

Lösungshinweise zum Block „Modellierung und Simulation biochemischer Prozesse“

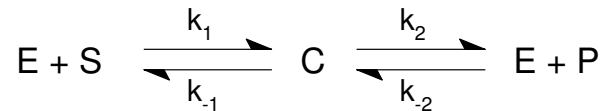
juergen.zobeley@eml.villa-bosch.de

Aufgabe 2: Modellierung / Simulation einer einfachen enzymkatalysierten Reaktion

Wir betrachten im folgenden eine reversible, enzymkatalysierte 1-Substrat/1-Produkt Reaktion bei der ein Substrat S in ein Produkt P umgewandelt wird:



Zunächst soll die enzymkatalysierte Reaktion unter Verwendung von Elementarreaktionen modelliert werden:



Hierbei repräsentiert C den Enzym-Substrat Komplex, E das ungebundene Enzym, S das Substrat und P das Produkt.

Das entsprechende DGL-System des deterministischen, kontinuierlichen Modellansatzes lautet:

$$\begin{aligned} \frac{d[E]}{dt} &= -k_1[E][S] + k_{-1}[C] + k_2[C] - k_{-2}[E][P] \\ \frac{d[S]}{dt} &= -k_1[E][S] + k_{-1}[C] \\ \frac{d[C]}{dt} &= +k_1[E][S] - k_{-1}[C] - k_2[C] + k_{-2}[E][P] \\ \frac{d[P]}{dt} &= +k_2[C] - k_{-2}[E][P] \end{aligned}$$

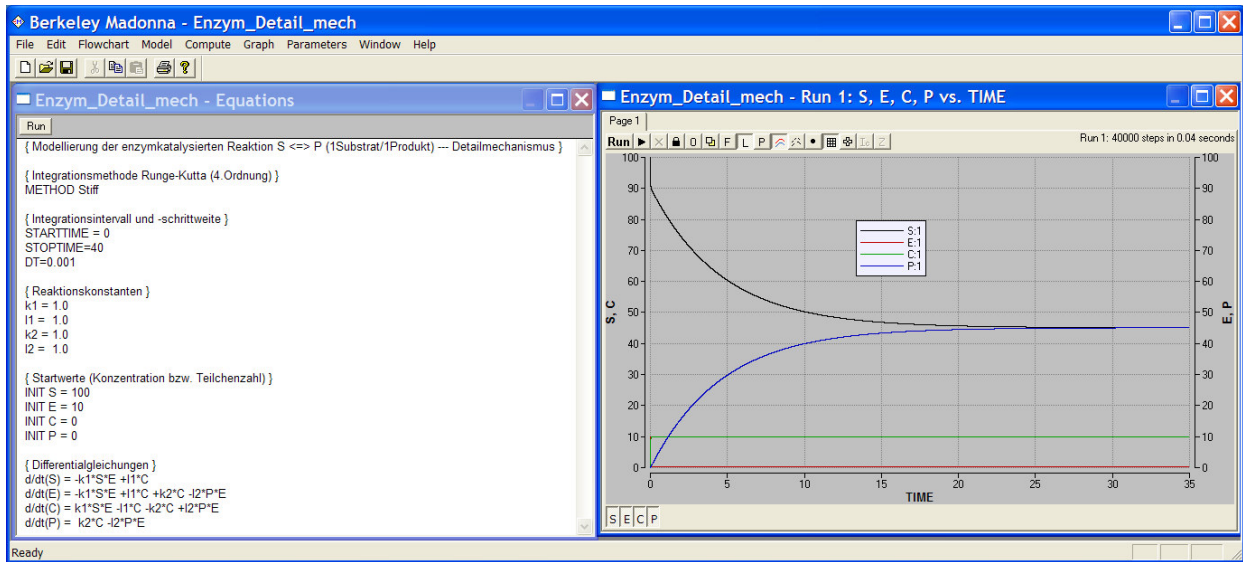
Unter Berücksichtigung der Erhaltungsbeziehungen des geschlossenen Reaktionssystems

$$\begin{aligned} [E]_g &= [E] + [C] \\ [S]_g &= [S] + [C] + [P] \end{aligned}$$

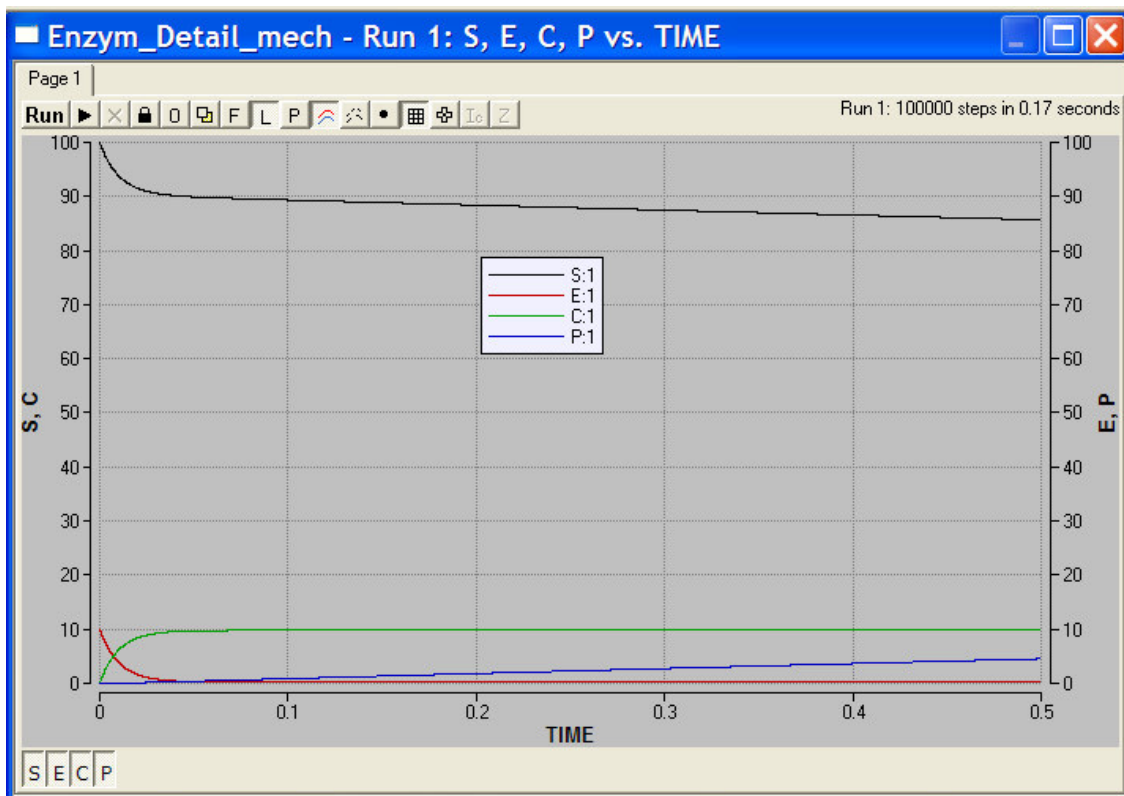
lässt sich das linear abhängige DGL-System durch Variablensubstitution auf 2 linear unabhängige Gleichungen reduzieren. Eine mögliche Reduktionsvariante reduziert das System auf die Variablen [S] und [C]:

$$\begin{aligned} \frac{d[S]}{dt} &= -k_1[E]_g[S] + k_1[S][C] + k_{-1}[C] \\ \frac{d[C]}{dt} &= k_{-2}[E]_g[S]_g + (k_1 - k_{-2})[E]_g[S] - (k_{-1} + k_2 + k_{-2}([E]_g + [S]_g))[C] + (k_{-2} - k_1)[S][C] + k_{-2}[C]^2 \end{aligned}$$

Um einen ersten Überblick der dynamischen Eigenschaften des Reaktionssystems zu erhalten, soll zunächst eine Simulation mit dem Programm *Madonna* durchgeführt werden. Da wir in erster Linie am charakteristischen Verhalten des Systems und nicht an Absolutwerten interessiert sind, verwenden wir willkürliche Einheiten für die Reaktionskonstanten und Anfangskonzentrationen. Von Bedeutung sind die Verhältnisse der Parameterwerte zueinander. Als Anfangskonzentration wurde in der Simulation des geschlossenen Systems ein 10-facher Substratüberschuß gegenüber dem freien Enzym angenommen; gebundenes Enzym und Produkt sind zu Simulationsbeginn nicht vorhanden. Die Reaktionskonstanten sowohl der beiden Reaktionen 1.Ordnung, als auch der beiden Reaktionen 2.Ordnung wurden alle auf eins gesetzt (Vorsicht: unterschiedliche Größeneinheiten).



Vergrößerte Darstellung der Anfangsphase der Enzymreaktion:



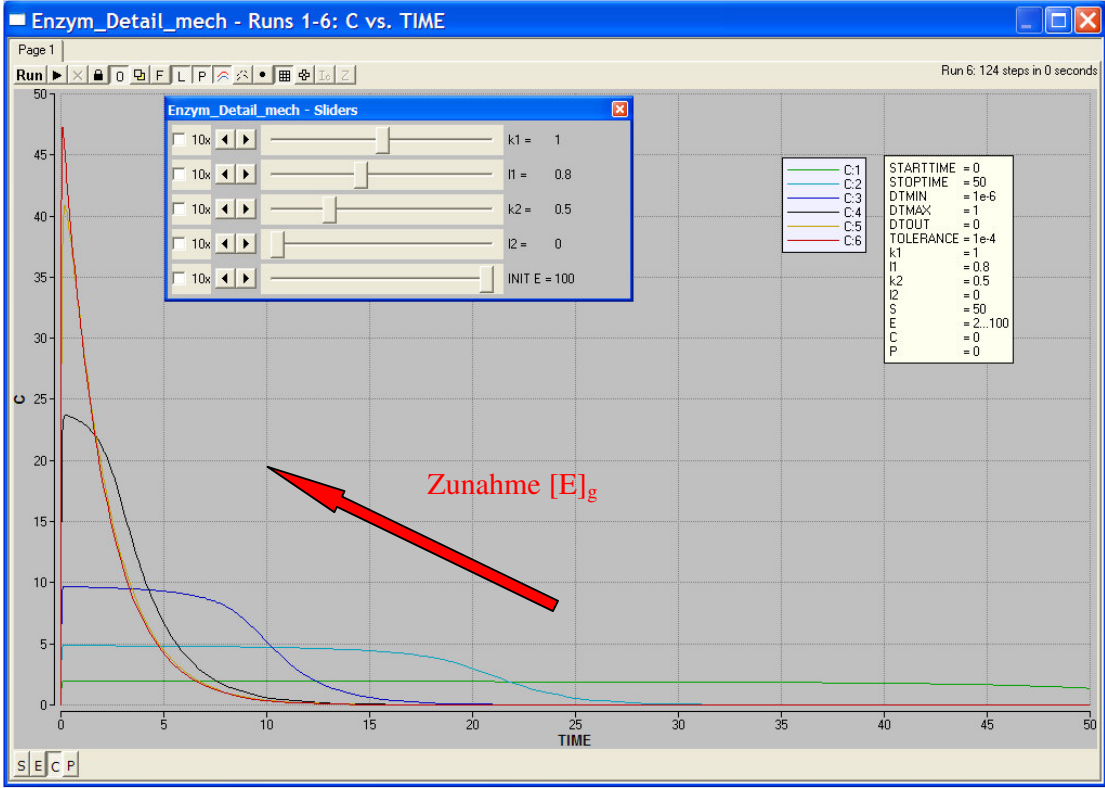
Die bei der Simulation der Enzymreaktion erhaltenen Zeitreihen lassen sich in drei charakteristische Phasen unterteilen. In der ersten Phase findet auf einer sehr schnellen Zeitskala (siehe vergrößerte Darstellung) durch Reaktion des freien Enzyms E mit Substrat S im Überschuß die Bildung des Enzym-Substrat Komplexes C statt. Nach Ablauf dieser Initialisierungsphase liegt nahezu die gesamte Enzymmenge in gebundener Form vor. In der zweiten Phase mit deutlich langsamerer Zeitskala findet nun die eigentliche Umwandlung des Substrats in das Produkt statt. Während dieser gesamten Phase ändert sich die Konzentration des Enzym-Substrat Komplexes [C] nur äußerst geringfügig; es besteht ein Fließgleichgewicht. Man spricht in diesem Fall von einem quasistationären Zustand (quasi-steady state) des Enzym-Substrat Komplexes C ($d[C]/dt \approx 0$). Da es sich bei der enzymkatalysierten Reaktion um eine reversible Reaktion handelt, konkurriert nach einiger Zeit die Rückreaktion des Produkts mit der Hinreaktion des Substrats. Dabei stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht ein; das System erreicht einen stabilen stationären Zustand. Es findet keine sichtbare Veränderung der Zusammensetzung der Reaktionsmischung mehr statt.

An dieser Stelle ist eine Anmerkung zur Wahl der geeigneten Integrationsmethode angebracht. Generell lassen sich die Integrationsmethoden unterteilen in Verfahren mit fester oder adaptiver Schrittweite Δt . Die Eignung der einzelnen Integrationsverfahren zur zuverlässigen (d.h. hinreichend genauen) und effizienten numerischen Integration hängt stark von der Natur des DGL-Systems ab. Finden die Konzentrationsänderungen aller reaktiven Spezies auf der gleichen Zeitskala statt, so erweisen sich Verfahren mit fester Integrations-schrittweite (z.B. Runge-Kutta 4.Ordnung) in der Regel als geeignet. Wichtig ist natürlich die Wahl einer geeigneten Schrittweite. Zu große Schrittweiten führen zu Integrationsfehlern, die sich während der Zeitpropagation aufschaukeln. Zu kleine Schrittweiten erhöhen dagegen den numerischen Aufwand der Zeitreihenberechnung. Die Wahl einer geeigneten Integrations-schrittweite bleibt dem Anwender überlassen; d.h. es sind in der Regel mehrere Testläufe notwendig. Beinhaltet die Systemdynamik dagegen Prozesse, die auf mehreren Zeitskalen ablaufen- d.h. die Änderungs-raten der einzelnen Systemvariablen unterscheiden sich um eine oder mehrere Größenordnungen- so erweist sich die Verwendung von Integrationsverfahren mit adaptiver Schrittweitensteuerung (z.B. Rosenbrock) in der Regel als günstiger. Der höhere Aufwand dieser Verfahren im einzelnen Integrations-schritt wird durch die relativ große Schrittweite in Bereichen, in denen die Änderungs-raten der Zeitreihen relativ gering sind überkompensiert. Bei Verfahren mit fester Integrations-schrittweite muss diese jeweils an die stärkste Änderungs-rates des Reaktionssystems angepasst werden. Da es sich bei dem hier diskutierten Detailmodell der Enzymreaktion um ein steifes DGL-System handelt, ist die Verwendung eines adaptiven Integrationsverfahrens angeraten (Rosenbrock; d.h. Method=Stiff).

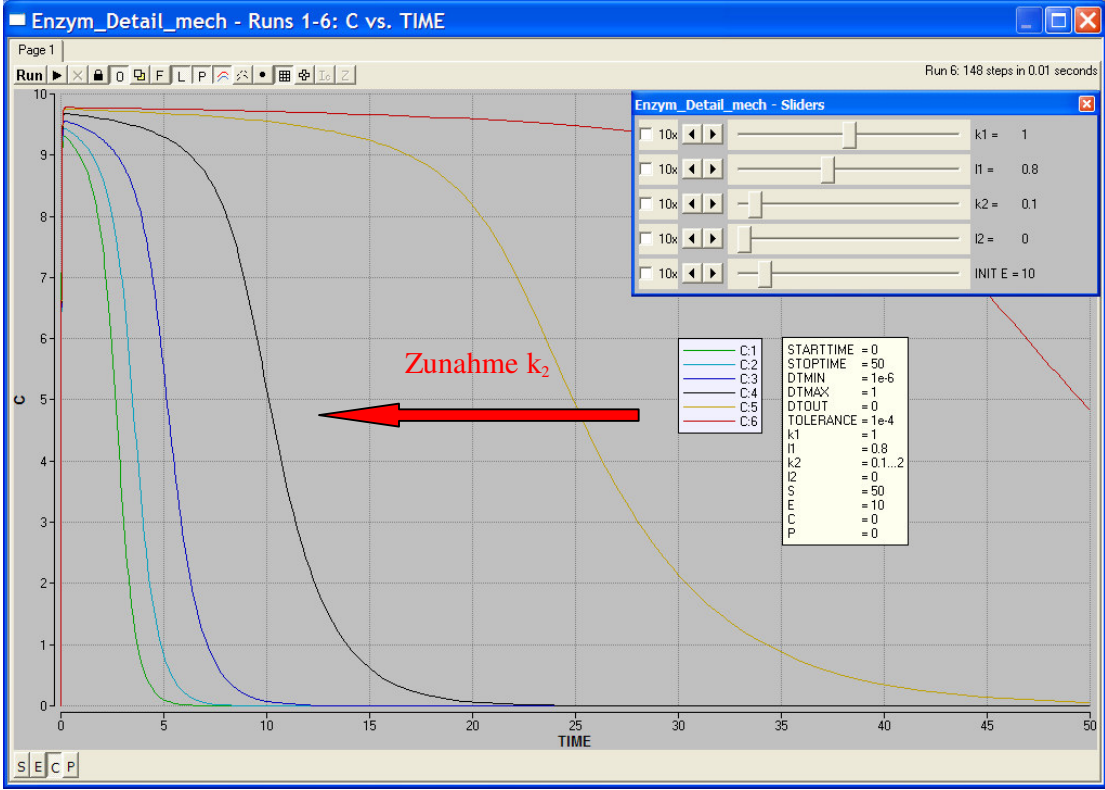
Den intuitivsten Zugang zum Verständnis der Systemdynamik erhält man durch Variation der Reaktionsparameter; insbesondere des Verhältnisses der Anfangskonzentrationen von freiem Enzym E zu Substrat S, sowie des Verhältnisses der einzelnen Reaktionskonstanten zueinander. Diese Studien können sehr leicht mit dem Programm *Madonna* durchgeführt werden. Im folgenden sollen jedoch lediglich einige ausgewählte Aspekte betrachtet werden.

Als Ausgangspunkt der Betrachtungen soll wieder die Reaktionsmischung aus freiem Enzym und Substrat gewählt werden. Die Reaktionskonstanten sind so festgelegt, dass die Reaktion von Substrat mit freiem Enzym eine vergleichsweise schnelle Gleichgewichtsreaktion darstellt. Die Produktbildung ausgehend vom reaktiven Enzym-Substrat Komplex erfolgt langsamer; die Rückreaktion des Produkts sei vernachlässigbar klein. Das Verhältnis freies Enzym E zu Substrat S wird variiert. Die Auswirkung dieser Variation auf die Zeitreihe des Enzym-Substrat Komplexes C wird betrachtet. Für große S/E-Verhältnisse beobachtet man- nach einer sehr schnellen Initialisierungsphase- die Ausbildung eines zeitlich ausgedehnten Plateaus der Zeitreihe von [C]. Die Enzymreaktion ist relativ langsam (limitiert durch die geringe Enzymkonzentration), und kann in weiten Bereichen im Rahmen eines quasi-steady state Ansatzes für [C] beschrieben werden. Die sukzessive Erhöhung der Enzymkonzentration führt neben der Beschleunigung der Reaktion zur drastischen Verkürzung des Plateaus in der [C]-Zeitreihe.

Für vergleichbare Enzym / Substrat Konzentrationen bricht die quasi-steady state Annahme schließlich vollständig zusammen.



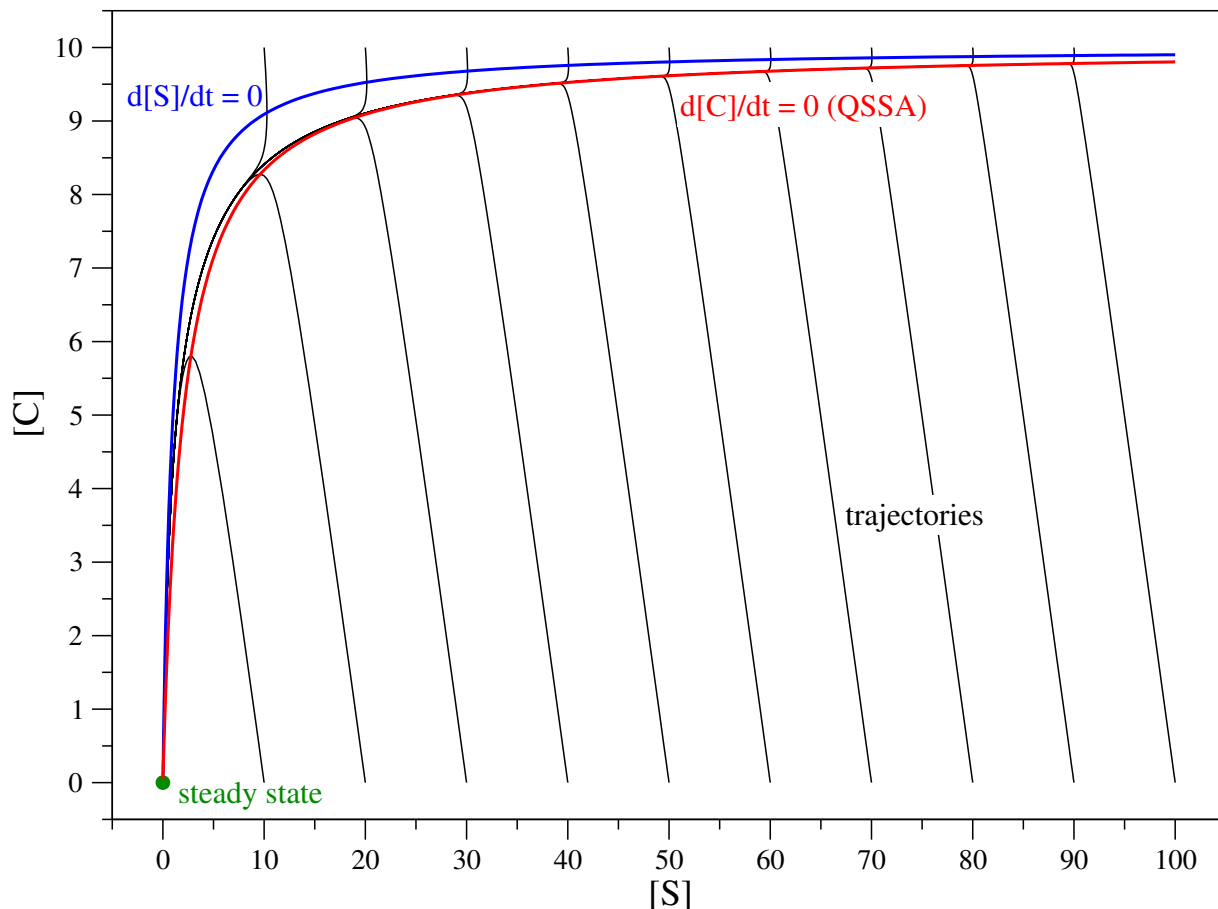
Weiterhin soll der Einfluss des Verhältnisses der Reaktionskonstanten untereinander auf die Zeitreihe des Enzym-Substrat Komplexes C betrachtet werden.



Dazu wird für konstantes Verhältnis der Anfangskonzentrationen von freiem Enzym zu Substrat die Größe der Reaktionskonstanten k_2 (d.h. die Geschwindigkeitskonstante der Produktbildungsreaktion) variiert; die restlichen Reaktionskonstanten werden dabei konstant gehalten. Es zeigt sich, dass mit zunehmender Größe der Reaktionskonstante das Plateau in der Zeitreihe für den Enzym-Substrat Komplex C immer kürzer wird. Die Produktbildungsrate k_2 gewinnt gegenüber der Bildung des Zwischenprodukts C an Bedeutung; für große k_2 -Werte wird einmal gebildetes C praktisch instantan weiterreagieren.

Bisher haben wir die Simulationsergebnisse ausschließlich in Form der Zeitreihen für die an der Reaktion beteiligten Spezies analysiert. Eine häufig sehr hilfreiche, alternative Betrachtungsweise ist der sog. Phasenraumplot. Dabei trägt man die Konzentrationen ausgewählter reaktiver Spezies gegeneinander auf. Die Konzentrationen der reaktiven Spezies zu einem gegebenen Zeitpunkt t entsprechen dann den Koordinaten eines Punkts im Phasenraum. Verbindet man Phasenraumpunkte für benachbarte Zeitpunkte, so erhält man eine Trajektorie im Phasenraum, welche die Dynamik des Systems ausgehend von einem Startpunkt (Anfangskonfiguration) beschreibt. Auf diese Weise lässt sich die Dynamik des Reaktionssystems für verschiedene Ausgangssituationen in einem Plot sehr anschaulich beschreiben.

Als Beispiel soll im folgenden der Phasenraumplot für die Enzymreaktion mit irreversibler Produktbildung ($k_{-2}=0$) betrachtet werden (wobei $k_1 = k_{-1} = k_2 = 1$). Der Phasenraum wird aufgespannt von den Variablen $[S]$ und $[C]$. Auf Grund der vorhandenen Erhaltungsrelationen wird das Reaktionssystem im gewählten 2-dimensionalen Phasenraum vollständig beschrieben (siehe oben).



Alle Trajektorien im Phasenraumdiagramm laufen in den selben stationären Zustand (steady state). Da die Produktbildung der Enzymreaktion als irreversibel modelliert wurde, ist im stationären Zustand das gesamte Substrat verbraucht; ebenso liegt die gesamte Stoffmenge des Enzyms in ungebundener Form vor. Auf dem Weg zum stationären Zustand bilden die Trajektorien ein charakteristisches Muster aus, welches das bereits diskutierte Verhalten in der entsprechenden Zeitreihendarstellung widerspiegelt. Nach einer schnellen Initialisierungsphase laufen alle betrachteten Trajektorien auf einer 1-dimensionalen Kurve zusammen. Diese Kurve beschreibt die Dynamik des Reaktionssystems nach Ablauf der schnellen Initialisierungsphase. Sie repräsentiert sozusagen die Dynamik des Systems auf einer vergleichsweise langsamen Zeitskala. Auf dieser langsamen Zeitskala findet die eigentliche Produktbildung statt. Interessanterweise wird diese 1-dimensionale Kurve im Phasenraum über einen weiten Bereich in sehr guter Näherung durch den quasi-steady state Ansatz $d[C]/dt \approx 0$ für den Enzym-Substrat Komplex C beschrieben.

Bei einer systematischen Analyse zeigt sich, dass die Gültigkeit der quasi-steady state Näherung für den Enzym-Substrat Komplex die formale Grundlage für die Ableitung der sog. Michaelis-Menten Kinetik sowohl für die reversible, als auch für die irreversible Enzymreaktion ist. Für diese Ableitung sei auf einschlägige Lehrbücher der Enzymkinetik verwiesen. Durch Vergleich der detaillierten Simulation mit der entsprechenden Simulation unter Ansatz der Michaelis-Menten Kinetik lässt sich dieser Zusammenhang anschaulich nachvollziehen.

In der Michaelis-Menten Kinetik treten das Enzym E und der Enzym-Substrat Komplex C nicht mehr explizit auf. Für reversible 1-Substrat / 1-Produkt Reaktionen gilt:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = v^{(+)} - v^{(-)} = \frac{V^{(+)} \frac{[S]}{K_{mS}} - V^{(-)} \frac{[P]}{K_{mP}}}{1 + \frac{[S]}{K_{mS}} + \frac{[P]}{K_{mP}}}$$

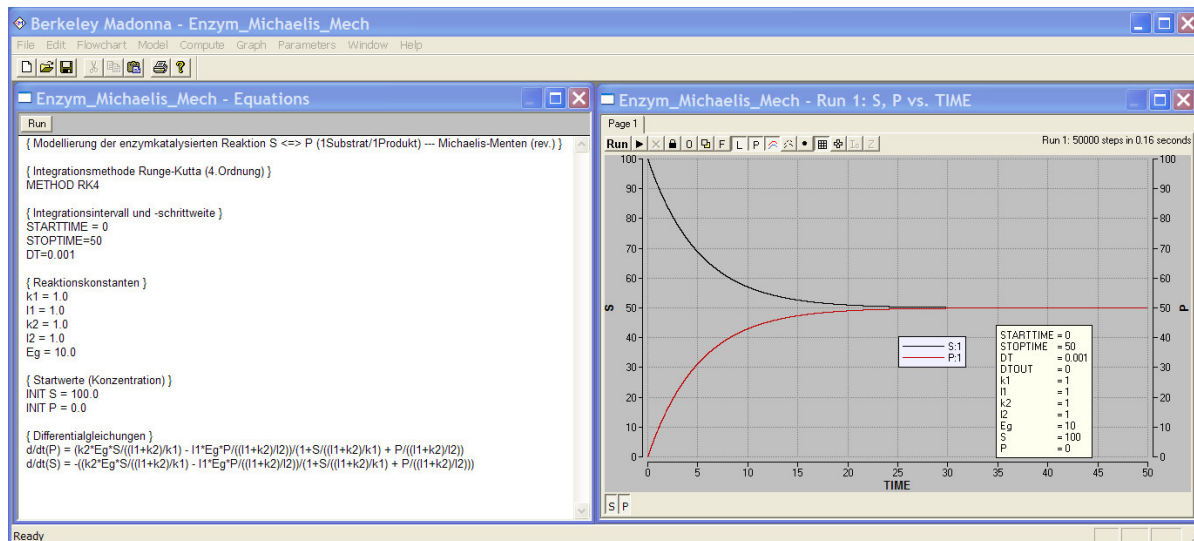
Der Zusammenhang der phänomenologischen Konstanten der Michaelis-Menten Kinetik mit den elementaren Reaktionskonstanten ergibt sich aus folgenden Beziehungen:

$$K_{mS} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}, \quad V^{(+)} = k_2[E]_g$$

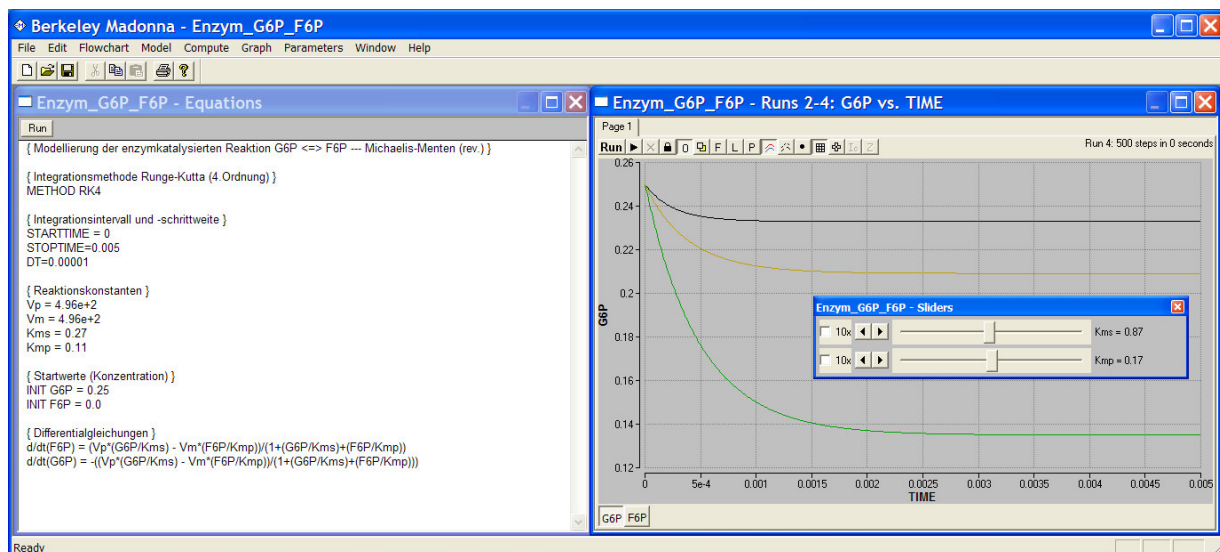
$$K_{mP} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}}, \quad V^{(-)} = k_{-1}[E]_g$$

$$[E]_g = [E] + [C]$$

Die reversible Enzymreaktion wurde mit dem Programm *Madonna* unter Verwendung der Michaelis-Menten Kinetik simuliert. Die Kinetik-Parameter und Anfangskonzentrationen wurden entsprechend den Reaktionskonstanten und Anfangskonzentrationen der Detailmodellierung gewählt. Das Ergebnis stimmt sehr gut mit den Erwartungen überein. Sieht man von der schnellen Initialisierungsphase ab (hier gilt die quasi-steady state Näherung für den Enzym-Substrat Komplex C wie oben gezeigt nicht), so reproduziert der Michaelis-Menten Ansatz sehr schön den Kurvenverlauf der Zeitreihen von Substrat und Produkt im Bereich der Gültigkeit der quasi-steady state Näherung. Da jedoch der Enzym-Substrat Komplex C im Michaelis-Menten Formalismus nicht explizit modelliert wird, erhält man eine leicht abweichende Zusammensetzung des stationären Zustands der Reaktion; im Gegensatz zum Detailmodell liegt das gesamte Substrat bzw. Produkt in ungebundener Form vor.



Abschließend betrachten wir die Simulation der Phosphofruktisomerase-Reaktion als konkrete Anwendung der reversiblen Michaelis-Menten Kinetik. Bei dieser reversiblen enzymkatalysierten Reaktion wird Glucose-6-phosphat (G6P) in Fructose-6-phosphat (F6P) umgewandelt. Die kinetischen Reaktionsparameter werden aus der Literatur entnommen (siehe Übungsblatt). Dabei tritt das Problem auf, dass für die Parameter häufig nur ungenaue Werte bekannt sind, bzw. die Bedingungen unter denen die einzelnen Parameter gemessen wurden unterschiedlich waren (Konsistenzproblem). Für die Anfangskonzentration von G6P wurde ein physiologischer Wert von 0.25 mmol/l angenommen; die Einheit der Zeitachse ist [min.]. Gezeigt ist die Abnahme von [G6P] in Abhängigkeit von den nur ungenau bekannten Parametern K_{ms} und K_{mp} . Dabei wurden zum einen die Mittelwerte der Parameter genommen, zum anderen wurden die Parameterkombinationen gewählt die zu extremem Verhalten führen. Dieses Vorgehen erlaubt eine einfache Betrachtung der Auswirkungen der Ungenauigkeit der Parameter auf das Simulationsergebnis.



Die Betrachtung des entsprechenden offenen Systems, d.h. unter konstantem Zufluß von G6P und Abfluß von F6P funktioniert ganz analog. Dazu wird die DGL für G6P um einen Term $+j_{in}$, die DGL für F6P um einen Term $-k_{out}[F6P]$ erweitert. Die Durchführung der Simulation des offenen Systems in Abhängigkeit von Stärke des Zuflusses / Abflusses bleibt dem Leser überlassen.