						
49	26.24	30.6	21.37	21.37	46	0	1.89	93.94	1.89	0	18.82	96.24	18.82	1.89	1.89	1.89	1.89	1.89	1.89	0						
52	59.62	50.55	122.69	122.69	0	37.81	29.52	16.71	31.41	37.81	31.41	16.71	31.41	50.13	48.34	50.13	48.34	50.13	48.34	31.41						
53	701.5	171.16	563.03	563.03	0	7.64	123.12	28.31	35.88	167.77	120.54	0	748.85	129.46	748.85	129.46	748.85	129.46	748.85	35.88						
54	582.35	166.31	497.46	497.46	412	-169.94	-44.65	0	33.6	0	0	22.08	645.25	0	645.25	0	645.25	0	645.25	0						
55	-10.61	0	-11.89	-11.89	378.99	0	0	129.68	432.81	0	68.2	432.81	0	205.88	0	205.88	0	205.88	0	124.64						
56	147.54	5.17	125.74	125.74	0	35.18	0	0	0	47.93	0	0	202.12	114.33	202.12	114.33	202.12	114.33	0	220.94						
57	9.12	50.18	8.7	8.7	522.48	0	220.94	461.34	219.05	0	185.19	456.73	0	0	111.42	0	111.42	0	0	220.94						
58	105.22	22.34	75.69	75.69	0	17.59	0	0	0	23.97	0	0	111.42	0	111.42	0	111.42	0	111.42	0						
59	0	38.52	8.7	8.7	284.24	0	111.42	324.61	111.42	0	111.42	324.61	0	111.42	0	111.42	0	111.42	0	111.42						
64	58.23	73.14	46.96	46.96	34.24	44.9	62.9	0.6	0.6	50.95	0.6	0.6	0.6	88.5	0.6	88.5	0.6	88.5	0.6	0.6						
66	6.45	23.38	0	0	15.28	0	0	0	0	0	0	0	0	87.9	0	87.9	0	87.9	0	0						
85	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100						
86	93.97	79.93	88.84	88.84	276.22	3.03	126.14	332.83	126.14	14.81	126.14	332.83	126.14	126.14	126.14	126.14	126.14	126.14	126.14	126.14						
87	105.22	60.86	84.39	84.39	284.24	0	17.59	111.42	111.42	23.97	111.42	324.61	111.42	111.42	111.42	111.42	111.42	111.42	111.42	111.42						
69,71,90	0	32.83	17.53	17.53	0	0	1.15	1.15	1.15	0	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15						
74,75,91	0	0	0	0	0	0	14.49	14.49	14.49	0	14.49	14.49	14.49	14.49	14.49	14.49	14.49	14.49	14.49	14.49						
81,93	0	21.81	0	0	0	0	0.03	0.03	0.03	0	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03						
94	0	0	5.76	5.76	0	0	0.04	0.04	0.04	0.81	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04						
95	51.79	49.76	46.96	46.96	34.24	29.61	62.9	0.6	0.6	50.95	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6						
97	66.07	98.12	0	0	441.23	91.4	77.32	225.33	684.7	77.32	199.6	689.31	77.32	322.14	114.47	322.14	114.47	322.14	114.47	222.18						
biomass	9.77	7.48	8.86	8.86	6.46	12.66	11.87	9.86	5.25	11.87	9.86	5.25	9.86	9.86	9.86	9.86	9.86	9.86	9.86	9.86						

Tabelle 19: Linearkombination der zielwertmaximierten MinModen und Flussvorhersagen bei globaler Optimierung für das Experiment GR04 (3.Kapitel)

Tabelle 20: Gemessene Enzymkonzentrationen aus der Arbeit von Ishii et al.[93] für 4 Wachstumsraten (GR01-GR04) und die Referenzmessung (RF03_4). Daten jeweils in mg(Protein)/g(Trockengewicht)

Rid	Gen-ID	GR01	GR02	GR03	GR04	RF03_4
2	pgi	0.1750	0.1125	0.1567	0.3091	0.1106
3	pfkB	0.0083	0.0198	0.0095	0.0461	0.0169
5	fbaA	0.8742	0.9459	1.0691	1.9712	1.3126
7	tpiA	0.0333	0.0274	0.0408	0.0631	0.0494
8	gapA	1.7154	3.1571	5.2534	7.4103	3.1417
9	pgk	0.3275	0.2531	0.4134	0.5615	0.4147
10	gpmA	1.2773	1.2380	1.3633	1.3685	1.0576
12	eno	1.3276	1.1162	1.8823	3.4429	1.3054
13	pykF	0.6353	0.3408	0.8043	1.1753	0.8250
15	aceE	0.4501	0.5273	0.6159	0.7241	0.6047
18	pck	0.5255	0.4073	0.2107	0.0682	0.4801
19	fbp	0.0991	0.1083	0.1578	0.2017	0.1134
21	ppsA	0.1393	0.1119	0.0622	0.1006	0.1545
22	zwf	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
23	pgl	0.1052	0.0355	0.0342	0.0329	0.0866
24	gnd	0.1960	0.0000	0.5807	0.6751	0.3645
25	priA	0.0372	0.0216	0.0510	0.0378	0.0360
27	rpe	0.0317	0.0119	0.0421	0.0386	0.0508
28	tktB	0.3885	0.2731	0.3294	0.4565	0.4153
30	tktB	0.3885	0.2731	0.3294	0.4565	0.4153
32	talB	0.2449	0.3648	0.6243	0.6543	0.5031
34	gltA	2.8173	2.1076	1.7988	1.1592	3.5679
36	acnB	0.8514	0.7340	0.5069	0.5696	0.9851
37	acnB	0.8514	0.7340	0.5069	0.5696	0.9851
40	icd	2.3607	2.6708	2.1151	3.1073	3.2119
41	sucB	0.4098	0.4869	0.6963	0.5654	0.5108
42	sucC	0.1778	0.1699	0.2198	0.3134	0.1559
43	frdA	0.1718	0.1410	0.1654	0.0404	0.1796
45	fumB	0.0020	0.0029	0.0012	0.0094	0.0011
48	mdh	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
50	aceA	24.0712	14.2078	7.3895	3.4670	25.7036
51	aceB	7.6316	4.8692	3.4680	3.1132	6.9868
52	ppc	0.3963	0.3161	0.5175	1.6156	0.4081
62	sdhB	0.5704	0.3983	0.4855	0.8691	0.4520
64	pflB	0.0134	0.0056	0.0162	0.0376	0.0220
69	adhE	0.1107	0.1214	0.1608	0.5908	0.1780
71	adhE	0.1107	0.1214	0.1608	0.5908	0.1780
74	pta	0.0455	0.0169	0.0244	0.0472	0.0331
75	ackA	0.5789	0.8939	0.9909	1.0932	0.8278
79	acs	0.3947	0.2075	0.0210	0.0000	0.4143
81	ldhA	0.1153	0.1214	0.0700	0.1136	0.1060
83	eda	0.2508	0.1272	0.2912	0.2441	0.0993
85	ptsH	1.3777	1.9041	2.4314	3.1840	2.0116
113	adk	0.0152	0.0427	0.0747	0.1392	0.0421
116	lldD	0.0321	0.0252	0.0443	0.0868	0.0259

Tabelle 21: Verwendete Quotienten der Enzymkonzentrationsänderungen (Set0): Enzymkonzentrationen der Wachstumsratenerperimente (GR01-GR04) dividiert durch die Enzymkonzentration der Referenzmessung (RF03_4): $dE - 1$, Set1 und Set2 sind eine Vorauswahl "informativer Enzyme". Für die Gegenüberstellung in Abb. 5.9 wurden die Enzymkonzentrationen der Reaktion 15 und 64 katalysierenden Enzyme ebenfalls summiert, d.h. $\frac{E_{GR0x}}{E_{RF03}} = \frac{E_{GR0x}^{aceE} + E_{GR0x}^{pflB}}{E_{RF03}^{aceE} + E_{RF03}^{pflB}}$.

Rid	Gen-ID	$dE_{GR01} - 1$	$dE_{GR02} - 1$	$dE_{GR03} - 1$	$dE_{GR04} - 1$	Set1	Set2
2	pgi	0.58	0.02	0.42	1.79		
3	pfkB	-0.51	0.17	-0.44	1.73	x	x
5	fbaA	-0.33	-0.28	-0.19	0.50	x	x
7	tpiA	-0.33	-0.44	-0.17	0.28	x	
8	gapA	-0.45	0.00	0.67	1.36	x	
9	pgk	-0.21	-0.39	-0.00	0.35	x	
10	gpmA	0.21	0.17	0.29	0.29		
12	eno	0.02	-0.14	0.44	1.64	x	
13	pykF	-0.23	-0.59	-0.03	0.42	x	x
15	aceE	-0.26	-0.13	0.02	0.20	x	x
18	pck	0.09	-0.15	-0.56	-0.86		
19	fbp	-0.13	-0.05	0.39	0.78		
21	ppsA	-0.10	-0.28	-0.60	-0.35		
23	pgl	0.22	-0.59	-0.60	-0.62		x
24	gnd	-0.46	-1	0.59	0.85		
25	priA	0.03	-0.40	0.42	0.05		
27	rpe	-0.38	-0.77	-0.17	-0.24		
28	tktB	-0.06	-0.34	-0.21	0.10		
30	tktB	-0.06	-0.34	-0.21	0.10		
32	talB	-0.51	-0.27	0.24	0.30		
34	gltA	-0.21	-0.41	-0.50	-0.68	x	x
36,37	acnB	-0.14	-0.25	-0.49	-0.42		
40	icd	-0.27	-0.17	-0.34	-0.03		
41	sucB	-0.20	-0.05	0.36	0.11		
42	sucC	0.14	0.09	0.41	1.01		x
45	fumB	0.82	1.72	0.14	7.72	x	
50	aceA	-0.06	-0.45	-0.71	-0.87	x	
51	aceB	0.09	-0.30	-0.50	-0.55	x	x
52	ppc	-0.03	-0.23	0.27	2.96	x	x
62	sdhB	0.26	-0.12	0.07	0.92		x
64	pflB	-0.39	-0.74	-0.27	0.71		
69	adhE	-0.38	-0.32	-0.10	2.32		x
71	adhE	-0.38	-0.32	-0.10	2.32		x
74	pta	0.37	-0.49	-0.26	0.42		x
75	ackA	-0.30	0.08	0.20	0.32		x
79	acs	-0.05	-0.50	-0.95	-1		x
81	ldhA	0.09	0.15	-0.34	0.07		
83	eda	1.52	0.28	1.93	1.46		x
85	ptsH	-0.32	-0.05	0.21	0.58		
113	adk	-0.64	0.01	0.77	2.30	x	x
116	lldD	0.24	-0.03	0.71	2.35		

Tabelle 22: Flussvorhersagen für MinModen-Set M, Feist-Irreversibilitäten F_{st} und Wachstumsexperiment GR03. Verglichen werden experimentell bestimmte Flüsse Δv_{exp} mit Vorhersagen der Testrechnungen ($\alpha_{ideal,min} : \alpha_i, E_{ideal}^*$) und bei Korrelation mit Enzymkonzentrationsänderungen im Set0, Set1, Set2.

Reaktion	Rid	Δv_{exp}	$E^* - 1$	α_{ideal}	$min : \alpha_i$	E_{ideal}^*	Set0	Set1	Set2
glc→	85	3.36	0.21	3.42	3.36	3.36	3.36	3.36	3.36
g6p→f6p	2	2.67	0.42	3.36	2.60	2.61	0.89	0.67	3.52
f6p→g3p	3	2.82	-0.44	3.09	2.84	2.84	1.93	1.80	2.47
	5	-2.82	-0.19	-3.09	-2.84	-2.84	-1.93	-1.80	-2.47
	7	-2.82	-0.17	-3.09	-2.84	-2.84	-1.93	-1.80	-2.47
g3p→3pg	8	5.63	0.67	5.96	5.61	5.59	4.41	4.22	5.20
	9	5.63	0.00	5.96	5.61	5.59	4.41	4.22	5.20
3pg→pep	10	5.20	0.29	5.53	5.50	5.41	4.44	4.42	5.42
	12	5.20	0.44	5.53	5.50	5.41	4.44	4.42	5.42
g6p→ru5p-D	22	0.63		0.00	0.70	0.69	2.34	2.50	-0.51
	23	0.63	-0.60	0.00	0.70	0.69	2.34	2.50	-0.51
	24	-0.63	0.59	0.00	-0.70	-0.69	-2.34	-2.50	0.51
ru5p-D→r5p	25	0.44	0.42	0.23	0.40	0.41	1.18	1.17	0.18
ru5p-D→xu5p-D	27	0.19	-0.17	-0.23	-0.30	-0.28	-1.16	-1.33	0.69
r5p+xu5p-D→e4p+f6p	28	-0.16	-0.21	0.05	-0.25	-0.25	-0.73	-0.80	0.33
	32	0.16	-0.21	-0.05	0.25	0.25	0.73	0.80	-0.33
e4p+xu5p-D→g3p+f6p	30	0.03	0.24	0.35	-0.05	-0.03	-0.43	-0.52	0.36
pep→oaa	18	0.00	-0.56	0.00	-0.03	-0.04	-0.07	-0.08	-0.08
pep→oaa	52	0.99	0.27	0.92	1.45	1.31	0.98	-0.45	1.84
pep→pyr	13	0.69	-0.03	1.04	0.62	0.66	0.21	1.73	0.51
pyr→accoa	15	3.15	0.02	0.57	2.46	2.33	2.04	2.98	2.14
pyr→accoa	64	"	-0.27	1.83	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
pyr→mal-L	16				0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	17				0.19	0.21	0.16	0.06	0.25
accoa+oaa→akg	34	1.49	-0.50	0.35	1.71	1.52	0.86	1.83	1.01
	37,-36	-1.49	-0.49	0.35	-1.71	-1.52	-0.86	-1.83	-1.01
	40	-1.49	-0.34	-0.35	-1.69	-1.52	-1.37	-2.08	-2.29
akg→succ	41	1.14	0.36	0.00	1.33	1.21	1.73	2.88	2.33
	42	-1.14	0.41	0.00	-1.33	-1.21	-1.73	-2.88	-2.33
succ→mal-L	62	1.06	0.07	0.00	1.36	1.21	1.22	2.63	1.04
	45	1.06	0.14	0.00	1.36	1.21	1.22	2.63	1.04
oaa→mal-L	48	0.00		0.00	-1.02	-0.90	-1.00	-2.54	-0.95
mal-L→oaa	49	0.98		0.00	0.55	0.52	-0.13	-0.10	-0.94
icit→mal-L	50	0.08	-0.71	0.00	-0.03	0.00	0.51	0.25	1.28
	51	-0.08	-0.50	0.00	0.03	-0.00	-0.51	-0.25	-1.28
o2→	87			2.03	6.67	6.29	5.28	8.11	6.29
ac	74	-0.49	-0.26	0.00	-0.49	-0.49	-0.49	-0.49	-0.49
ac	75,91	0.49	0.20	0.00	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49
etoh	69,-71,-90	-0.15	-0.10	-0.87	-0.15	-0.15	-0.15	-0.15	-0.15
lac-D	81,93	0.00	-0.34	1.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pyr	94	0.00		0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
for	95	0.13		1.83	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
akg		0.35		0.35	0.35	0.31	-0.36	-0.80	-0.03
oaa		0.57		0.57	1.28	1.17	0.93	0.08	0.77
accoa		1.18		1.18	0.21	0.30	1.18	0.89	1.90
pyr		0.89		0.89	1.21	1.36	1.23	1.91	1.35
g3p		0.05		0.05	0.11	0.13	-0.12	-0.09	-0.61
pep		0.16		0.16	0.11	0.12	-0.04	-0.15	-0.22
3pg		0.43		0.43	0.11	0.18	-0.03	-0.20	-0.22
r5p		0.28		0.28	0.15	0.16	0.46	0.37	0.52
e4p		0.12		0.12	0.20	0.21	0.29	0.28	0.02
f6p		0.03		0.03	0.06	0.06	0.13	0.19	0.35
g6p		0.06		0.06	0.06	0.06	0.13	0.19	0.35
nadph					1.58	1.56	5.29	5.64	-1.15
atp					13.58	12.41	13.12	29.24	13.57
atpEnergy	97	0.00		6.37	6.61	6.58	4.57	2.39	7.09
R^2					0.99	0.99	0.75	0.54	0.87

Glossar

Atomübergangsmatrizen

Diese Matrizen enthalten die Information welches Atom eines Substrat-Moleküls nach der chemischen Umsetzung sich an welcher Position des Produkt-Moleküls wiederfindet.

Chemostat

Der Chemostat ist ein offenes System, in dem Bakterien kontinuierlich wachsen können. Ein Vorratsgefäß versorgt die Bakterien mit sterilem, frischem Medium; im Auffanggefäß wird überschüssiges Nährmedium und Bakterien gesammelt; das Volumen im Chemostat ist daher konstant. Im Gegensatz zu geschlossenen Systemen können Wachstumsrate (Generationen pro Zeiteinheit) und Wachstumsertrag (Dichte der Bakterien) unabhängig voneinander reguliert werden: die Durchflussgeschwindigkeit des frischen Mediums erhöht die Wachstumsrate, die Erhöhung der Substratkonzentration im Medium (sofern limitierend) erhöht die Bakteriendichte. Der Chemostat ist somit ein selbstkorrigierendes System: wird die Durchflussgeschwindigkeit erhöht, sinkt die Bakteriendichte und es sind weniger Zellen vorhanden, denen jedoch mehr Nährstoffe zur Verfügung stehen, weshalb sich die Wachstumsrate erhöht.

Enzymatische Aktivität

Die katalytische Wirkung eines Enzyms, seine Aktivität, wird gemessen, indem man unter genau definierten Bedingungen die Zunahme der Geschwindigkeit der Reaktion bestimmt, d.h. die Differenz der Umsätze der katalysierten und der unkatalysierten Reaktion. Da die katalytische Aktivität unabhängig vom Volumen ist, wählt man bei Enzymen die Meßgröße Umsatz pro Zeit, bzw. Umsatzrate (in kat oder $\frac{\text{mol}}{\text{s}}$).

Exchange Flux

In einem MFA-Modell zur Bestimmung von Flussraten auf Basis gemessener Isotopomerfraktionen, wird der netto-Flusswert reversibler Reaktionen als Differenz von Vorwärts- und Rückwärtsfluss ausgegeben. Die Austauschflüsse (exchange fluxes) entsprechen dem Flussanteil, der gleichzeitig in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung fließt, also für $v_{net} \geq 0$ gilt $v_{exch} = v^{\leftarrow}$, bzw. allgemein $v_{exch} = \min(v^{\rightarrow}, v^{\leftarrow})$ [215], symbol= .

GC/MS

Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung ist die Kopplung eines Gas-Chromatographen (GC) mit einem Massenspektrometer (MS) (Gesamtverfahren bzw. Gerätekopplung verkürzend auch: GC-MS oder GC/MS oder GCMS). Dabei dient der Gaschromatograph zur Auftrennung des zu untersu-

chenden Stoffgemisches und das Massenspektrometer zur Identifizierung und gegebenenfalls auch Quantifizierung der einzelnen Komponenten.

Metabolit-Kanalisation

(auch *metabolic-channeling* oder *metabolite channeling*)

Beschreibt eine strukturelle Interaktion von Enzymen eines Biosyntheseweges, die einen kanalisierten Metabolitenfluss ermöglicht, d.h. die Zwischenprodukte in einer Art "Tunnel" abgeschirmt weiterreichen und damit eine drastisch erhöhte Metabolitkonzentration ermöglichen..

Phänotyp-Microarrays

Dieses Verfahren erlaubt es, das Wachstumsverhalten von Säugetierzellen und Mikroorganismen bei wechselnden Umgebungsbedingungen bzw. Nährstoffangebot systematisch zu studieren. Dazu werden in 96 Vertiefungen einer Kunststoffplatte (Array) Medien unterschiedlicher Zusammensetzung gefüllt, wobei (je nach Array) die Kohlenstoff-, Schwefel-, Phosphat- oder Stickstoffquelle variiert (angeboten von der Firma Biolog,Inc.). Die Methode wird im Detail von Bochner *et al.*[18] beschrieben; Daten zu umfassenden Studien mit dieser Technologie finden sich in der ASAP-Datenbank von Jeremy Glasner[68, 69] und bei Ito *et al.*[94].

Reaktionslaufzahl

Maß für den Ablauf einer Reaktion (ξ): für $\xi = 0$ liegen die Substrate in Reinform vor, während $\xi = 1$ einer vollständigen Umsetzung zu Produkten entspricht.

Stöchiometrische

In der Stöchiometrischen Matrix S (auch Inzidenzmatrix genannt) werden die stöchiometrischen Koeffizienten einer Reaktionen als Spaltenvektor dargestellt. In der Spalte kann abgelesen werden, wieviele Moleküle eines Metabolits in einer Reaktion verbraucht (negativer Koeffizient) oder produziert (positiver Koeffizient) werden; die Koeffizienten einer Zeile geben an, welchen Umwandlungen, sprich Reaktionen, ein Metabolit im Netzwerk unterworfen ist. Die Matrix hat somit die Größe $m \times n$, entsprechend einer Anzahl von m Metaboliten und n Reaktionen.

Stöchiometrische Koeffizienten

Biochemische Reaktionen werden meist, in Anlehnung an die Chemie, in der einfachen Reaktionsschreibweise $1 A + 2 B \rightarrow 2 C + 1 D$ notiert. Die ganzzahlige, positive Zahl vor dem jeweiligen Reaktionsteilnehmer entspricht dabei dem *stoichiometrischen Koeffizienten*, wobei ein Wert von 1 meist nicht notiert wird.

Literaturverzeichnis

- [1] AGRAWAL, A.A. ; LARORSCH, C. ; TOLLRIAN, R.: Transgenerational induction of defences in animals and plants. In: *Nature* 401 (1999), S. 60–63
- [2] ALBERTY, R. A.: Calculation of standard transformed Gibbs energies and standard transformed enthalpies of biochemical reactants. In: *Arch Biochem Biophys* 353 (1998), May, Nr. 1, 116–130. <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1998.0638>. – DOI 10.1006/abbi.1998.0638
- [3] ALLEN, Jess ; DAVEY, Hazel M. ; BROADHURST, David ; HEALD, Jim K. ; ROWLAND, Jem J. ; OLIVER, Stephen G. ; KELL, Douglas B.: High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. In: *Nat Biotechnol* 21 (2003), Jun, Nr. 6, 692-6. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt823>. – DOI 10.1038/nbt823
- [4] ALMAAS, Eivind: Optimal flux patterns in cellular metabolic networks. In: *Chaos* 17 (2007), Jun, Nr. 2, 026107. <http://dx.doi.org/10.1063/1.2737828>. – DOI 10.1063/1.2737828
- [5] ALMAAS, Eivind ; OLTVAI, Zoltán N. ; BARABÁSI, Albert-László: The activity reaction core and plasticity of metabolic networks. In: *PLoS Comput Biol* 1 (2005), Dec, Nr. 7, e68. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010068>. – DOI 10.1371/journal.pcbi.0010068
- [6] ALTERMANN, Eric ; KLAENHAMMER, Todd R.: GAMOLA: a new local solution for sequence annotation and analyzing draft and finished prokaryotic genomes. In: *OMICS* 7 (2003), Nr. 2, 161–169. <http://dx.doi.org/10.1089/153623103322246557>. – DOI 10.1089/153623103322246557
- [7] ANDRADE, M. A. ; BROWN, N. P. ; LEROY, C. ; HOERSCH, S. ; DARUVAR, A. de ; REICH, C. ; FRANCHINI, A. ; TAMAMES, J. ; VALENCIA, A. ; OUZOUNIS, C. ; SANDER, C.: Automated genome sequence analysis and annotation. In: *Bioinformatics* 15 (1999), May, Nr. 5, S. 391–412
- [8] ARAI, Kazuhito ; HISHIDA, Atsushi ; ISHIYAMA, Mariko ; KAMATA, Takeo ; UCHIKOBA, Hiroyuki ; FUSHINOBU, Shinya ; MATSUZAWA, Hiroshi ; TAGUCHI, Hayao: An absolute requirement of fructose 1,6-bisphosphate for the Lactobacillus casei L-lactate dehydrogenase activity induced by a single amino acid substitution. In: *Protein Eng* 15 (2002), Jan, Nr. 1, S. 35–41
- [9] ATKINSON, D. E.: Adenine nucleotides as universal stoichiometric metabolic coupling agents. In: *Adv Enzyme Regul* 9 (1970), S. 207–219
- [10] AVILA-CAMPILLO, Iliana ; DREW, Kevin ; LIN, John ; REISS, David J. ; BONNEAU, Richard: BioNetBuilder: automatic integration of biological networks. In:

- Bioinformatics* 23 (2007), Feb, Nr. 3, 392–393. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btl604>. – DOI 10.1093/bioinformatics/btl604
- [11] BANGA, Julio R.: Optimization in computational systems biology. In: *BMC Syst Biol* 2 (2008), 47. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-2-47>. – DOI 10.1186/1752-0509-2-47
- [12] BEARD, Daniel A. ; BABSON, Eric ; CURTIS, Edward ; QIAN, Hong: Thermodynamic constraints for biochemical networks. In: *J Theor Biol* 228 (2004), Jun, Nr. 3, 327–333. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.01.008>. – DOI 10.1016/j.jtbi.2004.01.008
- [13] BEARD, Daniel A. ; LIANG, Shou dan ; QIAN, Hong: Energy balance for analysis of complex metabolic networks. In: *Biophys J* 83 (2002), Jul, Nr. 1, S. 79–86
- [14] BECKER, Scott A. ; PALSSON, Bernhard O.: Genome-scale reconstruction of the metabolic network in *Staphylococcus aureus* N315: an initial draft to the two-dimensional annotation. In: *BMC Microbiol* 5 (2005), 8. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-5-8>. – DOI 10.1186/1471-2180-5-8
- [15] BENNETT, Bryson D. ; KIMBALL, Elizabeth H. ; GAO, Melissa ; OSTERHOUT, Robin ; DIEN, Stephen J V. ; RABINOWITZ, Joshua D.: Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. In: *Nat Chem Biol* 5 (2009), Aug, Nr. 8, 593–599. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.186>. – DOI 10.1038/nchembio.186
- [16] BERRÍOS-RIVERA, Susana J. ; BENNETT, George N. ; SAN, Ka-Yiu: Metabolic engineering of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD(+)-dependent formate dehydrogenase. In: *Metab Eng* 4 (2002), Jul, Nr. 3, S. 217–229
- [17] BOAG, P. T. ; GRANT, P. R.: Intense Natural Selection in a Population of Darwin's Finches (Geospizinae) in the Galapagos. In: *Science* 214 (1981), Oct, Nr. 4516, 82–85. <http://dx.doi.org/10.1126/science.214.4516.82>. – DOI 10.1126/science.214.4516.82
- [18] BOCHNER, B. R. ; GADZINSKI, P. ; PANOMITROS, E.: Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. In: *Genome Res* 11 (2001), Jul, Nr. 7, 1246–1255. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.186501>. – DOI 10.1101/gr.186501
- [19] BOLOGNA, Federico P. ; ANDREO, Carlos S. ; DRINCOVICH, María F.: *Escherichia coli* malic enzymes: two isoforms with substantial differences in kinetic properties, metabolic regulation, and structure. In: *J Bacteriol* 189 (2007), Aug, Nr. 16, 5937–5946. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00428-07>. – DOI 10.1128/JB.00428-07
- [20] BONARIUS, H. P. ; HATZIMANIKATIS, V. ; MEESTERS, K. P. ; GOOLJER, C. D. ; SCHMID, G. ; TRAMPER, J.: Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balances. In: *Biotechnol Bioeng* 50 (1996), May, Nr. 3, 299–318. <http://dx.doi.org/3.0.CO;2-B>. – DOI 3.0.CO;2-B
- [21] BRENNER, S.: Special Achievement in Medical Science Award. From cell phy-

- siology to cell physiology. In: *Nat Med* 6 (2000), Oct, Nr. 10, 1087–1088. <http://dx.doi.org/10.1038/80400>. – DOI 10.1038/80400
- [22] BRINSMADÉ, Shaun R. ; ESCALANTE-SEMERENA, Jorge C.: The *eutD* gene of *Salmonella enterica* encodes a protein with phosphotransacetylase enzyme activity. In: *J Bacteriol* 186 (2004), Mar, Nr. 6, S. 1890–1892
- [23] BROCKMANN, Regina ; BEYER, Andreas ; HEINISCH, Jürgen J. ; WILHELM, Thomas: Posttranscriptional expression regulation: what determines translation rates? In: *PLoS Comput Biol* 3 (2007), Mar, Nr. 3, e57. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030057>. – DOI 10.1371/journal.pcbi.0030057
- [24] BUCHHOLZ, Arne ; HURLEBAUS, Jochen ; WANDREY, Christian ; TAKORS, Ralf: Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. In: *Biomol Eng* 19 (2002), Jun, Nr. 1, S. 5–15
- [25] BURGARD, Anthony P. ; MARANAS, Costas D.: Optimization-based framework for inferring and testing hypothesized metabolic objective functions. In: *Biotechnol Bioeng* 82 (2003), Jun, Nr. 6, 670–677. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.10617>. – DOI 10.1002/bit.10617
- [26] BURGARD, Anthony P. ; NIKOLAEV, Evgeni V. ; SCHILLING, Christophe H. ; MARANAS, Costas D.: Flux coupling analysis of genome-scale metabolic network reconstructions. In: *Genome Res* 14 (2004), Feb, Nr. 2, 301–312. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.1926504>. – DOI 10.1101/gr.1926504
- [27] CECCHINI, Gary ; MAKLASHINA, Elena ; YANKOVSKAYA, Victoria ; IVERSON, Tina M. ; IWATA, So: Variation in proton donor/acceptor pathways in succinate:quinone oxidoreductases. In: *FEBS Lett* 545 (2003), Jun, Nr. 1, S. 31–38
- [28] CHAO, Y. P. ; LIAO, J. C.: Metabolic responses to substrate futile cycling in *Escherichia coli*. In: *J Biol Chem* 269 (1994), Feb, Nr. 7, S. 5122–5126
- [29] CHISTOSERDOVA, Ludmila ; CHEN, Sung-Wei ; LAPIDUS, Alla ; LIDSTROM, Mary E.: Methylophily in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a genomic point of view. In: *J Bacteriol* 185 (2003), May, Nr. 10, S. 2980–7
- [30] CHISTOSERDOVA, Ludmila ; LAUKEL, Markus ; PORTAIS, Jean-Charles ; VORHOLT, Julia A. ; LIDSTROM, Mary E.: Multiple formate dehydrogenase enzymes in the facultative methylophile *Methylobacterium extorquens* AM1 are dispensable for growth on methanol. In: *J Bacteriol* 186 (2004), Jan, Nr. 1, S. 22–8
- [31] CHOI, Hyung S. ; KIM, Tae Y. ; LEE, Dong-Yup ; LEE, Sang Y.: Incorporating metabolic flux ratios into constraint-based flux analysis by using artificial metabolites and converging ratio determinants. In: *Journal of Biotechnology* 129 (2007), Nr. 4, 696 - 705. <http://dx.doi.org/DOI:10.1016/j.jbiotec.2007.02.026>. – DOI DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.02.026. – ISSN 0168–1656
- [32] CLARKE, B. L.: Stoichiometric network analysis. In: *Cell Biophys* 12 (1988), S. 237–253
- [33] COLLINS, M. D. ; JONES, D.: Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. In: *Microbiol Rev* 45 (1981), Jun,

Nr. 2, S. 316–354

- [34] COVERT, Markus W. ; FAMILI, Iman ; PALSSON, Bernhard O.: Identifying constraints that govern cell behavior: a key to converting conceptual to computational models in biology? In: *Biotechnol Bioeng* 84 (2003), Dec, Nr. 7, 763–772. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.10849>. – DOI 10.1002/bit.10849
- [35] CSETE, Marie E. ; DOYLE, John C.: Reverse engineering of biological complexity. In: *Science* 295 (2002), Mar, Nr. 5560, 1664–1669. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1069981>. – DOI 10.1126/science.1069981
- [36] DANDEKAR, T. ; SCHUSTER, S. ; SNEL, B. ; HUYNEN, M. ; BORK, P.: Pathway alignment: application to the comparative analysis of glycolytic enzymes. In: *Biochem J* 343 Pt 1 (1999), Oct, S. 115–124
- [37] DANTZIG, G. B.: *Linear Programming and Extensions*. Princeton, NJ : Princeton University Press, 1963
- [38] DAUNER, M. ; SAUER, U.: GC-MS analysis of amino acids rapidly provides rich information for isotopomer balancing. In: *Biotechnol Prog* 16 (2000), Nr. 4, S. 642–9
- [39] DEJONGH, Matthew ; FORMSMA, Kevin ; BOILLOT, Paul ; GOULD, John ; RYCENGA, Matthew ; BEST, Aaron: Toward the automated generation of genome-scale metabolic networks in the SEED. In: *BMC Bioinformatics* 8 (2007), 139. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-8-139>. – DOI 10.1186/1471-2105-8-139
- [40] DEVAUX, F. ; MARC, P. ; JACQ, C.: Transcriptomes, transcription activators and microarrays. In: *FEBS Lett* 498 (2001), Jun, Nr. 2-3, S. 140–144
- [41] DIAZ, Constantino ; DIEU, Pierre ; FEULLERAT, Claude ; LELONG, Philippe ; SALOMÉ, Marc: Simultaneous adaptive predictive control of the partial pressures of dissolved oxygen (pO₂) and dissolved carbon dioxide (pCO₂) in a laboratory-scale bioreactor. In: *Journal of Biotechnology* 52 (1996), December, Nr. 2, 135–150. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(96\)01637-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(96)01637-9). – DOI 10.1016/S0168-1656(96)01637-9
- [42] DIEN, SJ V.: *personal communication*. 2005
- [43] DIEN, Stephen J V. ; LIDSTROM, Mary E.: Stoichiometric model for evaluating the metabolic capabilities of the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1, with application to reconstruction of C(3) and C(4) metabolism. In: *Biotechnol Bioeng* 78 (2002), May, Nr. 3, S. 296–312
- [44] DIEN, Stephen J V. ; MARX, Christopher J. ; O'BRIEN, Brooke N. ; LIDSTROM, Mary E.: Genetic characterization of the carotenoid biosynthetic pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1 and isolation of a colorless mutant. In: *Appl Environ Microbiol* 69 (2003), Dec, Nr. 12, S. 7563–7566
- [45] DIEN, Stephen J V. ; STROVAS, Tim ; LIDSTROM, Mary E.: Quantification of central metabolic fluxes in the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1 using ¹³C-label tracing and mass spectrometry. In: *Biotechnol*

- Bioeng* 84 (2003), Oct, Nr. 1, 45-55. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.10745>. – DOI 10.1002/bit.10745
- [46] DIENI, Christopher A. ; STOREY, Kenneth B.: Regulation of 5'-adenosine monophosphate deaminase in the freeze tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. In: *BMC Biochem* 9 (2008), 12. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2091-9-12>. – DOI 10.1186/1471-2091-9-12
- [47] DUARTE, Natalie C. ; BECKER, Scott A. ; JAMSHIDI, Neema ; THIELE, Ines ; MO, Monica L. ; VO, Thuy D. ; SRIVAS, Rohith ; PALSSON, Bernhard O.: Global reconstruction of the human metabolic network based on genomic and bibliomic data. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007), Feb, Nr. 6, 1777-1782. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0610772104>. – DOI 10.1073/pnas.0610772104
- [48] EBENHÖH, Oliver ; HANDORF, Thomas: Functional classification of genome-scale metabolic networks. In: *EURASIP J Bioinform Syst Biol* (2009), 570456. <http://dx.doi.org/10.1155/2009/570456>. – DOI 10.1155/2009/570456
- [49] EDWARDS, JS ; IBARRA, RU ; PALSSON, BO: In silico predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. In: *Nat Biotechnol* 19 (2001), Feb, Nr. 2, 125-30. <http://dx.doi.org/10.1038/84379>. – DOI 10.1038/84379
- [50] EMMERLING, Marcel ; DAUNER, Michael ; PONTI, Aaron ; FIAUX, Jocelyne ; HOCHULI, Michel ; SZYPERSKI, Thomas ; W?THRICH, Kurt ; BAILEY, J. E. ; SAUER, Uwe: Metabolic flux responses to pyruvate kinase knockout in *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 184 (2002), Jan, Nr. 1, S. 152-164
- [51] FAMILI, Iman ; PALSSON, Bernhard O.: Systemic metabolic reactions are obtained by singular value decomposition of genome-scale stoichiometric matrices. In: *J Theor Biol* 224 (2003), Sep, Nr. 1, S. 87-96
- [52] FEIST, Adam M. ; HENRY, Christopher S. ; REED, Jennifer L. ; KRUMMENACKER, Markus ; JOYCE, Andrew R. ; KARP, Peter D. ; BROADBELT, Linda J. ; HATZIMANIKATIS, Vassily ; PALSSON, Bernhard O.: A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. In: *Mol Syst Biol* 3 (2007), 121. <http://dx.doi.org/10.1038/msb4100155>. – DOI 10.1038/msb4100155
- [53] FEIST, Adam M. ; HERRGARD, Markus J. ; THIELE, Ines ; REED, Jennie L. ; PALSSON, Bernhard O.: Reconstruction of biochemical networks in microorganisms. In: *Nat Rev Microbiol* 7 (2009), Feb, Nr. 2, 129-143. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1949>. – DOI 10.1038/nrmicro1949
- [54] FELL, D. A. ; SMALL, J. R.: Fat synthesis in adipose tissue. An examination of stoichiometric constraints. In: *Biochem J* 238 (1986), Sep, Nr. 3, S. 781-786
- [55] FELL, David A.: Enzymes, metabolites and fluxes. In: *J Exp Bot* 56 (2005), Jan, Nr. 410, 267-272. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/eri011>. – DOI 10.1093/jxb/eri011
- [56] FENDT, Sarah-Maria ; BUESCHER, Joerg M. ; RUDROFF, Florian ; PICOTTI, Paola ; ZAMBONI, Nicola ; SAUER, Uwe: Tradeoff between enzyme and metabolite

- efficiency maintains metabolic homeostasis upon perturbations in enzyme capacity. In: *Mol Syst Biol* 6 (2010), Apr, 356. <http://dx.doi.org/10.1038/msb.2010.11>. – DOI 10.1038/msb.2010.11
- [57] FERENCI, T.: Adaptation to life at micromolar nutrient levels: the regulation of *Escherichia coli* glucose transport by endoinduction and cAMP. In: *FEMS Microbiol Rev* 18 (1996), Jul, Nr. 4, S. 301–317
- [58] FERGUSON, G. P. ; TÖTEMAYER, S. ; MACLEAN, M. J. ; BOOTH, I. R.: Methylglyoxal production in bacteria: suicide or survival? In: *Arch Microbiol* 170 (1998), Oct, Nr. 4, S. 209–218
- [59] FISCHER, Eliane ; SAUER, Uwe: Metabolic flux profiling of *Escherichia coli* mutants in central carbon metabolism using GC-MS. In: *Eur J Biochem* 270 (2003), Mar, Nr. 5, S. 880–91
- [60] FISCHER, Eliane ; SAUER, Uwe: Large-scale in vivo flux analysis shows rigidity and suboptimal performance of *Bacillus subtilis* metabolism. In: *Nat Genet* 37 (2005), Jun, Nr. 6, 636–640. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1555>. – DOI 10.1038/ng1555
- [61] FORBES, N. S. ; CLARK, D. S. ; BLANCH, H. W.: Using isotopomer path tracing to quantify metabolic fluxes in pathway models containing reversible reactions. In: *Biotechnol Bioeng* 74 (2001), Aug, Nr. 3, S. 196–211
- [62] FRANCKE, Christof ; SIEZEN, Roland J. ; TEUSINK, Bas: Reconstructing the metabolic network of a bacterium from its genome. In: *Trends Microbiol* 13 (2005), Nov, Nr. 11, 550–558. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2005.09.001>. – DOI 10.1016/j.tim.2005.09.001
- [63] FRISHMAN, Dmitrij ; MOKREJS, Martin ; KOSYKH, Denis ; KASTENMÜLLER, Gabi ; KOLESOV, Grigory ; ZUBRZYCKI, Igor ; GRUBER, Christian ; GEIER, Birgitta ; KAPS, Andreas ; ALBERMANN, Kaj ; VOLZ, Andreas ; WAGNER, Christian ; FELLEBERG, Matthias ; HEUMANN, Klaus ; MEWES, Hans-Werner: The PEDANT genome database. In: *Nucleic Acids Res* 31 (2003), Jan, Nr. 1, S. 207–211
- [64] FUHRER, Tobias ; FISCHER, Eliane ; SAUER, Uwe: Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. In: *J Bacteriol* 187 (2005), Mar, Nr. 5, 1581–1590. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.5.1581-1590.2005>. – DOI 10.1128/JB.187.5.1581–1590.2005
- [65] GAGNEUR, Julien ; KLAMT, Steffen: Computation of elementary modes: a unifying framework and the new binary approach. In: *BMC Bioinformatics* 5 (2004), Nr. 1, 175. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-5-175>. – DOI 10.1186/1471-2105-5-175
- [66] GHOSH, A. ; CHANCE, B.: Oscillations of glycolytic intermediates in yeast cells. In: *Biochem Biophys Res Commun* 16 (1964), Jun, Nr. 2, S. 174–181
- [67] GILLE, Christoph ; BÖLLING, Christian ; HOPPE, Andreas ; BULIK, Sascha ; HOFFMANN, Sabrina ; HÜBNER, Katrin ; KARLSTÄDT, Anja ; GANESHAN, Ramanan ; KÖNIG, Matthias ; ROTHER, Kristian ; WEIDLICH, Michael ; BEHRE, Jörn ; HOLZHÜTTER, Herrmann-Georg: HepatoNet1: a comprehensive metabolic

- reconstruction of the human hepatocyte for the analysis of liver physiology. In: *Mol Syst Biol* 6 (2010), Sep, 411. <http://dx.doi.org/10.1038/msb.2010.62>. – DOI 10.1038/msb.2010.62
- [68] GLASNER, Jeremy D. ; LISS, Paul ; PLUNKETT, Guy ; DARLING, Aaron ; PRASAD, Tejasvini ; RUSCH, Michael ; BYRNES, Alexis ; GILSON, Michael ; BIEHL, Bryan ; BLATTNER, Frederick R. ; PERNA, Nicole T.: ASAP, a systematic annotation package for community analysis of genomes. In: *Nucleic Acids Res* 31 (2003), Jan, Nr. 1, S. 147–151
- [69] GLASNER, Jeremy D. ; RUSCH, Michael ; LISS, Paul ; PLUNKETT, Guy ; CABOT, Eric L. ; DARLING, Aaron ; ANDERSON, Bradley D. ; INFIELD-HARM, Paul ; GILSON, Michael C. ; PERNA, Nicole T.: ASAP: a resource for annotating, curating, comparing, and disseminating genomic data. In: *Nucleic Acids Res* 34 (2006), Jan, Nr. Database issue, D41–D45. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkj164>. – DOI 10.1093/nar/gkj164
- [70] GOLDBERG, Robert N. ; TEWARI, Yadu B. ; BHAT, Talapady N.: Thermodynamics of enzyme-catalyzed reactions—a database for quantitative biochemistry. In: *Bioinformatics* 20 (2004), Nov, Nr. 16, 2874–2877. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bth314>. – DOI 10.1093/bioinformatics/bth314
- [71] GREEN, Michelle L. ; KARP, Peter D.: A Bayesian method for identifying missing enzymes in predicted metabolic pathway databases. In: *BMC Bioinformatics* 5 (2004), Jun, 76. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-5-76>. – DOI 10.1186/1471-2105-5-76
- [72] GRIMBS, Sergio ; SELBIG, Joachim ; BULIK, Sascha ; HOLZHÜTTER, Hermann-Georg ; STEUER, Ralf: The stability and robustness of metabolic states: identifying stabilizing sites in metabolic networks. In: *Mol Syst Biol* 3 (2007), 146. <http://dx.doi.org/10.1038/msb4100186>. – DOI 10.1038/msb4100186
- [73] GROVER, Gary J. ; ATWAL, Karnail S. ; SLEPH, Paul G. ; WANG, Feng-Li ; MONSHIZADEGAN, Hossain ; MONTICELLO, Thomas ; GREEN, David W.: Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F1F0-ATPase: effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolyase activity. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287 (2004), Oct, Nr. 4, H1747–H1755. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.01019.2003>. – DOI 10.1152/ajpheart.01019.2003
- [74] HAMMERSTEIN, P. ; HAGEN, E.H. ; HERZ, A.V.M. ; HERZEL, H.: Robustness: A Key to Evolutionary Design. In: *Biological Theory* 1 (2006), S. 90–93
- [75] HAN, Jing-Dong J. ; BERTIN, Nicolas ; HAO, Tong ; GOLDBERG, Debra S. ; BERRIZ, Gabriel F. ; ZHANG, Lan V. ; DUPUY, Denis ; WALHOUT, Albertha J M. ; CUSICK, Michael E. ; ROTH, Frederick P. ; VIDAL, Marc: Evidence for dynamically organized modularity in the yeast protein-protein interaction network. In: *Nature* 430 (2004), Jul, Nr. 6995, 88–93. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02555>. – DOI 10.1038/nature02555
- [76] HARTWELL, L. H. ; HOPFIELD, J. J. ; LEIBLER, S. ; MURRAY, A. W.: From molecular to modular cell biology. In: *Nature* 402 (1999), Dec, Nr. 6761 Suppl,

- C47–C52. <http://dx.doi.org/10.1038/35011540>. – DOI 10.1038/35011540
- [77] HEINEMANN, Matthias ; KÜMMEL, Anne ; RUINATSCHA, Reto ; PANKE, Sven: In silico genome-scale reconstruction and validation of the *Staphylococcus aureus* metabolic network. In: *Biotechnol Bioeng* 92 (2005), Dec, Nr. 7, 850–864. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20663>. – DOI 10.1002/bit.20663
- [78] HENRY, Christopher S. ; BROADBELT, Linda J. ; HATZIMANIKATIS, Vassily: Thermodynamics-based metabolic flux analysis. In: *Biophys J* 92 (2007), Mar, Nr. 5, 1792–1805. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.093138>. – DOI 10.1529/biophysj.106.093138
- [79] HENRY, Christopher S. ; JANKOWSKI, Matthew D. ; BROADBELT, Linda J. ; HATZIMANIKATIS, Vassily: Genome-scale thermodynamic analysis of *Escherichia coli* metabolism. In: *Biophys J* 90 (2006), Feb, Nr. 4, 1453–1461. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.105.071720>. – DOI 10.1529/biophysj.105.071720
- [80] HERRGARD, Markus J. ; FONG, Stephen S. ; PALSSON, Bernhard O.: Identification of genome-scale metabolic network models using experimentally measured flux profiles. In: *PLoS Comput Biol* 2 (2006), Jul, Nr. 7, e72. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020072>. – DOI 10.1371/journal.pcbi.0020072
- [81] HOFFMANN, Sabrina ; HOLZHÜTTER, Hermann-Georg: Uncovering metabolic objectives pursued by changes of enzyme levels. In: *Ann N Y Acad Sci* 1158 (2009), Mar, 57–70. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03753.x>. – DOI 10.1111/j.1749-6632.2008.03753.x
- [82] HOLZHÜTTER, H. G. ; JACOBASCH, G. ; BISDORFF, A.: Mathematical modelling of metabolic pathways affected by an enzyme deficiency. A mathematical model of glycolysis in normal and pyruvate-kinase-deficient red blood cells. In: *Eur J Biochem* 149 (1985), May, Nr. 1, S. 101–111
- [83] HOLZHÜTTER, Hermann-Georg: The principle of flux minimization and its application to estimate stationary fluxes in metabolic networks. In: *Eur J Biochem* 271 (2004), Jul, Nr. 14, 2905–22. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04213.x>. – DOI 10.1111/j.1432-1033.2004.04213.x
- [84] HOLZHÜTTER, Hermann-Georg: The generalized flux-minimization method and its application to metabolic networks affected by enzyme deficiencies. In: *Biosystems* 83 (2006), Nr. 2-3, 98–107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystems.2005.04.008>. – DOI 10.1016/j.biosystems.2005.04.008
- [85] HOLZHÜTTER, Scott ; HOLZHÜTTER, Hermann-Georg: Computational design of reduced metabolic networks. In: *Chembiochem* 5 (2004), Oct, Nr. 10, 1401–22. <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.200400128>. – DOI 10.1002/cbic.200400128
- [86] HOPPE, Andreas ; HOFFMANN, Sabrina ; GERASCH, Andreas ; GILLE, Christoph ; HOLZHÜTTER, Hermann-Georg: FASIMU: flexible software for flux-balance computation series in large metabolic networks. In: *BMC Bioinformatics* 12 (2011), 28. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-12-28>. – DOI 10.1186/1471-2105-12-28
- [87] HOPPE, Andreas ; HOFFMANN, Sabrina ; HOLZHÜTTER, Hermann-Georg: Inclu-

- ding metabolite concentrations into flux balance analysis: thermodynamic realizability as a constraint on flux distributions in metabolic networks. In: *BMC Syst Biol* 1 (2007), 23. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-1-23>. – DOI 10.1186/1752-0509-1-23
- [88] HUERTA-SANCHEZ, Emilia ; DURRETT, Rick: Wagner’s canalization model. In: *Theor Popul Biol* 71 (2007), Mar, Nr. 2, 121–130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tpb.2006.10.006>. – DOI 10.1016/j.tpb.2006.10.006
- [89] IHMELS, Jan ; LEVY, Ronen ; BARKAI, Naama: Principles of transcriptional control in the metabolic network of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Nat Biotechnol* 22 (2004), Jan, Nr. 1, 86–92. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt918>. – DOI 10.1038/nbt918
- [90] IMIELINSKI, Marcin ; BELTA, Calin ; HALASZ, Adam ; RUBIN, Harvey: Investigating metabolite essentiality through genome-scale analysis of *Escherichia coli* production capabilities. In: *Bioinformatics* 21 (2005), May, Nr. 9, 2008–2016. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti245>. – DOI 10.1093/bioinformatics/bti245
- [91] IMIELINSKI, Marcin ; BELTA, Calin ; RUBIN, Harvey ; HALASZ, Adam: Systematic analysis of conservation relations in *Escherichia coli* genome-scale metabolic network reveals novel growth media. In: *Biophys J* 90 (2006), Apr, Nr. 8, 2659–2672. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.105.069278>. – DOI 10.1529/biophysj.105.069278
- [92] INSTITUTE, S. F. ; (HRSG.), Erica J. (Hrsg.): *Robust Design: A Repertoire of Biological, Ecological, and Engineering Case Studies (Santa Fe Institute Studies on the Science of Complexity)*. Oxford University Press, 2005. <http://dx.doi.org/ISBN0195165330>. <http://dx.doi.org/ISBN0195165330>
- [93] ISHII, Nobuyoshi ; NAKAHIGASHI, Kenji ; BABA, Tomoya ; ROBERT, Martin ; SOGA, Tomoyoshi ; KANAI, Akio ; HIRASAWA, Takashi ; NABA, Miki ; HIRAI, Kenta ; HOQUE, Aminul ; HO, Pei Y. ; KAKAZU, Yuji ; SUGAWARA, Kaori ; IGARASHI, Saori ; HARADA, Satoshi ; MASUDA, Takeshi ; SUGIYAMA, Naoyuki ; TOGASHI, Takashi ; HASEGAWA, Miki ; TAKAI, Yuki ; YUGI, Katsuyuki ; ARAKAWA, Kazuharu ; IWATA, Nayuta ; TOYA, Yoshihiro ; NAKAYAMA, Yoichi ; NISHIOKA, Takaaki ; SHIMIZU, Kazuyuki ; MORI, Hirotada ; TOMITA, Masaru: Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations. In: *Science* 316 (2007), Apr, Nr. 5824, 593–597. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1132067>. – DOI 10.1126/science.1132067
- [94] ITO, Mikito ; BABA, Tomoya ; MORI, Hirotada ; MORI, Hideo: Functional analysis of 1440 *Escherichia coli* genes using the combination of knock-out library and phenotype microarrays. In: *Metab Eng* 7 (2005), Jul, Nr. 4, 318–327. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2005.06.004>. – DOI 10.1016/j.ymben.2005.06.004
- [95] IUCHI, S. ; LIN, E. C.: The *narL* gene product activates the nitrate reductase operon and represses the fumarate reductase and trimethylamine N-oxide reductase operons in *Escherichia coli*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987), Jun, Nr. 11, S. 3901–3905

- [96] JANKOWSKI, Matthew D. ; HENRY, Christopher S. ; BROADBELT, Linda J. ; HATZIMANIKATIS, Vassily: Group contribution method for thermodynamic analysis of complex metabolic networks. In: *Biophys J* 95 (2008), Aug, Nr. 3, 1487–1499. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.124784>. – DOI 10.1529/biophysj.107.124784
- [97] JOYCE, Andrew R. ; REED, Jennifer L. ; WHITE, Aprilfawn ; EDWARDS, Robert ; OSTERMAN, Andrei ; BABA, Tomoya ; MORI, Hirotada ; LESELY, Scott A. ; PALSSON, Bernhard O. ; AGARWALLA, Sanjay: Experimental and computational assessment of conditionally essential genes in *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 188 (2006), Dec, Nr. 23, 8259–8271. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00740-06>. – DOI 10.1128/JB.00740-06
- [98] KAHN, P.: From genome to proteome: looking at a cell's proteins. In: *Science* 270 (1995), Oct, Nr. 5235, S. 369–370
- [99] KALAPOS, M. P.: Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. In: *Toxicol Lett* 110 (1999), Nov, Nr. 3, S. 145–175
- [100] KANEHISA, Minoru ; GOTO, Susumu ; HATTORI, Masahiro ; AOKI-KINOSHITA, Kiyoko F. ; ITOH, Masumi ; KAWASHIMA, Shuichi ; KATAYAMA, Toshiaki ; ARAKI, Michihiro ; HIRAKAWA, Mika: From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. In: *Nucleic Acids Res* 34 (2006), Jan, Nr. Database issue, D354–D357. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkj102>. – DOI 10.1093/nar/gkj102
- [101] KANTOROVICH, L. V.: Mathematical Methods of Organizing and Planning Production. In: *Management Science* 6 (1960), Nr. 4, S. 366–422
- [102] KARMAKAR, Narendra: A New Polynomial Time Algorithm for Linear Programming. In: *Combinatorica* 4 (1984), Nr. 4, 373–395. <http://www.eecs.berkeley.edu/~orecchia/working/karmakar%20full.pdf>
- [103] KIM, Hyun U. ; KIM, Tae Y. ; LEE, Sang Y.: Metabolic flux analysis and metabolic engineering of microorganisms. In: *Mol Biosyst* 4 (2008), Feb, Nr. 2, 113–120. <http://dx.doi.org/10.1039/b712395g>. – DOI 10.1039/b712395g
- [104] KITANO, Hiroaki: Looking beyond the details: a rise in system-oriented approaches in genetics and molecular biology. In: *Curr Genet* 41 (2002), Apr, Nr. 1, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-002-0285-z>. – DOI 10.1007/s00294-002-0285-z
- [105] KITANO, Hiroaki: Biological robustness. In: *Nat Rev Genet* 5 (2004), Nov, Nr. 11, 826–837. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1471>. – DOI 10.1038/nrg1471
- [106] KLAMT, Steffen: Generalized concept of minimal cut sets in biochemical networks. In: *Biosystems* 83 (2006), Nr. 2-3, 233–247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystems.2005.04.009>. – DOI 10.1016/j.biosystems.2005.04.009
- [107] KLAMT, Steffen ; GILLES, Ernst D.: Minimal cut sets in biochemical reaction networks. In: *Bioinformatics* 20 (2004), Jan, Nr. 2, S. 226–34

- [108] KLAMT, Steffen ; SAEZ-RODRIGUEZ, Julio ; GILLES, Ernst D.: Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer. In: *BMC Syst Biol* 1 (2007), 2. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-1-2>. – DOI 10.1186/1752-0509-1-2
- [109] KLAMT, Steffen ; SCHUSTER, Stefan ; GILLES, Ernst D.: Calculability analysis in underdetermined metabolic networks illustrated by a model of the central metabolism in purple nonsulfur bacteria. In: *Biotechnol Bioeng* 77 (2002), Mar, Nr. 7, 734-51. <http://www3.interscience.wiley.com/journal/89016963/abstract>
- [110] KLAMT, Steffen ; STELLING, Jörg: Combinatorial complexity of pathway analysis in metabolic networks. In: *Mol Biol Rep* 29 (2002), Nr. 1-2, S. 233-6
- [111] KLAMT, Steffen ; STELLING, Jörg: Two approaches for metabolic pathway analysis? In: *Trends Biotechnol* 21 (2003), Feb, Nr. 2, S. 64-9
- [112] KLAMT, Steffen ; STELLING, Jörg ; GINKEL, Martin ; GILLES, Ernst D.: FluxAnalyzer: exploring structure, pathways, and flux distributions in metabolic networks on interactive flux maps. In: *Bioinformatics* 19 (2003), Jan, Nr. 2, S. 261-9
- [113] KOROTKOVA, Natalia ; LIDSTROM, Mary E. ; CHISTOSERDOVA, Ludmila: Identification of genes involved in the glyoxylate regeneration cycle in *Methylobacterium extorquens* AM1, including two new genes, *meaC* and *meaD*. In: *J Bacteriol* 187 (2005), Feb, Nr. 4, 1523-6. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.4.1523-1526.2005>. – DOI 10.1128/JB.187.4.1523-1526.2005
- [114] KOTERA, Masaaki ; OKUNO, Yasushi ; HATTORI, Masahiro ; GOTO, Susumu ; KANEHISA, Minoru: Computational assignment of the EC numbers for genomic-scale analysis of enzymatic reactions. In: *J Am Chem Soc* 126 (2004), Dec, Nr. 50, 16487-16498. <http://dx.doi.org/10.1021/ja0466457>. – DOI 10.1021/ja0466457
- [115] KRAKAUER, David C. ; PLOTKIN, Joshua B.: Redundancy, antiredundancy, and the robustness of genomes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), Feb, Nr. 3, 1405-1409. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.032668599>. – DOI 10.1073/pnas.032668599
- [116] KRÖMER, Jens O. ; WITTMANN, Christoph ; SCHRÖDER, Hartwig ; HEINZLE, Elmar: Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. In: *Metab Eng* 8 (2006), Jul, Nr. 4, 353-369. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2006.02.001>. – DOI 10.1016/j.ymben.2006.02.001
- [117] KUMAR, Vinay S. ; DASIKA, Madhukar S. ; MARANAS, Costas D.: Optimization based automated curation of metabolic reconstructions. In: *BMC Bioinformatics* 8 (2007), 212. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-8-212>. – DOI 10.1186/1471-2105-8-212
- [118] KURT LECHER, Ulrich C. E. Z. Hans-Peter Lühr L. Hans-Peter Lühr: *Taschenbuch der Wasserwirtschaft*. Vieweg, 2001
- [119] KÜMMEL, Anne ; PANKE, Sven ; HEINEMANN, Matthias: Putative regulatory

- sites unraveled by network-embedded thermodynamic analysis of metabolome data. In: *Mol Syst Biol* 2 (2006), 2006.0034. <http://dx.doi.org/10.1038/msb4100074>. – DOI 10.1038/msb4100074
- [120] KÜMMEL, Anne ; PANKE, Sven ; HEINEMANN, Matthias: Systematic assignment of thermodynamic constraints in metabolic network models. In: *BMC Bioinformatics* 7 (2006), 512. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-7-512>. – DOI 10.1186/1471-2105-7-512
- [121] LI, Mai ; HO, Pei Y. ; YAO, Shanjing ; SHIMIZU, Kazuyuki: Effect of lpdA gene knockout on the metabolism in Escherichia coli based on enzyme activities, intracellular metabolite concentrations and metabolic flux analysis by ¹³C-labeling experiments. In: *J Biotechnol* 122 (2006), Mar, Nr. 2, 254–266. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.09.016>. – DOI 10.1016/j.jbiotec.2005.09.016
- [122] LOTIERZO, M. ; BUI, B. Tse S. ; FLORENTIN, D. ; ESCALETES, F. ; MARQUET, A.: Biotin synthase mechanism: an overview. In: *Biochem Soc Trans* 33 (2005), Aug, Nr. Pt 4, 820–823. <http://dx.doi.org/10.1042/BST0330820>. – DOI 10.1042/BST0330820
- [123] MA, Hongwu ; SOROKIN, Anatoly ; MAZEIN, Alexander ; SELKOV, Alex ; SELKOV, Evgeni ; DEMIN, Oleg ; GORYANIN, Igor: The Edinburgh human metabolic network reconstruction and its functional analysis. In: *Mol Syst Biol* 3 (2007), 135. <http://dx.doi.org/10.1038/msb4100177>. – DOI 10.1038/msb4100177
- [124] MAHADEVAN, R. ; SCHILLING, C. H.: The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. In: *Metab Eng* 5 (2003), Oct, Nr. 4, S. 264–276
- [125] MAJEWSKI, R. A. ; DOMACH, M. M.: Simple constrained-optimization view of acetate overflow in E. coli. In: *Biotechnol Bioeng* 35 (1990), Mar, Nr. 7, 732–738. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260350711>. – DOI 10.1002/bit.260350711
- [126] MALINIEMI, Pilvi ; KERVINEN, Marko ; HASSINEN, Ilmo E.: Modeling of human pathogenic mutations in Escherichia coli complex I reveals a sensitive region in the fourth inside loop of NuoH. In: *Mitochondrion* 9 (2009), Nov, Nr. 6, 394–401. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2009.07.001>. – DOI 10.1016/j.mito.2009.07.001
- [127] MATSUSHITA, K. ; ARENTS, J. C. ; BADER, R. ; YAMADA, M. ; ADACHI, O. ; POSTMA, P. W.: Escherichia coli is unable to produce pyrroloquinoline quinone (PQQ). In: *Microbiology* 143 (Pt 10) (1997), Oct, S. 3149–3156
- [128] MATTHÄUS, Franziska ; SALAZAR, Carlos ; EBENHÖH, Oliver: Biosynthetic potentials of metabolites and their hierarchical organization. In: *PLoS Comput Biol* 4 (2008), Apr, Nr. 4, e1000049. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000049>. – DOI 10.1371/journal.pcbi.1000049
- [129] MAVROVOUNIOTIS, M. L.: Group contributions for estimating standard gibbs energies of formation of biochemical compounds in aqueous solution. In: *Biotechnol Bioeng* 36 (1990), Dec, Nr. 10, 1070–1082. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260361013>. – DOI 10.1002/bit.260361013

- [130] MAVROVOUNIOTIS, M. L.: Estimation of standard Gibbs energy changes of biotransformations. In: *J Biol Chem* 266 (1991), Aug, Nr. 22, S. 14440–14445
- [131] MERLIN, Christophe ; MASTERS, Millicent ; MCATEER, Sean ; COULSON, Andrew: Why is carbonic anhydrase essential to *Escherichia coli*? In: *J Bacteriol* 185 (2003), Nov, Nr. 21, S. 6415–6424
- [132] MITCHELL, Sandra D.: Modularity - More Than a Buzzword? In: *Biol. Theory* 1 (2006), S. 98–101
- [133] NAGRATH, Deepak ; AVILA-ELCHIVER, Marco ; BERTHIAUME, Francois ; TILLES, Arno W. ; MESSAC, Achille ; YARMUSH, Martin L.: Integrated energy and flux balance based multiobjective framework for large-scale metabolic networks. In: *Ann Biomed Eng* 35 (2007), Jun, Nr. 6, 863–885. <http://dx.doi.org/10.1007/s10439-007-9283-0>. – DOI 10.1007/s10439-007-9283-0
- [134] NAGRATH, Deepak ; AVILA-ELCHIVER, Marco ; BERTHIAUME, François ; TILLES, Arno W. ; MESSAC, Achille ; YARMUSH, Martin L.: Soft constraints-based multiobjective framework for flux balance analysis. In: *Metab Eng* 12 (2010), Sep, Nr. 5, 429–445. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2010.05.003>. – DOI 10.1016/j.ymben.2010.05.003
- [135] NANCHEN, Annik ; SCHICKER, Alexander ; SAUER, Uwe: Nonlinear dependency of intracellular fluxes on growth rate in miniaturized continuous cultures of *Escherichia coli*. In: *Appl Environ Microbiol* 72 (2006), Feb, Nr. 2, 1164–1172. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.2.1164-1172.2006>. – DOI 10.1128/AEM.72.2.1164–1172.2006
- [136] NEIDHARDT, F.C. ; NEIDHARDT, F.C. (Hrsg.): *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology Bd. 2*. American Society for Microbiology, 1987. <http://dx.doi.org/ISBN9780914826897>. <http://dx.doi.org/ISBN9780914826897>
- [137] NIELSEN, Jens: It is all about metabolic fluxes. In: *J Bacteriol* 185 (2003), Dec, Nr. 24, S. 7031–7035
- [138] NIELSEN, Jens: Principles of optimal metabolic network operation. In: *Mol Syst Biol* 3 (2007), 126. <http://dx.doi.org/10.1038/msb4100169>. – DOI 10.1038/msb4100169
- [139] NIKOLAEV, Evgeni V. ; BURGARD, Anthony P. ; MARANAS, Costas D.: Elucidation and structural analysis of conserved pools for genome-scale metabolic reconstructions. In: *Biophys J* 88 (2005), Jan, Nr. 1, 37–49. <http://dx.doi.org/489>. – DOI 489
- [140] NOTEBAART, Richard A. ; ENCKEVORT, Frank H J. ; FRANCKE, Christof ; SIEZEN, Roland J. ; TEUSINK, Bas: Accelerating the reconstruction of genome-scale metabolic networks. In: *BMC Bioinformatics* 7 (2006), 296. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-7-296>. – DOI 10.1186/1471–2105–7–296
- [141] OHASHI, Yoshiaki ; HIRAYAMA, Akiyoshi ; ISHIKAWA, Takamasa ; NAKAMURA, Seira ; SHIMIZU, Kaori ; UENO, Yuki ; TOMITA, Masaru ; SOGA, Tomoyoshi: Depiction of metabolome changes in histidine-starved *Escherichia coli* by CE-

- TOFMS. In: *Mol Biosyst* 4 (2008), Feb, Nr. 2, 135–147. <http://dx.doi.org/10.1039/b714176a>. – DOI 10.1039/b714176a
- [142] OLIVER, S. G. ; WINSON, M. K. ; KELL, D. B. ; BAGANZ, F.: Systematic functional analysis of the yeast genome. In: *Trends Biotechnol* 16 (1998), Sep, Nr. 9, S. 373–378
- [143] PALSSON, BO ; JAMIER, R ; LIGHTFOOT, EN: Mathematical modelling of dynamics and control in metabolic networks. II. Simple dimeric enzymes. In: *J Theor Biol* 111 (1984), Nov, Nr. 2, S. 303–21
- [144] PALSSON, BO ; LIGHTFOOT, EN: Mathematical modelling of dynamics and control in metabolic networks. I. On Michaelis-Menten kinetics. In: *J Theor Biol* 111 (1984), Nov, Nr. 2, S. 273–302
- [145] PAPIN, Jason A. ; PRICE, Nathan D. ; PALSSON, Bernhard O.: Extreme pathway lengths and reaction participation in genome-scale metabolic networks. In: *Genome Res* 12 (2002), Dec, Nr. 12, 1889–900. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.327702>. – DOI 10.1101/gr.327702
- [146] PAPIN, Jason A. ; PRICE, Nathan D. ; WIBACK, Sharon J. ; FELL, David A. ; PALSSON, Bernhard O.: Metabolic pathways in the post-genome era. In: *Trends Biochem Sci* 28 (2003), May, Nr. 5, S. 250–8
- [147] PAPIN, Jason A. ; STELLING, Joerg ; PRICE, Nathan D. ; KLAMT, Steffen ; SCHUSTER, Stefan ; PALSSON, Bernhard O.: Comparison of network-based pathway analysis methods. In: *Trends Biotechnol* 22 (2004), Aug, Nr. 8, 400–405. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.06.010>. – DOI 10.1016/j.tibtech.2004.06.010
- [148] PATIL, Kiran R. ; NIELSEN, Jens: Uncovering transcriptional regulation of metabolism by using metabolic network topology. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005), Feb, Nr. 8, 2685–2689. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0406811102>. – DOI 10.1073/pnas.0406811102
- [149] PEDERSEN, Anders ; KARLSSON, Göran B. ; RYDSTRÖM, Jan: Proton-translocating transhydrogenase: an update of unsolved and controversial issues. In: *J Bioenerg Biomembr* 40 (2008), Oct, Nr. 5, 463–473. <http://dx.doi.org/10.1007/s10863-008-9170-x>. – DOI 10.1007/s10863-008-9170-x
- [150] PFEIFFER, Thomas ; BONHOEFFER, Sebastian: An evolutionary scenario for the transition to undifferentiated multicellularity. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), Feb, Nr. 3, 1095–1098. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0335420100>. – DOI 10.1073/pnas.0335420100
- [151] PHARKYA, Priti ; MARANAS, Costas D.: An optimization framework for identifying reaction activation/inhibition or elimination candidates for overproduction in microbial systems. In: *Metab Eng* 8 (2006), Jan, Nr. 1, 1–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2005.08.003>. – DOI 10.1016/j.ymben.2005.08.003
- [152] POMPER, Barbara K. ; SAUREL, Olivier ; MILON, Alain ; VORHOLT, Julia A.: Generation of formate by the formyltransferase/hydrolase complex (Fhc) from *Methylobacterium extorquens* AM1. In: *FEBS Lett* 523 (2002), Jul, Nr. 1–3, S.

133–7

- [153] POOLMAN, M. G. ; BONDE, B. K. ; GEVORGYAN, A. ; PATEL, H. H. ; FELL, D. A.: Challenges to be faced in the reconstruction of metabolic networks from public databases. In: *Syst Biol (Stevenage)* 153 (2006), Sep, Nr. 5, S. 379–384
- [154] POTAPOV, A. P. ; SUBRAMANIAN, A. R.: Effect of *E. coli* ribosomal protein S1 on the fidelity of the translational elongation step: reading and misreading of poly(U) and poly(dT). In: *Biochem Int* 27 (1992), Aug, Nr. 4, S. 745–753
- [155] PRAMANIK, J. ; KEASLING, J. D.: Stoichiometric model of *Escherichia coli* metabolism: Incorporation of growth-rate dependent biomass composition and mechanistic energy requirements. In: *Biotechnol Bioeng* 56 (1997), Nov, Nr. 4, 398–421. <http://dx.doi.org/3.0.CO;2-J>. – DOI 3.0.CO;2-J
- [156] PRICE, Nathan D. ; FAMILI, Iman ; BEARD, Daniel A. ; PALSSON, Bernhard O.: Extreme pathways and Kirchhoff's second law. In: *Biophys J* 83 (2002), Nov, Nr. 5, S. 2879–2882
- [157] PÁL, Csaba ; PAPP, Balázs ; LERCHER, Martin J. ; CSERMELY, Péter ; OLIVER, Stephen G. ; HURST, Laurence D.: Chance and necessity in the evolution of minimal metabolic networks. In: *Nature* 440 (2006), Mar, Nr. 7084, 667–670. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04568>. – DOI 10.1038/nature04568
- [158] RAMAKRISHNA, R. ; EDWARDS, J. S. ; MCCULLOCH, A. ; PALSSON, B. O.: Flux-balance analysis of mitochondrial energy metabolism: consequences of systemic stoichiometric constraints. In: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280 (2001), Mar, Nr. 3, S. R695–R704
- [159] RAPOPORT, T. A. ; HEINRICH, R. ; RAPOPORT, S. M.: The regulatory principles of glycolysis in erythrocytes in vivo and in vitro. A minimal comprehensive model describing steady states, quasi-steady states and time-dependent processes. In: *Biochem J* 154 (1976), Feb, Nr. 2, S. 449–469
- [160] RAVASZ, E. ; SOMERA, A.L. ; MONGRU, D.A. ; OLTVAI, Z.N. ; BARABASI, A.L.: Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. In: *Science* 297 (2002), Nr. 5586, S. 1551–5
- [161] REED, Jennifer L. ; FAMILI, Iman ; THIELE, Ines ; PALSSON, Bernhard O.: Towards multidimensional genome annotation. In: *Nat Rev Genet* 7 (2006), Feb, Nr. 2, 130–141. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1769>. – DOI 10.1038/nrg1769
- [162] REED, Jennifer L. ; PALSSON, Bernhard O.: Genome-scale in silico models of *E. coli* have multiple equivalent phenotypic states: assessment of correlated reaction subsets that comprise network states. In: *Genome Res* 14 (2004), Sep, Nr. 9, 1797–1805. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.2546004>. – DOI 10.1101/gr.2546004
- [163] REED, Jennifer L. ; VO, Thuy D. ; SCHILLING, Christophe H. ; PALSSON, Bernhard O.: An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (iJR904 GSM/GPR). In: *Genome Biol* 4 (2003), Nr. 9, R54. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2003-4-9-r54>. – DOI 10.1186/gb-2003-4-9-r54

- [164] REITZ, Martin ; SACHER, Oliver ; TARKHOV, Aleksey ; TRUMBACH, Dietrich ; GASTEIGER, Johann: Enabling the exploration of biochemical pathways. In: *Org Biomol Chem* 2 (2004), Nov, Nr. 22, 3226–3237. <http://dx.doi.org/10.1039/B410949J>. – DOI 10.1039/B410949J
- [165] RIVES, Alexander W. ; GALITSKI, Timothy: Modular organization of cellular networks. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), Feb, Nr. 3, 1128–1133. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0237338100>. – DOI 10.1073/pnas.0237338100
- [166] ROJAS, Isabel ; GOLEBIEWSKI, Martin ; KANIA, Renate ; KREBS, Olga ; MIR, Saqib ; WEIDEMANN, Andreas ; WITTIG, Ulrike: Storing and annotating of kinetic data. In: *In Silico Biol* 7 (2007), Nr. 2 Suppl, S. S37–S44
- [167] ROTHER, Kristian ; HOFFMANN, Sabrina ; BULIK, Sascha ; HOPPE, Andreas ; GASTEIGER, Johann ; HOLZHÜTTER, Herrmann-Georg: ITERS: inferring Gibbs energy changes of biochemical reactions from reaction similarities. In: *Biophys J* 98 (2010), Jun, Nr. 11, 2478–2486. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2010.02.052>. – DOI 10.1016/j.bpj.2010.02.052
- [168] SARIS, Per E. ; LILJESTRÖM, Peter ; PALVA, E. T.: Nucleotide sequence of manX (ptsL) encoding the enzyme III^{Man} (II-A^{Man}) function in the phosphotransferase system of *Escherichia coli* K-12. In: *FEMS Microbiology Letters* 49 (1988), Nr. 1, 69–73. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb02684.x>
- [169] SAUER, U. ; LASKO, D. R. ; FIAUX, J. ; HOCHULI, M. ; GLASER, R. ; SZYPERSKI, T. ; W?THRICH, K. ; BAILEY, J. E.: Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of *Escherichia coli* central carbon metabolism. In: *J Bacteriol* 181 (1999), Nov, Nr. 21, S. 6679–6688
- [170] SAUER, Uwe: High-throughput phenomics: experimental methods for mapping fluxomes. In: *Curr Opin Biotechnol* 15 (2004), Feb, Nr. 1, 58–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2003.11.001>. – DOI 10.1016/j.copbio.2003.11.001
- [171] SAUER, Uwe ; EIKMANN, Bernhard J.: The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. In: *FEMS Microbiol Rev* 29 (2005), Sep, Nr. 4, 765–794. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.002>. – DOI 10.1016/j.femsre.2004.11.002
- [172] SAURO, Herbert M. ; INGALLS, Brian: Conservation analysis in biochemical networks: computational issues for software writers. In: *Biophys Chem* 109 (2004), Apr, Nr. 1, 1–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2003.08.009>. – DOI 10.1016/j.bpc.2003.08.009
- [173] SAVINELL, J. M. ; PALSSON, B. O.: Network analysis of intermediary metabolism using linear optimization. I. Development of mathematical formalism. In: *J Theor Biol* 154 (1992), Feb, Nr. 4, S. 421–454
- [174] SCHAFER, James R A. ; FELL, David A. ; ROTHMAN, Douglas ; SHULMAN, Robert G.: Protein phosphorylation can regulate metabolite concentrations rather than control flux: the example of glycogen synthase. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004), Feb, Nr. 6, 1485–1490. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas>.

0307299101. – DOI 10.1073/pnas.0307299101

- [175] SCHAUB, Jochen ; SCHIESLING, Carola ; REUSS, Matthias ; DAUNER, Michael: Integrated sampling procedure for metabolome analysis. In: *Biotechnol Prog* 22 (2006), Nr. 5, 1434–1442. <http://dx.doi.org/10.1021/bp050381q>. – DOI 10.1021/bp050381q
- [176] SCHELLENBERGER, Jan ; PARK, Junyoung O. ; CONRAD, Tom M. ; PALSSON, Bernhard O.: BiGG: a Biochemical Genetic and Genomic knowledgebase of large scale metabolic reconstructions. In: *BMC Bioinformatics* 11 (2010), 213. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-11-213>. – DOI 10.1186/1471-2105-11-213
- [177] SCHILLING, C. H. ; LETSCHER, D. ; PALSSON, B. O.: Theory for the systemic definition of metabolic pathways and their use in interpreting metabolic function from a pathway-oriented perspective. In: *J Theor Biol* 203 (2000), Apr, Nr. 3, 229–248. <http://dx.doi.org/10.1006/jtbi.2000.1073>. – DOI 10.1006/jtbi.2000.1073
- [178] SCHILLING, C. H. ; PALSSON, B. O.: Assessment of the metabolic capabilities of *Haemophilus influenzae* Rd through a genome-scale pathway analysis. In: *J Theor Biol* 203 (2000), Apr, Nr. 3, 249–283. <http://dx.doi.org/10.1006/jtbi.2000.1088>. – DOI 10.1006/jtbi.2000.1088
- [179] SCHILLING, CH ; SCHUSTER, S ; PALSSON, BO ; HEINRICH, R: Metabolic pathway analysis: basic concepts and scientific applications in the post-genomic era. In: *Biotechnol Prog* 15 (1999), Nr. 3, 296–303. <http://dx.doi.org/10.1021/bp990048k>. – DOI 10.1021/bp990048k
- [180] SCHILLING, Christophe H. ; COVERT, Markus W. ; FAMILI, Iman ; CHURCH, George M. ; EDWARDS, Jeremy S. ; PALSSON, Bernhard O.: Genome-scale metabolic model of *Helicobacter pylori* 26695. In: *J Bacteriol* 184 (2002), Aug, Nr. 16, S. 4582–93
- [181] SCHMIDT ; MARX ; GRAAF AA de ; WIECHERT ; SAHM ; NIELSEN ; VILLADSEN: ¹³C tracer experiments and metabolite balancing for metabolic flux analysis: comparing two approaches. In: *Biotechnol Bioeng* 58 (1998), Apr, Nr. 2-3, S. 254–7
- [182] SCHUETZ, Robert ; KUEPFER, Lars ; SAUER, Uwe: Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fluxes in *Escherichia coli*. In: *Mol Syst Biol* 3 (2007), 119. <http://dx.doi.org/10.1038/msb4100162>. – DOI 10.1038/msb4100162
- [183] SCHUSTER, R. ; HOLZHÜTTER, H. G.: Use of mathematical models for predicting the metabolic effect of large-scale enzyme activity alterations. Application to enzyme deficiencies of red blood cells. In: *Eur J Biochem* 229 (1995), Apr, Nr. 2, S. 403–418
- [184] SCHUSTER, S. ; DANDEKAR, T. ; FELL, D. A.: Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. In: *Trends Biotechnol* 17 (1999), Feb, Nr. 2, S. 53–60

- [185] SCHUSTER, S. ; FELL, D. A. ; DANDEKAR, T.: A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. In: *Nat Biotechnol* 18 (2000), Mar, Nr. 3, 326–332. <http://dx.doi.org/10.1038/73786>. – DOI 10.1038/73786
- [186] SCHUSTER, S. ; PFEIFFER, T. ; MOLDENHAUER, F. ; KOCH, I. ; DANDEKAR, T.: Exploring the pathway structure of metabolism: decomposition into subnetworks and application to *Mycoplasma pneumoniae*. In: *Bioinformatics* 18 (2002), Feb, Nr. 2, S. 351–361
- [187] SCHUSTER, Stefan ; KENANOV, Dimitar: Adenine and adenosine salvage pathways in erythrocytes and the role of S-adenosylhomocysteine hydrolase. A theoretical study using elementary flux modes. In: *FEBS J* 272 (2005), Oct, Nr. 20, 5278–5290. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04924.x>. – DOI 10.1111/j.1742-4658.2005.04924.x
- [188] SCHWARTZ, Jean-Marc ; KANEHISA, Minoru: A quadratic programming approach for decomposing steady-state metabolic flux distributions onto elementary modes. In: *Bioinformatics* 21 Suppl 2 (2005), Sep, ii204–ii205. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti1132>. – DOI 10.1093/bioinformatics/bti1132
- [189] SEGAL, Eran ; SHAPIRA, Michael ; REGEV, Aviv ; PE'ER, Dana ; BOTSTEIN, David ; KOLLER, Daphne ; FRIEDMAN, Nir: Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. In: *Nat Genet* 34 (2003), Jun, Nr. 2, 166–176. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1165>. – DOI 10.1038/ng1165
- [190] SEGRÈ, Daniel ; VITKUP, Dennis ; CHURCH, George M.: Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), Nov, Nr. 23, 15112–7. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.232349399>. – DOI 10.1073/pnas.232349399
- [191] SHIMIZU, Kazuyuki: Metabolic flux analysis based on ¹³C-labeling experiments and integration of the information with gene and protein expression patterns. In: *Adv Biochem Eng Biotechnol* 91 (2004), S. 1–49
- [192] SHLOMI, Tomer ; BERKMAN, Omer ; RUPPIN, Eytan: Regulatory on/off minimization of metabolic flux changes after genetic perturbations. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005), May, Nr. 21, 7695–7700. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0406346102>. – DOI 10.1073/pnas.0406346102
- [193] SHLOMI, Tomer ; EISENBERG, Yariv ; SHARAN, Roded ; RUPPIN, Eytan: A genome-scale computational study of the interplay between transcriptional regulation and metabolism. In: *Mol Syst Biol* 3 (2007), 101. <http://dx.doi.org/10.1038/msb4100141>. – DOI 10.1038/msb4100141
- [194] SIMONSON, Tatum S. ; YANG, Yingzhong ; HUFF, Chad D. ; YUN, Haixia ; QIN, Ga ; WITHERSPOON, David J. ; BAI, Zhenzhong ; LORENZO, Felipe R. ; XING, Jinchuan ; JORDE, Lynn B. ; PRCHAL, Josef T. ; GE, Rili: Genetic Evidence for High-Altitude Adaptation in Tibet. In: *Science* (2010), May. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1189406>. – DOI 10.1126/science.1189406

- [195] STELLING, Jörg ; KLAMT, Steffen ; BETTENBROCK, Katja ; SCHUSTER, Stefan ; GILLES, Ernst D.: Metabolic network structure determines key aspects of functionality and regulation. In: *Nature* 420 (2002), Nov, Nr. 6912, 190-3. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01166>. – DOI 10.1038/nature01166
- [196] STEUER, Ralf ; GROSS, Thilo ; SELBIG, Joachim ; BLASIUS, Bernd: Structural kinetic modeling of metabolic networks. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006), Aug, Nr. 32, 11868–11873. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0600013103>. – DOI 10.1073/pnas.0600013103
- [197] SWAINSTON, Neil ; GOLEBIEWSKI, Martin ; MESSIHA, Hanan L. ; MALYS, Naglis ; KANIA, Renate ; KENGNE, Sylvestre ; KREBS, Olga ; MIR, Saqib ; SAUER-DANZWITZ, Heidrun ; SMALLBONE, Kieran ; WEIDEMANN, Andreas ; WITIG, Ulrike ; KELL, Douglas B. ; MENDES, Pedro ; MÜLLER, Wolfgang ; PATON, Norman W. ; ROJAS, Isabel: Enzyme kinetics informatics: from instrument to browser. In: *FEBS J* 277 (2010), Sep, Nr. 18, 3769–3779. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07778.x>. – DOI 10.1111/j.1742-4658.2010.07778.x
- [198] TABLE ecocyc 12.5 Genes l.: <http://ecocyc.org/gene-links.shtml>. <http://ecocyc.org/gene-links.shtml>
- [199] TANAY, Amos ; SHARAN, Roded ; KUPIEC, Martin ; SHAMIR, Ron: Revealing modularity and organization in the yeast molecular network by integrated analysis of highly heterogeneous genomewide data. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004), Mar, Nr. 9, 2981–2986. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0308661100>. – DOI 10.1073/pnas.0308661100
- [200] TERZER, Marco ; STELLING, Jörg: Large-scale computation of elementary flux modes with bit pattern trees. In: *Bioinformatics* 24 (2008), Oct, Nr. 19, 2229–2235. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btn401>. – DOI 10.1093/bioinformatics/btn401
- [201] THIELE, Ines ; PALSSON, Bernhard O.: A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. In: *Nat Protoc* 5 (2010), Nr. 1, 93–121. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.203>. – DOI 10.1038/nprot.2009.203
- [202] TRAN, Q. H. ; BONGAERTS, J. ; VLAD, D. ; UNDEN, G.: Requirement for the proton-pumping NADH dehydrogenase I of Escherichia coli in respiration of NADH to fumarate and its bioenergetic implications. In: *Eur J Biochem* 244 (1997), Feb, Nr. 1, S. 155–160
- [203] TÖTEMMEYER, S. ; BOOTH, N. A. ; NICHOLS, W. W. ; DUNBAR, B. ; BOOTH, I. R.: From famine to feast: the role of methylglyoxal production in Escherichia coli. In: *Mol Microbiol* 27 (1998), Feb, Nr. 3, S. 553–562
- [204] URBANCZIK, R. ; WAGNER, C.: An improved algorithm for stoichiometric network analysis: theory and applications. In: *Bioinformatics* 21 (2005), Apr, Nr. 7, 1203–1210. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti127>. – DOI 10.1093/bioinformatics/bti127
- [205] VALLABHAJOSYULA, Ravishankar R. ; CHICKARMANE, Vijay ; SAURO, Herbert M.: Conservation analysis of large biochemical networks. In: *Bioinformatics*

- 22 (2006), Feb, Nr. 3, 346–353. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti800>. – DOI 10.1093/bioinformatics/bti800
- [206] VARMA, A. ; BOESCH, B. W. ; PALSSON, B. O.: Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates. In: *Appl Environ Microbiol* 59 (1993), Aug, Nr. 8, S. 2465–2473
- [207] VARMA, A. ; PALSSON, B. O.: Predictions for oxygen supply control to enhance population stability of engineered production strains. In: *Biotechnol Bioeng* 43 (1994), Feb, Nr. 4, 275–285. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260430403>. – DOI 10.1002/bit.260430403
- [208] VARMA, A. ; PALSSON, B. O.: Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. In: *Appl Environ Microbiol* 60 (1994), Oct, Nr. 10, S. 3724–31
- [209] VISSER, J. Arjan G M. ; HERMISSON, Joachim ; WAGNER, Günter P. ; MEYERS, Lauren A. ; BAGHERI-CHAICHIAN, Homayoun ; BLANCHARD, Jeffrey L. ; CHAO, Lin ; CHEVERUD, James M. ; ELENA, Santiago F. ; FONTANA, Walter ; GIBSON, Greg ; HANSEN, Thomas F. ; KRAKAUER, David ; LEWONTIN, Richard C. ; OFRIA, Charles ; RICE, Sean H. ; DASSOW, George von ; WAGNER, Andreas ; WHITLOCK, Michael C.: Perspective: Evolution and detection of genetic robustness. In: *Evolution Int J Org Evolution* 57 (2003), Sep, Nr. 9, S. 1959–1972
- [210] WAGNER, Clemens ; URBANCZIK, Robert: The geometry of the flux cone of a metabolic network. In: *Biophys J* 89 (2005), Dec, Nr. 6, 3837–3845. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.055129>. – DOI 10.1529/biophysj.104.055129
- [211] WALLACE, B. J. ; YOUNG, I. G.: Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*. Studies with a *ubiA*- *menA*- double quinone mutant. In: *Biochim Biophys Acta* 461 (1977), Jul, Nr. 1, S. 84–100
- [212] WATSON, M R.: Metabolic maps for the Apple III^{Man}. In: *Trans Biochem Soc.* 12 (1984), S. 1093–1094
- [213] WATSON, M. R.: A discrete model of bacterial metabolism. In: *Comput Appl Biosci* 2 (1986), Apr, Nr. 1, S. 23–27
- [214] WIECHERT, W.: ¹³C metabolic flux analysis. In: *Metab Eng* 3 (2001), Jul, Nr. 3, 195–206. <http://dx.doi.org/10.1006/mben.2001.0187>. – DOI 10.1006/mben.2001.0187
- [215] WIECHERT, Wolfgang: The thermodynamic meaning of metabolic exchange fluxes. In: *Biophys J* 93 (2007), Sep, Nr. 6, 2255–2264. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.099895>. – DOI 10.1529/biophysj.106.099895
- [216] WIECHERT, Wolfgang ; SCHWEISSGUT, Oliver ; TAKANAGA, Hitomi ; FROMMER, Wolf B.: Fluxomics: mass spectrometry versus quantitative imaging. In: *Curr Opin Plant Biol* 10 (2007), Jun, Nr. 3, 323–330. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.015>. – DOI 10.1016/j.pbi.2007.04.015
- [217] WILLIAMS, Colin H. ; STILLMAN, Timothy J. ; BARYNIN, Vladimir V. ; SEDELNIKOVA, Svetlana E. ; TANG, Yue ; GREEN, Jeffrey ; GUEST, John R. ; ARTYMIUK,

- Peter J.: E. coli aconitase B structure reveals a HEAT-like domain with implications for protein-protein recognition. In: *Nat Struct Biol* 9 (2002), Jun, Nr. 6, 447–452. <http://dx.doi.org/10.1038/nsb801>. – DOI 10.1038/nsb801
- [218] WINDEN, W. van ; VERHEIJEN, P. ; HEIJNEN, S.: Possible pitfalls of flux calculations based on (13)C-labeling. In: *Metab Eng* 3 (2001), Apr, Nr. 2, 151–62. <http://dx.doi.org/10.1006/mben.2000.0174>. – DOI 10.1006/mben.2000.0174
- [219] WISHART, David S. ; KNOX, Craig ; GUO, An C. ; EISNER, Roman ; YOUNG, Nelson ; GAUTAM, Bijaya ; HAU, David D. ; PSYCHOGIOS, Nick ; DONG, Edison ; BOUATRA, Souhaila ; MANDAL, Rupasri ; SINELNIKOV, Igor ; XIA, Jianguo ; JIA, Leslie ; CRUZ, Joseph A. ; LIM, Emilia ; SOBSEY, Constance A. ; SHRIVASTAVA, Savita ; HUANG, Paul ; LIU, Philip ; FANG, Lydia ; PENG, Jun ; FRADETTE, Ryan ; CHENG, Dean ; TZUR, Dan ; CLEMENTS, Melisa ; LEWIS, Avalyn ; SOUZA, Andrea D. ; ZUNIGA, Azaret ; DAWE, Margot ; XIONG, Yeping ; CLIVE, Derrick ; GREINER, Russ ; NAZYROVA, Alsu ; SHAYKHUTDINOV, Rustem ; LI, Liang ; VOGEL, Hans J. ; FORSYTHE, Ian: HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. In: *Nucleic Acids Res* 37 (2009), Jan, Nr. Database issue, D603–D610. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn810>. – DOI 10.1093/nar/gkn810
- [220] WISHART, David S. ; TZUR, Dan ; KNOX, Craig ; EISNER, Roman ; GUO, An C. ; YOUNG, Nelson ; CHENG, Dean ; JEWELL, Kevin ; ARNDT, David ; SAWHNEY, Summit ; FUNG, Chris ; NIKOLAI, Lisa ; LEWIS, Mike ; COUTOULY, Marie-Aude ; FORSYTHE, Ian ; TANG, Peter ; SHRIVASTAVA, Savita ; JERONCIC, Kevin ; STOTHARD, Paul ; AMEGBEY, Godwin ; BLOCK, David ; HAU, David D. ; WAGNER, James ; MINIACI, Jessica ; CLEMENTS, Melisa ; GEBREMEDHIN, Mulu ; GUO, Natalie ; ZHANG, Ying ; DUGGAN, Gavin E. ; MACINNIS, Glen D. ; WELJIE, Alim M. ; DOWLATABADI, Reza ; BAMFORTH, Fiona ; CLIVE, Derrick ; GREINER, Russ ; LI, Liang ; MARRIE, Tom ; SYKES, Brian D. ; VOGEL, Hans J. ; QUERENGESSER, Lori: HMDB: the Human Metabolome Database. In: *Nucleic Acids Res* 35 (2007), Jan, Nr. Database issue, D521–D526. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkl923>. – DOI 10.1093/nar/gkl923
- [221] WISSENBAACH, U. ; TERNES, D. ; UNDEN, G.: An Escherichia coli mutant containing only demethylmenaquinone, but no menaquinone: effects on fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate respiration. In: *Arch Microbiol* 158 (1992), Nr. 1, S. 68–73
- [222] WITTMANN, C.: Metabolic flux analysis using mass spectrometry. In: *Adv Biochem Eng Biotechnol* 74 (2002), S. 39–64
- [223] ZAMBONI, Nicola ; KÜMMEL, Anne ; HEINEMANN, Matthias: anNET: a tool for network-embedded thermodynamic analysis of quantitative metabolome data. In: *BMC Bioinformatics* 9 (2008), 199. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-9-199>. – DOI 10.1186/1471-2105-9-199
- [224] ZILBERSTEIN, D. ; AGMON, V. ; SCHULDINER, S. ; PADAN, E.: Escherichia coli intracellular pH, membrane potential, and cell growth. In: *J Bacteriol* 158 (1984), Apr, Nr. 1, S. 246–252
- [225] ZUPKE, C. ; TOMPKINS, R. ; YARMUSH, D. ; YARMUSH, M.: Numerical isotope analysis: estimation of metabolic activity. In: *Anal Biochem* 247 (1997),

May, Nr. 2, 287–293. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1997.2076>. – DOI
10.1006/abio.1997.2076

Danksagung

Allen Menschen, die mich auf diesem Weg begleitet haben, mich mit wertvoller Kritik geleitet und meinen Blick in vielerlei Hinsicht geschärft haben, möchte ich an dieser Stelle danken. Die zahlreichen Begegnungen, sei es im Gespräch, in der Musik oder im Tanz, haben mir immer wieder Kraft und Vertrauen gegeben, weiter zu gehen.

- Ein besonderer Dank gilt Arnold, der mir diesen Weg nahelegte. Seine Worte halfen mir sehr, die Arbeit als Prozess zu sehen und als solchen wert zu schätzen.
- Prof. Holzhütter möchte ich danken für die verständnisvolle Betreuung. Mit seiner Faszination an der Forschung verstand er es, meine eigene Faszination immer wieder wach zu rufen und mich daran zu erinnern, worum es mir in der Wissenschaft geht.
- Meinem Kollegen Andreas möchte ich besonders danken für sein Vertrauen und seinen fachlichen Beistand. Er war Anlaufstelle für unzählige Fragen, auf die unzählige, geduldige und bedachte Antworten folgten.
- Den Mitgliedern des Sonderforschungsbereichs “Robustheit, Modularität und evolutionäres Design“ (SFB618) gilt mein Dank für die herzliche Aufnahme. Der SFB im Hintergrund war mir ein guter Begleiter und die entspannte Atmosphäre und anregenden Gespräche eine wertvolle Erfahrung.
- Von unschätzbarem Wert waren mir meine Freunde und meine Kollegen, von denen ich mich allzeit unterstützt fühlte und die mir, wissentlich oder unwissentlich, in vielerlei Hinsicht Lehrer waren.
- Meiner Familie möchte ich dafür danken, dass sie – ohne wirklich zu wissen, worum es geht – nie die Richtigkeit und Wichtigkeit dieser Arbeit in Frage stellten.
- Ein herzlicher Dank gilt Christian, der – nicht nur in grafischen Aspekten – nachhaltig meinen Blick auf das lenkte, worauf es ankommt.
- Schließlich möchte ich Uwe danken, der mich besonders in der Endphase liebevoll unterstützt hat und es verstand, durch geschicktes Hinterfragen mich immer wieder auf mich selbst zurückzuwerfen und mich zu selbstbestimmten Handeln zu ermuntern.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der International Research Training Group (IRTG). Insbesondere für die Möglichkeit, meine Ergebnisse in Japan vorstellen zu dürfen, bin ich sehr dankbar. Von der damit verbundenen kulturellen Begegnung werde ich noch lange zehren können.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Bis auf wenige Ausnahme wurden die vorgestellten Ergebnisse und Untersuchungen eigenständig erhoben. Diese Ausnahmen sind:

1. Kapitel 2, Seite 34: Die Elementarmodenberechnung wurde von Dr. Andreas Hoppe durchgeführt.
2. Kapitel 3, Seite 43: Die Berechnungen und Konzeption der IGERS-Methode wurde von Kristian Rother durchgeführt. Hier arbeitete ich vornehmlich durch Literaturrecherche und Datenaufbereitung zu.
3. Kapitel 5, Seite 82: Die Berechnungen in Abschnitt 5.1.1 wurden von Prof. H.G. Holzütter durchgeführt.

Die benutzten Quellen und Hilfsmittel wurden von mir vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe.

Berlin, den 03.02.2011

Sabrina Hoffmann