

## Hinweise zur Aufgabe 3

sven.sahle@eml.org

### a) Kompetitive Hemmung und Substratüberschußhemmung

Nachdem es in Aufgabe 2 um einfache enzymkatalysierte Reaktionen ging, lernen wir hier zwei etwas komplexere Beispiele für Kinetiken von Enzymreaktionen kennen. Die Reaktionen sollen jeweils mit ihren Teilschritten (wie im Vorlesungsskript angegeben) modelliert werden. Ausgangspunkt ist das Modell für die Enzymreaktion, das in Aufgabe 2a) erstellt wurde. Die folgenden Angaben beziehen sich auf das Programm *Madonna*.

#### Kompetitive Hemmung

Wir betrachten ein Enzym  $E$ , das die Umsetzung des Substrates  $S$  zum Produkt  $P$  katalysiert. In Aufgabe 2 haben wir gesehen, daß dieses Verhalten durch die Teilreaktionen  $S + E \rightleftharpoons ES$  und  $ES \rightleftharpoons P + E$  modelliert werden kann.  $ES$  ist dabei ein Enzymmolekül, an das ein Substratmolekül gebunden ist. Bei der kompetitiven Hemmung gehen wir davon aus, daß es eine weitere Substanz, den Inhibitor  $I$ , gibt, die auch eine Bindung mit dem Enzym eingehen kann. Die zusätzliche Reaktion ist demnach  $I + E \rightleftharpoons EI$ .  $EI$  ist dabei ein Enzymmolekül, an das ein Inhibitormolekül gebunden ist.  $EI$  ist inaktiv, d.h. es kann keine Bindung mit  $S$  eingehen, nur wieder in  $E$  und  $I$  zerfallen.

Hier folgen die Differentialgleichungen im Madonna-Format:

```
METHOD Stiff
STARTTIME = 0
STOPTIME=20
DT = 0.05

init e=1
init es=0
init s=5
init p=0

init i=1
init ei=0

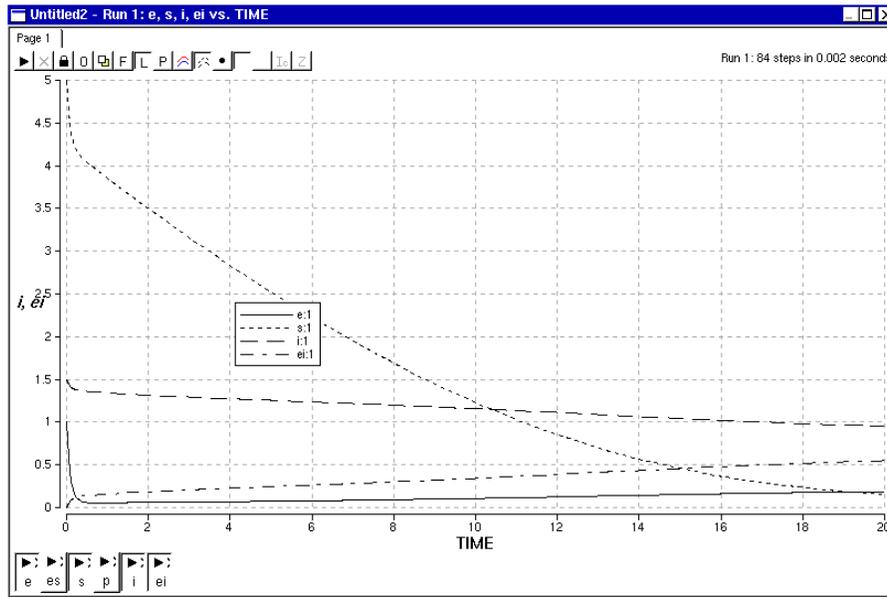
s'=-k1*s*e + kk1*es
e'=-k1*s*e + kk1*es +k2*es -kk2*e*p -ki*e*i + kki*ei
es'=k1*s*e - kk1*es -k2*es +kk2*e*p
p'=          +k2*es -kk2*e*p

i'=          -ki*e*i + kki*ei
ei'=         +ki*e*i - kki*ei

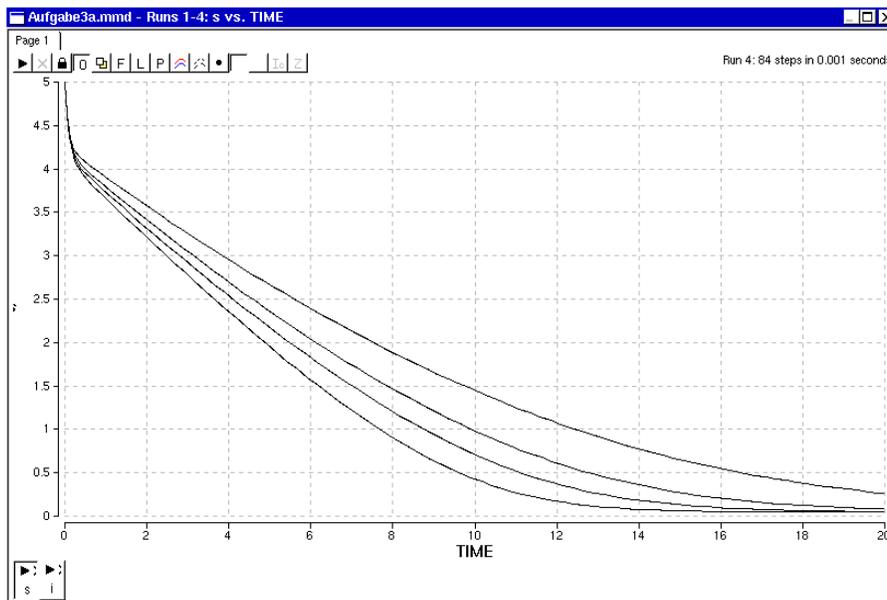
k1=2
kk1=0.1
k2=0.5
kk2=0.1

ki=1
kki=0.3
```

Zunächst sehen wir uns das Ergebnis einer einfachen Simulation an:



Die Startkonzentration von  $I$  war hier auf 1.5 gesetzt. Das Bild unterscheidet sich nicht sehr von dem einer einfachen Enzymreaktion (Aufgabe 2). Man kann aber sehen, daß sehr schnell ein Teil der Anfangskonzentration von  $I$  verbraucht wird. Das bedeutet, daß das Enzym teilweise an  $I$  gebunden sein muß und nicht vollständig für die Katalyse der Reaktion  $S \rightarrow P$  zur Verfügung steht. Um den Einfluß unterschiedlicher Mengen von  $I$  auf die Reaktion zu untersuchen bietet es sich an, den Startwert für  $I$  mit einem Schieberegler zu verknüpfen (Menüpunkt Model/Define Sliders). Wenn man den mit "O" (das steht für *overlay*) beschrifteten Knopf in der Symbolleiste des Grafikfensters betätigt, kann man die Ergebnisse mehrerer Simulationen in einer Grafik darstellen:



In dieser Abbildung ist der Konzentrationsverlauf von  $S$  für verschiedene Anfangskonzentrationen von  $I$  dargestellt ( $I(0) = 0, 0.5, 1, 2$ ). Der schnellste Abfall von  $S$  entspricht dabei der Simulation ohne Inhibitor.

## Substratüberschußhemmung

Auch die Teilreaktionen für diese Kinetik entnehmen wir dem Vorlesungsskript. Die Besonderheit ist hier, daß sich an den Enzym-Substrat-Komplex  $ES$  noch ein weiteres Substratmolekül binden kann. Die Reaktion lautet  $ES + S \rightleftharpoons ESS$ . Die Auswirkung ist, daß bei großem Überschuß von  $S$  das Gleichgewicht dieser Reaktion in Richtung  $ESS$  verschoben ist. Dadurch ist die Konzentration von  $ES$  niedrig und die Bildung von  $P$  durch die Reaktion  $ES \rightarrow P + E$  wird verlangsamt. Die Differentialgleichungen für *Madonna*:

```
METHOD Stiff
STARTTIME = 0
STOPTIME=100
DT = 0.05

init e=1
init es=0
init s=7
init p=0

init ess=0

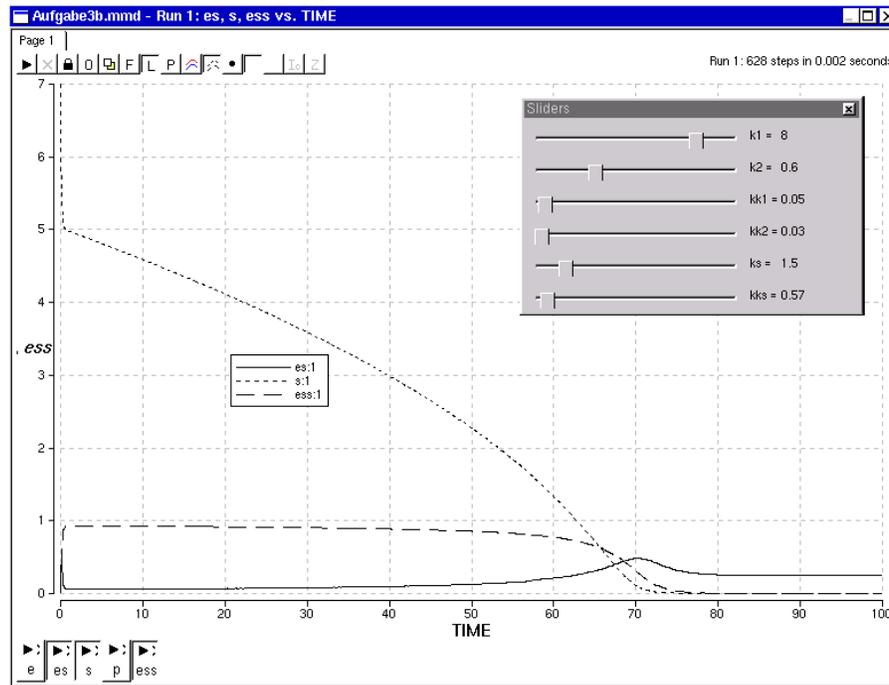
s'=-k1*s*e + kk1*es -ks*es*s + kks*ess
e'=-k1*s*e + kk1*es +k2*es -kk2*e*p
es'=k1*s*e - kk1*es -k2*es +kk2*e*p -ks*es*s + kks*ess
p'= +k2*es -kk2*e*p

ess'= +ks*es*s - kks*ess

k1=1
kk1=0.1
k2=1
kk2=0.1

ks=3
kks=0.1
```

Das Ergebnis der Simulation (die Parameterwerte kann man an den Schieberegler ablesen):



Man erkennt, daß die Abnahme von  $S$  sich beschleunigt (die Kurve ist nach unten gekrümmt). Das ist das erwartete Verhalten, da die Reaktion ja für große Konzentrationen von  $S$  gehemmt sein soll.

## b) Eine oszillierende Reaktion

Für diesen Aufgabenteil sind das Reaktionsschema und auch das Differentialgleichungssystem bereits vorgegeben. Das Madonna-File sieht daher folgendermaßen aus:

```
METHOD Stiff

STARTTIME = 0
STOPTIME=70
DT = 0.01
DTMAX=0.05

init a=0.1
init b=0.1
init c=0.1

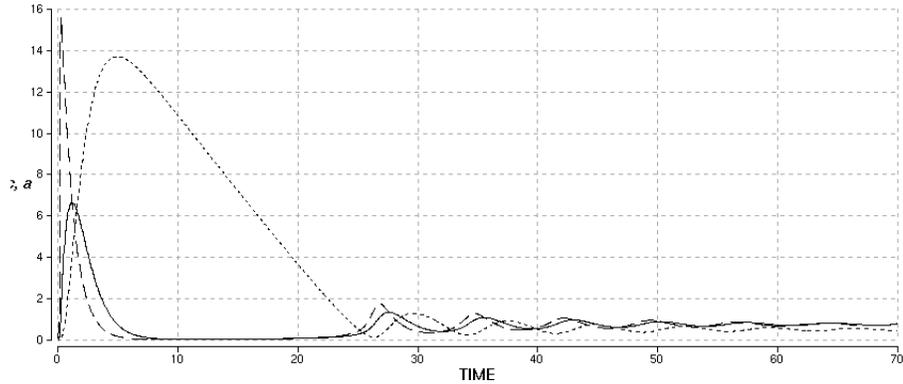
a' = +vmax/(km+c) -a
b' = +a -b
c' = +b -kk*c/(km+c)

vmax= 0.4
km= 0.001
kk= 0.77
```

Dazu einige Anmerkungen: Für die Reaktionen  $A \rightarrow B$  und  $B \rightarrow C$  wird jeweils eine Reaktionskonstante mit dem Zahlenwert  $k = 1$  angenommen. Diese wurde in den Differentialgleichungen ausgelassen. Die Enzymreaktion  $C \rightarrow$  und die durch  $C$  gehemmte Reaktion  $\rightarrow A$  könnte man auch mit Teilschritten simulieren (das wäre auch eine interessante Übung). Hier haben wir uns

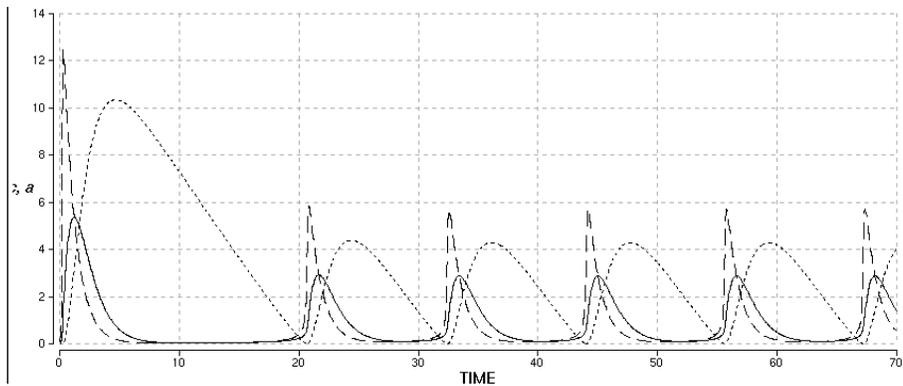
aber dafür entschieden, sie durch *einen* Reaktionsschritt mit entsprechendem kinetischen Gesetz zu beschreiben (vergleichbar mit Aufgabe 2b).

Bei diesem System mit den angegebenen Parametern ist es wichtig, einen geeigneten Integrationsalgorithmus zu wählen. Der “Stiff”-Algorithmus mit einer relativ kleinen Schrittweite ist eine gute Wahl. Das Ergebnis könnte dann zunächst folgendermaßen aussehen:

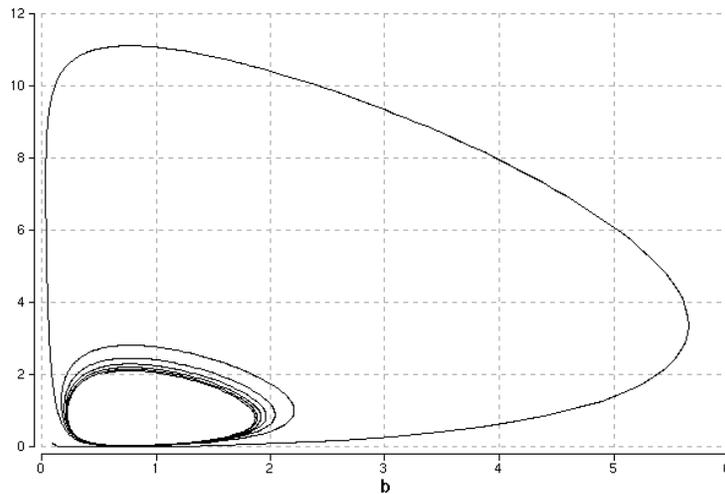


Man erkennt, daß die Konzentrationsverläufe eine gedämpfte Schwingung ausführen und dann in einen Gleichgewichtszustand einmünden (in diesem Fall ein Fließgleichgewicht, da wir es mit einem offenen System zu tun haben;  $A$  hat einen Zufluß und  $C$  einen Abfluß).

Es liegt die Vermutung nahe, daß mit einer kleinen Änderung der Parameter ein oszillierendes Verhalten gefunden werden kann. Und tatsächlich, wenn wir zum Beispiel  $vmax = 0.25$  setzen, erhalten wir:



Die Konzentrationen der drei beteiligten Substanzen  $A$ ,  $B$  und  $C$  steigen und sinken periodisch. Eine übliche graphische Darstellung dieses Verhaltens ist das Phasenraumdiagramm. Dabei werden nicht die Konzentrationen gegen die Zeit  $t$  aufgetragen, sondern zwei Konzentrationen gegeneinander. Hier sehen wir  $C$  gegen  $B$  aufgetragen ( $vmax = 0.28$ ):



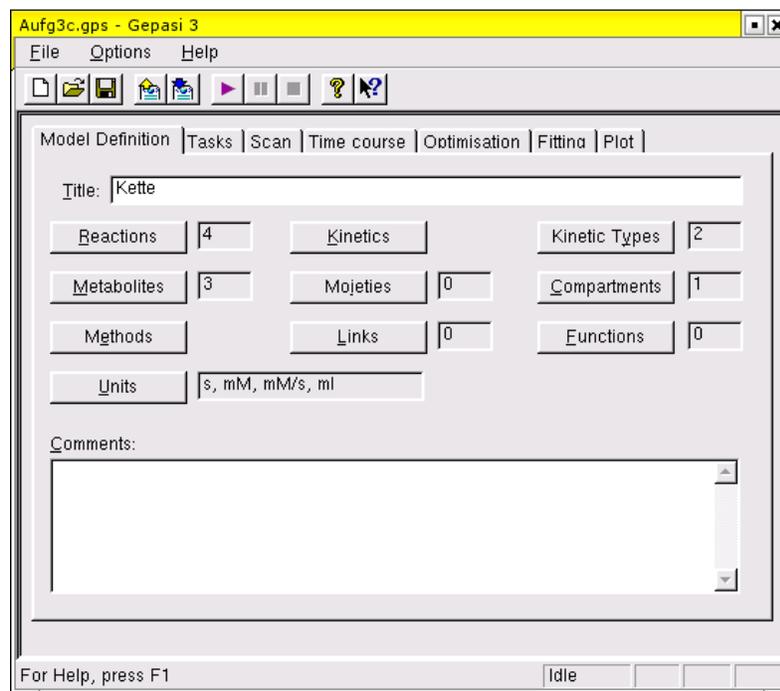
Die Kurve beginnt links unten mit den Startbedingungen ( $B = 0.1$  und  $C = 0.1$ ) und macht zunächst einen weiten Bogen. Dies entspricht der ersten, etwas größeren Oszillation in der vorherigen Abbildung. Danach schmiegt sich die Kurve von Außen an einen geschlossenen Zyklus, den sogenannten Grenzzyklus, an. Er beschreibt ein stabiles oszillatorisches Verhalten des Systems.

### c) Metabolische Kontrollkoeffizienten

Die metabolische Kontrollanalyse führen wir mit dem Programm *GEPASI* durch.

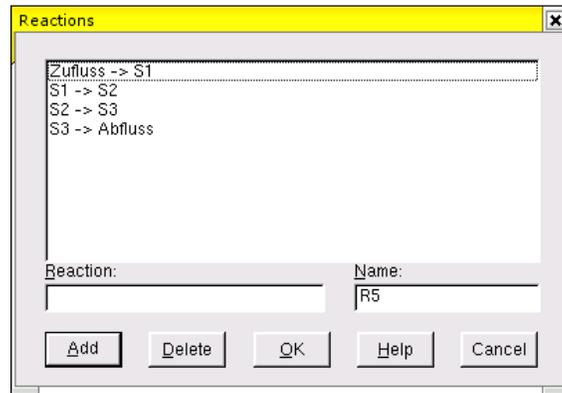
**Die irreversible Kette**  $\rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow$

Zunächst geben wir das Modell in Gepasi ein. Die Abbildung zeigt *GEPASI* beim Programmstart:

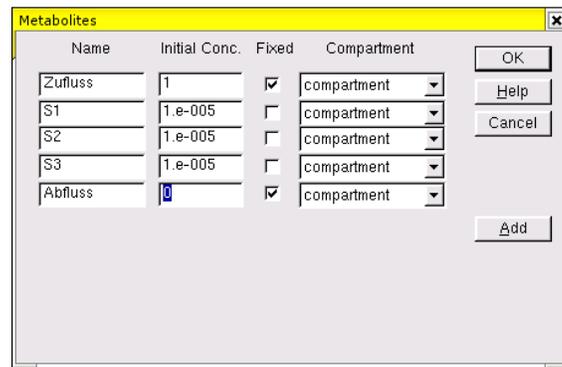


Als ersten Schritt definieren wir die Reaktionsschritte. Dazu klicken wir auf den Button “Re-

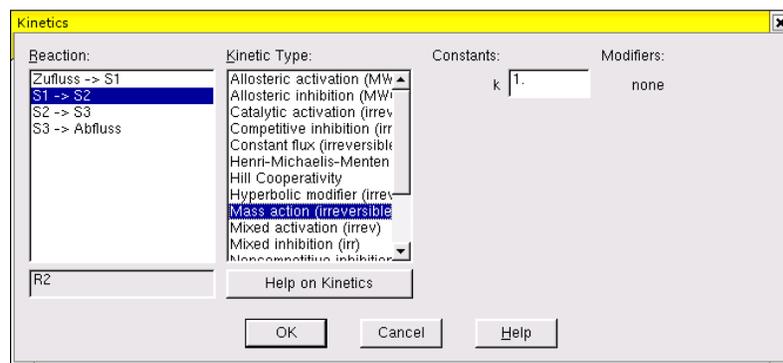
actions". Es erscheint folgender Dialog, in dem wir nacheinander die Reaktionen in der Form "S1->S2" usw. eingeben.



Danach müssen wir die Anfangskonzentrationen angeben und festlegen, daß Zufluß und Abfluß keine Variablen, sondern feste Größen sind. Das machen wir in der Dialogbox, die mit dem Button "Metabolites" aufgerufen wird.



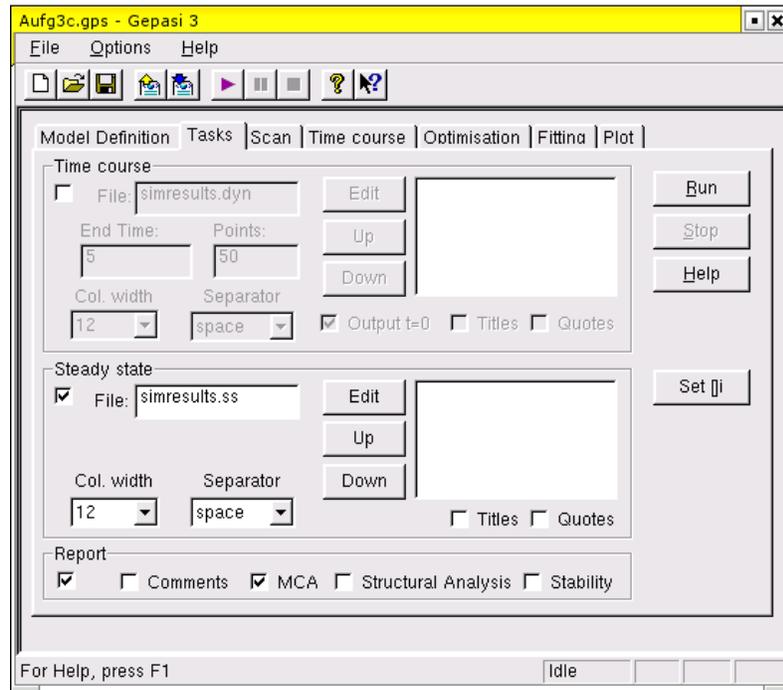
Außerdem muß noch festgelegt werden, welche Art von Kinetik die einzelnen Reaktionen haben. Dazu gehen wir in die Dialogbox "Kinetics" und legen für jede Reaktion "Mass Action" als "Kinetic Type" fest. Die Reaktionskonstante kann auf 1 belassen werden (Die Einstellungen müssen einzeln für jede Reaktion vorgenommen werden).



Um die Analyse durchzuführen, wechseln wir in das Menü "Tasks" und nehmen die Einstellungen wie in der folgenden Abbildung vor. Die Einstellungen bedeuten:

- keine Simulation ("Time course" nicht aktiviert)

- Berechnen des Gleichgewichtszustandes (“Steady state” aktiviert)
- Ausgabe eines Reports mit metabolischer Kontrollanalyse (“Report” und “MCA” aktiviert)



Die Berechnung wird mit “Run” gestartet, das Ergebnis wird in einem Text-Fenster angezeigt:

```

*****
* Gepasi version 3.30 *
* Intel Pentium executable *
* Thursday, 21 November 2002, 14:58 *
*****

KINETIC PARAMETERS
R1 (Mass action (irreversible))
k = 1.0000e+000
R2 (Mass action (irreversible))
k = 1.0000e+000
R3 (Mass action (irreversible))
k = 1.0000e+000
R4 (Mass action (irreversible))
k = 1.0000e+000

STEADY STATE SOLUTION
[ Zufluss] = 1.000000e+000 mM, tt = 0.000000e+000 s, rate = 0.000e+000 mM/s
[ S1] = 1.000000e+000 mM, tt = 1.000000e+000 s, rate = 0.000e+000 mM/s
[ S2] = 1.000000e+000 mM, tt = 1.000000e+000 s, rate = 0.000e+000 mM/s
[ S3] = 1.000000e+000 mM, tt = 1.000000e+000 s, rate = 0.000e+000 mM/s
[ Abfluss] = 0.000000e+000 mM, tt = 0.000000e+000 s, rate = 0.000e+000 mM/s
J(R1) = 1.000000e+000 mM*ml/s
J(R2) = 1.000000e+000 mM*ml/s
J(R3) = 1.000000e+000 mM*ml/s
J(R4) = 1.000000e+000 mM*ml/s

```

## METABOLIC CONTROL ANALYSIS

### ELASTICITIES

$$e(R1, [\text{Zufluss}]) = 1.0000e+000$$

$$e(R2, [S1]) = 1.0000e+000$$

$$e(R3, [S2]) = 1.0000e+000$$

$$e(R4, [S3]) = 1.0000e+000$$

### FLUX CONTROL COEFFICIENTS

#### R1

$$C(J(R1), R1) = 1.0000e+000$$

$$C(J(R1), R2) = 0.0000e+000$$

$$C(J(R1), R3) = 0.0000e+000$$

$$C(J(R1), R4) = 0.0000e+000$$

#### R2

$$C(J(R2), R1) = 1.0000e+000$$

$$C(J(R2), R2) = 0.0000e+000$$

$$C(J(R2), R3) = 0.0000e+000$$

$$C(J(R2), R4) = 0.0000e+000$$

#### R3

$$C(J(R3), R1) = 1.0000e+000$$

$$C(J(R3), R2) = 0.0000e+000$$

$$C(J(R3), R3) = 0.0000e+000$$

$$C(J(R3), R4) = 0.0000e+000$$

#### R4

$$C(J(R4), R1) = 1.0000e+000$$

$$C(J(R4), R2) = 0.0000e+000$$

$$C(J(R4), R3) = 0.0000e+000$$

$$C(J(R4), R4) = 0.0000e+000$$

### CONCENTRATION CONTROL COEFFICIENTS

#### S1

$$C([S1], R1) = 1.0000e+000$$

$$C([S1], R2) = -1.0000e+000$$

$$C([S1], R3) = 0.0000e+000$$

$$C([S1], R4) = 0.0000e+000$$

#### S2

$$C([S2], R1) = 1.0000e+000$$

$$C([S2], R2) = 0.0000e+000$$

$$C([S2], R3) = -1.0000e+000$$

$$C([S2], R4) = 0.0000e+000$$

#### S3

$$C([S3], R1) = 1.0000e+000$$

$$C([S3], R2) = 0.0000e+000$$

$$C([S3], R3) = 0.0000e+000$$

$$C([S3], R4) = -1.0000e+000$$

In diesem File sind zunächst die Zahlenwerte der kinetischen Parameter aufgelistet (in diesem Fall habe alle den Wert 1). Danach sind die Konzentrationen der Substanzen und die Flüsse der Reaktionen in dem vom Programm berechneten Gleichgewichtszustand aufgeführt ("STEADY

STATE SOLUTION”).

Unter “METABOLIC CONTROL ANALYSIS” findet man die vom Programm berechneten Elastizitäten und Kontrollkoeffizienten. Die genaue Definition dieser Größen findet sich im Vorlesungsskript. Hier kann ich nur einige grobe Anhaltspunkte zur Interpretation der Zahlen geben.

Die Elastizitäten beschreiben, wie die Flüsse der einzelnen Reaktionen von den Konzentrationen der Substanzen direkt abhängen. Das kann man auch direkt aus der Modellbeschreibung entnehmen. Wir erkennen z.B., daß der Fluß von Reaktion 2 ( $S1 \rightarrow S2$ ) nur von der Konzentration  $S1$  abhängt (aus der Zeile  $e(R2, [S1]) = 1.0000e+000$ ).

Die Kontrollkoeffizienten beschreiben, wie sich der Gleichgewichtszustand ändert, wenn man die Geschwindigkeit einer Reaktion ändert.

Bei unserem einfachen Beispielsystem lassen sich die einzelnen Werte noch gut verstehen. Die “FLUX CONTROL COEFFICIENTS” besagen, wie sich die Flüsse der Reaktionen im Gleichgewichtszustand ändern, wenn man eine bestimmte Reaktion schneller ablaufen läßt. Die Zeile  $C(J(R1), R1) = 1.0000e+000$

bedeutet z.B., daß sich der Fluß der Reaktion  $R1$  im Gleichgewichtszustand erhöht, wenn man die Reaktion  $R1$  schneller macht. Wir sehen aber auch, daß der Fluß von nichts anderem abhängt, weil die anderen Koeffizienten für  $R1$  gleich null sind. Das scheint zwar trivial zu sein, aber wir müssen uns klarmachen, daß wir es mit einem besonders einfachen Beispielsystem zu tun haben. In komplizierteren Systemen mit Enzymreaktionen (und daher nichtlinearen Kinetiken) ist es nicht mehr so einfach, vorherzusagen, welche Auswirkungen es hat, wenn man eine Reaktion schneller oder langsamer macht.

Weiter sehen wir, daß die Flußkontrollkoeffizienten für alle Reaktionen gleich sind (die ersten vier Zeilen enthalten die gleichen Zahlen wie die nächsten vier usw.); das ist verständlich, schließlich muß in einer Reaktionskette ohne Verzweigungen im Gleichgewichtszustand der Fluß jeder Reaktion gleich sein. Dieser Gesamtfluß hängt ausschließlich von der Reaktion  $R1$  ab (das sieht man daran, daß in jeder Vierergruppe von Zeilen in der ersten Zeile eine 1 und in den übrigen eine 0 steht). Auch das ist verständlich, denn die Reaktionen sind irreversibel (eigentlich eine unrealistische Annahme) und daher können die hinteren Reaktionen überhaupt keinen Einfluß auf die erste Reaktion und damit auf den Gesamtdurchsatz haben.

Ähnliche Aussagen können mit Hilfe der Konzentrationskontrollkoeffizienten (“CONCENTRATION CONTROL COEFFICIENTS”) gemacht werden. Wir können z.B. ablesen, daß die Konzentrationen aller beteiligten Substanzen steigen, wenn der Zufluß erhöht wird (in jeder Vierergruppe von Zeilen steht in der ersten Zeile eine 1). Und die Zeile

$C([S2], R3) = -1.0000e+000$

besagt z.B., daß die Gleichgewichtskonzentration  $S2$  sinkt, wenn die Reaktion  $R3$  ( $S2 \rightarrow S3$ ) schneller wird.

### Reversible Ketten $\rightarrow S1 \rightleftharpoons S2 \rightleftharpoons S3 \rightleftharpoons P$ und $\rightleftharpoons S1 \rightleftharpoons S2 \rightleftharpoons S3 \rightleftharpoons P$

Hierzu gebe ich nur den Hinweis, daß reversible Reaktionen mit dem Zeichen “=” eingegeben werden. Für  $S1 \rightleftharpoons S2$  gibt man also “ $S1=S2$ ” ein. Dann muß die Kinetik angepaßt werden (“mass action (reversible)”). Als Konstante für die Rückreaktion schlage ich 0.5 vor. Ansonsten kann man vorgehen wie beim ersten Aufgabenteil. Es folgt ein Ausschnitt aus dem Ergebnis für die vollständig reversible Kette:

#### FLUX CONTROL COEFFICIENTS

$R1C(J(R1), R1) = 5.3333e-001$

$C(J(R1), R2) = 2.6667e-001$

$C(J(R1), R3) = 1.3333e-001$

$C(J(R1), R4) = 6.6667e-002$

#### R2

$C(J(R2), R1) = 5.3333e-001$

$C(J(R2), R2) = 2.6667e-001$

C(J(R2),R3) = 1.3333e-001  
C(J(R2),R4) = 6.6667e-002

R3

C(J(R3),R1) = 5.3333e-001  
C(J(R3),R2) = 2.6667e-001  
C(J(R3),R3) = 1.3333e-001  
C(J(R3),R4) = 6.6667e-002

R4

C(J(R4),R1) = 5.3333e-001  
C(J(R4),R2) = 2.6667e-001  
C(J(R4),R3) = 1.3333e-001  
C(J(R4),R4) = 6.6667e-002

#### CONCENTRATION CONTROL COEFFICIENTS

S1

C([S1],R1) = 5.3333e-001  
C([S1],R2) = -3.0476e-001  
C([S1],R3) = -1.5238e-001  
C([S1],R4) = -7.6190e-002

S2

C([S2],R1) = 5.3333e-001  
C([S2],R2) = 2.6667e-001  
C([S2],R3) = -5.3333e-001  
C([S2],R4) = -2.6667e-001

S3

C([S3],R1) = 5.3333e-001  
C([S3],R2) = 2.6667e-001  
C([S3],R3) = 1.3333e-001  
C([S3],R4) = -9.3333e-001

Auf den ersten Blick fällt auf, daß nun jeder Fluß und jede Gleichgewichtskonzentration von jeder Reaktionsgeschwindigkeit abhängt (es gibt keine Null), d.h. selbst in diesem noch relativ einfachen System kann man keine Änderungen vornehmen, ohne mit einer Auswirkung auf jeden einzelnen Bestandteil zu rechnen. Die Metabolische Kontrollanalyse dient dazu die Größe dieser Auswirkungen abzuschätzen.