Modellierung und Simulation in der Biochemie

Ursula Kummer

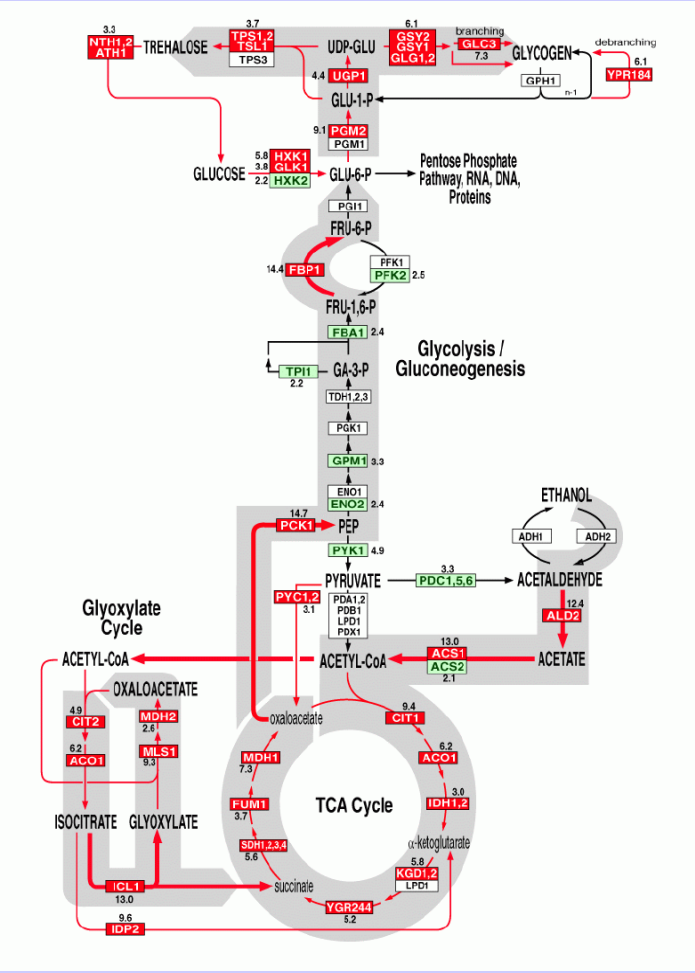
Vorlesung 1

Einzelne Reaktionen, Kinetik, Enzymkinetik, Komplexe Kinetik

Übersicht

- Einführung
- Reaktionskinetik allgemein
- Einfache Enzymkinetik
- Komplexe Enzymkinetik
- Fallbeispiele
- Datenbanken

Biochemische Netzwerke



- Bestehen aus metabolischen und informationsprozessierenden Pfaden, die miteinander verlinkt sind

- Interaktion zwischen Reaktionen/Pfaden durch Effektoren, die enzymatische Aktivitäten beeinflussen

- Verschiedenste experimentelle Daten als Grundlage der Modellierung

Aufgaben und Ansatz der Modellierung

Aufgaben:
- Modelle zu falsifizieren/validieren
- “Counterintuitive” Hypothesen finden
- Schnelle und effektive Aufklärung von Mechanismen

Ansatz:
- Problemorientierter Ansatz (z.B. Detailierungsgrad)
- Pragmatismus -> “Every model is a lie!”

Reaktionsordnung

Reaktion 0. Ordnung: z.B. konst. Zerfall

A (unendlicher Pool) ⟶ B

Reaktion 1. Ordnung: z.B. radioaktiver Zerfall

A ⟶ B

Reaktion 2. Ordnung: z.B. zwei Reaktanten reagieren miteinander

A + B ⟶ C

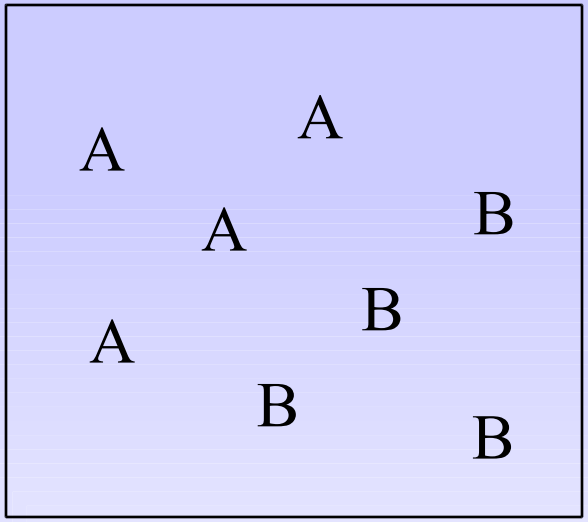
Einfache Reaktionskinetik I

Einfachster Fall:

A -------> B

Reaktionsgeschwindigkeit:

$d[A]/dt = dA/dt = A' = -k*[A] = -k*A$
$d[B]/dt = dB/dt = B' = k*[A] = k*A$



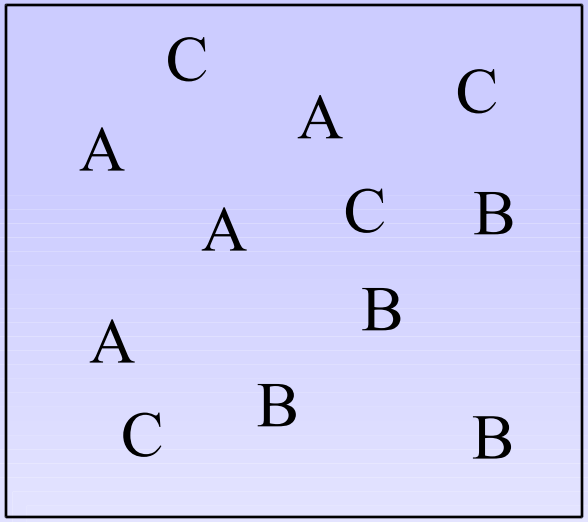
Einfache Reaktionskinetik II

Zwei Reaktanten:

A + B -------> C

Reaktionsgeschwindigkeit:

d[A]/dt = dA/dt = A’ = -k*[A]*[B] = -k*A*B
d[B]/dt = dB/dt = B’ = -k*[A]*[B] = -k*A*B



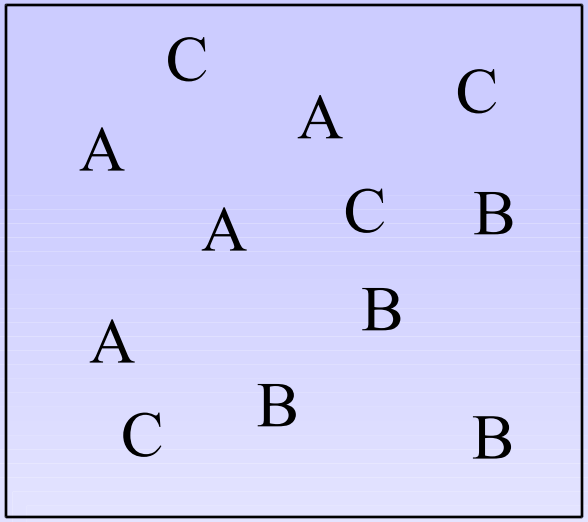
Einfache Reaktionskinetik III

Drei Reaktanten:

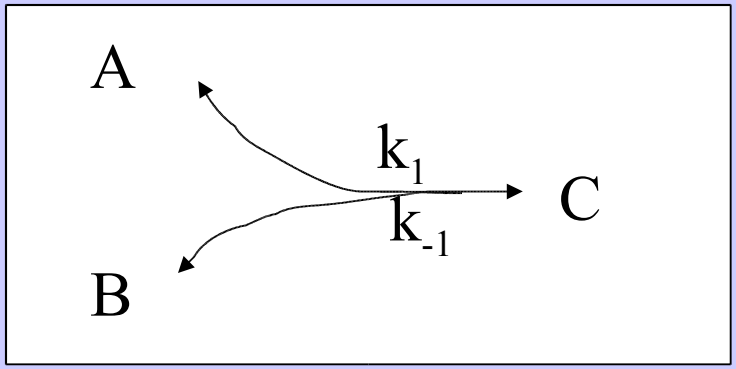
A + 2B -------> C

Reaktionsgeschwindigkeit:

$d[A]/dt = dA/dt = A' = -k*[A]*[B]^2 = -k*A*B^2$
$d[B]/dt = dB/dt = B' = -k*[A]*[B]^2 = -k*A*B^2$



Reaktionskinetik - Reversibilität



Reversible Reaktion

$$K = \frac{[C]}{[A] * [B]}$$

Gleichgewichtskonstante

$d[A]/dt = - k_1 * [A] * [B] + k_{-1} * [C]$

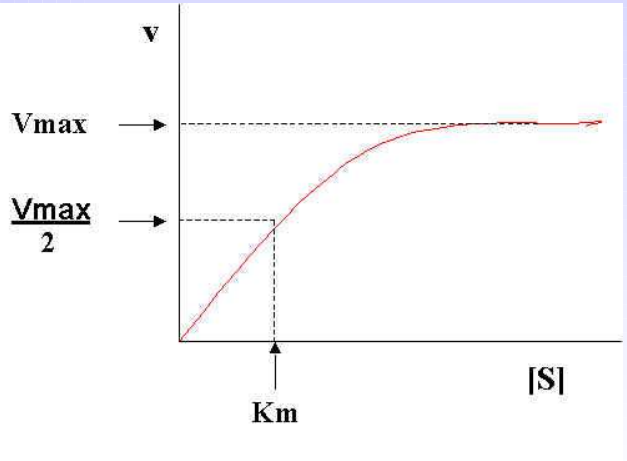
$d[B]/dt = -k_1 * [A] * [B] + k_{-1} * [C]$

$d[C]/dt = k_1 * [A] * [B] - k_{-1} * [C]$

Systemgleichungen

Enzyme, die Biokatalysatoren

- Die Geschwindigkeit biochemischer Reaktionen folgt meist einer Sättigungskurve.
- Wenn alle Enzyme belegt sind, kann die Geschwindigkeit nicht mehr zunehmen, auch wenn mehr Substrat dazukommt.
- Die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit entspricht Km.



Reaktionssysteme mit enzymatischer Katalyse

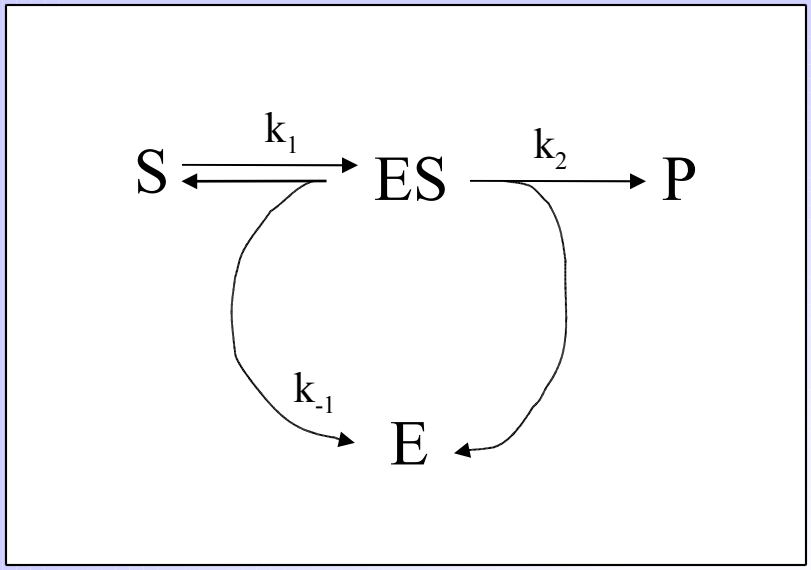
Einfacher Fall:

Als Systemgleichungen ergeben sich mit der Näherung, daß ES sich im partiellen steady state befindet:

d ES/dt = 0

und der Definition $K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$

$$\frac{dS}{dt} = -k2 * E0 * \frac{S}{(Km + S)}$$



Herleitung Michaelis-Menten

$E + S <=> ES \rightarrow E + P$

Systemgleichungen:

$S' = -k_1*E*S + k_{-1}*ES$

$E' = -k_1*E*S + k_{-1}*ES + k_2*ES$

$ES' = k_1*E*S - k_{-1}*ES - k_2*ES$

$P' = k_2*ES$

Annahme des “quasi-steady-state”:

$ES' = 0 \rightarrow k_1*E*S = (k_{-1}+k_2)*ES$

$\rightarrow k_1*(Etot - ES)*S = (k_{-1}+k_2)*ES$

$\rightarrow ES = Etot*S/(S + (k_{-1}+k_2)/k1)$

$\Rightarrow P' = k_2*Etot*S(S + Km)$

Einschub: Schnelle und langsame Variablen

Langsame Variablen:

S,P sind echte Reaktanten, die im Normalfall in großen Konzentrationen auftreten. Herausnehmen eines Teilchens hat keinen Einfluß auf die Konzentration.

Charakteristikum: Große Relaxationszeiten

Schnelle Variablen:

E, ES etc. sind Katalysatoren und Zwischenprodukte in kleinen Konzentrationen.

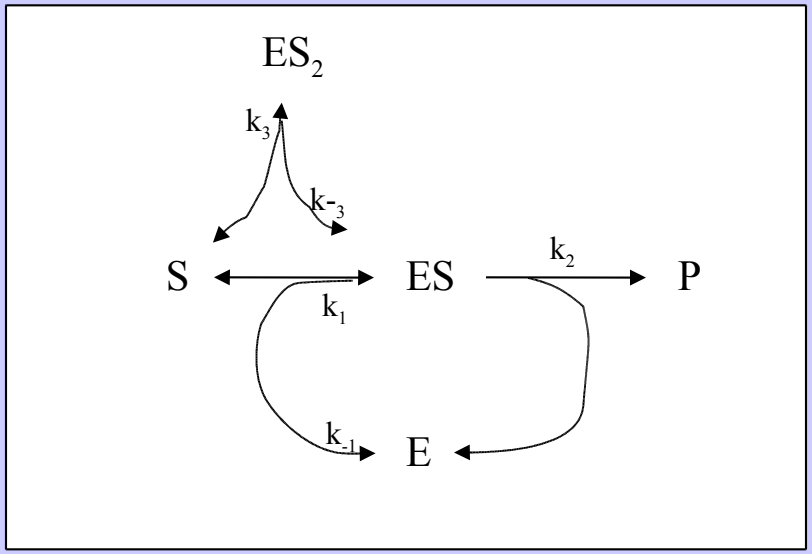
Charakteristikum: Kleine Relaxationszeiten

Dgl. Der schnellen Variablen (sogenannte steife Dgl.) werden gleich null gesetzt. Schnelle Variablen können als quasistationär relativ zu den langsamenVariablen betrachtet werden, da sie sich sofort auf die langsamen einstellen.

Vorsicht: Immer sehr sorgfältig überprüfen!!

Reaktionssysteme mit enzymatischer Katalyse

Katalyse mit Substratinhibition:



Analoge Vorgehensweise liefert:

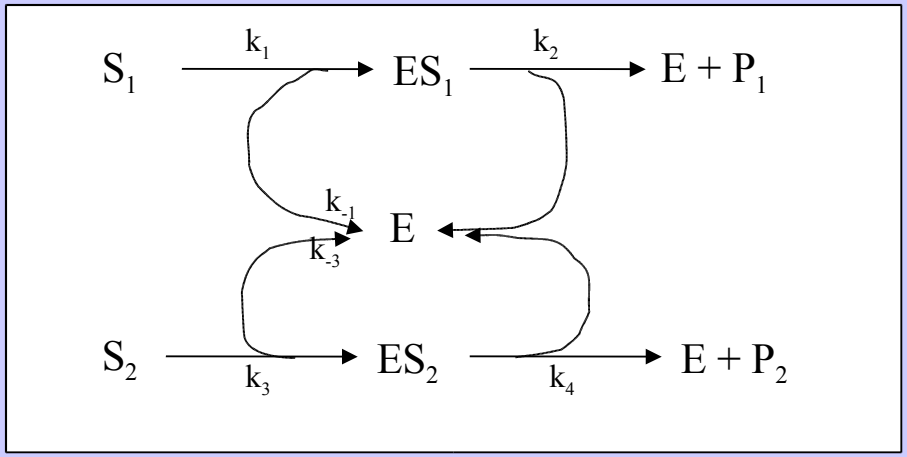
$$\frac{dS}{dt} = -k2 * E0 * \frac{S}{(Km + S + Ki * S^2)}$$

mit

$$Ki = \frac{(k-1 + k2) * k3}{k1 * k-3}$$

Reaktionssysteme mit enzymatischer Katalyse

Zwei konkurrierende Substrate:



Partieller steady state:

$d\,ES_1/dt = k_1*E*S_1 - (k_{-1} + k_2)*ES_1 = 0$

$d\,ES_2/dt = k_3*E*S_2 - (k_{-3} + k_4)*ES_2 = 0$

Gesamtgeschwindigkeit $v = k_2*ES_1 + k_4*ES_2$

$E_0 = E + ES_1 + ES_2$

Bsp: Teilgeschwindigkeit:

$$\frac{dP1}{dt} = k2 * E0 * \frac{S1 * Km2}{(S1 * Km2 + S2 * Km1 + Km1 * Km2)}$$

Reaktionsssysteme mit zwei Substraten - BiBi

Das erste Substrat S1 bindet an das Enzym, um den Enzymsubstrat-komplex ES1 zu bilden. Dann bindet das zweite Substrat ES1S2. Die Reaktion produziert EP1P2 und Produkt P1 wird vor Produkt P2 freigesetzt.

E + S1 <=> ES1 <=> ES1S2 ----> EP1P2 ---> EP2 + P1 ---> E + P2

Davon abgeleitet ergibt sich:

$$V = V1 * \frac{S1 * S2}{(KiS1 * KmS2 + KmS2 * S1 + KmS1 * S2 + S1 * S2)}$$

Reaktionsssysteme mit zwei Substraten - Ping-Pong

Das erste Substrat S1 vereinigt sich wiederum mit E zu ES1. Dann wird jedoch schon das erste Produkt P1 freigesetzt. Das zweite Substrat S2 bindet nun und Produkt P2 wird freigesetzt.

E + S1 <==> ES1 ----> E* + P1 <===> ES2 ------> E + P2

Hier ergibt sich folgende Geschwindigkeit:

$$V = V1 * \frac{S1 * S2}{(KmS2 * S1 + KmS1 * S2 + S1 * S2)}$$

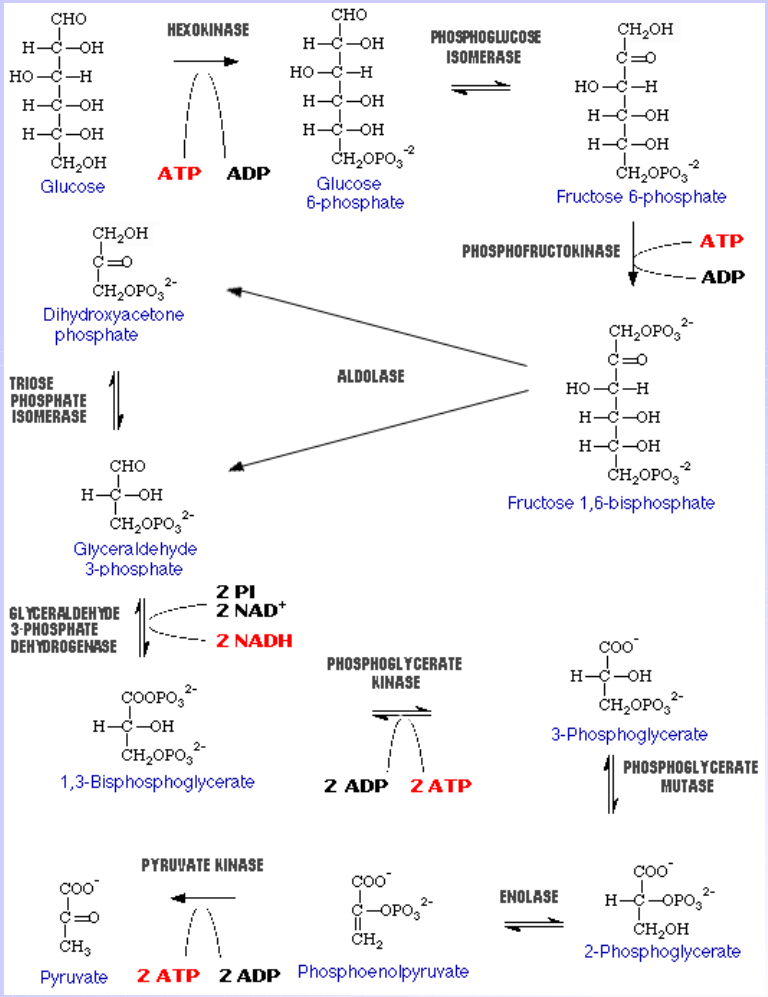
Fallbeispiel 1 - Pyruvatkinase

Pyruvatkinase:

Katalysiert die Reaktion

PEP + ADP ------->
Pyruvat + ATP

Reaktion verläuft schnell



Fallbeispiel 1 - Pyruvatkinase

$$v_{\rightarrow} = \frac{V_{10m}[ADP][PEP]}{(K_{10PEP}+[PEP])(K_{10ADP}+[ADP])}$$

Beide Substrate beeinflussen sich bei der Bindung nicht

-> Spezialfall der BiBi-Reaktion

$$V = V1 * \frac{S1 * S2}{(KiS1 * KmS2 + KmS2 * S1 + KmS1 * S2 + S1 * S2)}$$

Fallbeispiel 2 - Peroxidase

Die Peroxidase-Oxidase-Reaktion

Gesamtgleichung:

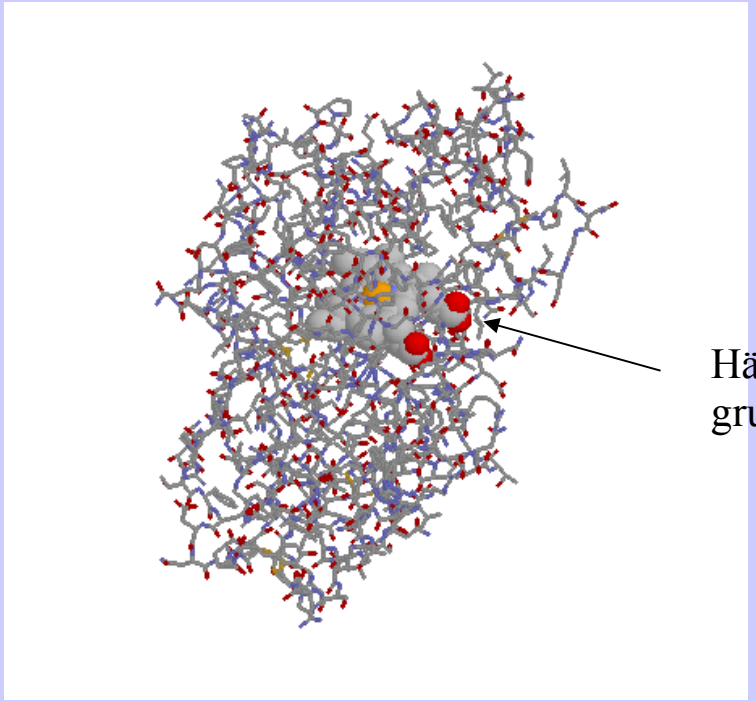
$2NADH + O_2 + 2H^+ \text{ ---> } 2NAD^+ + 2H_2O$

Enzym:

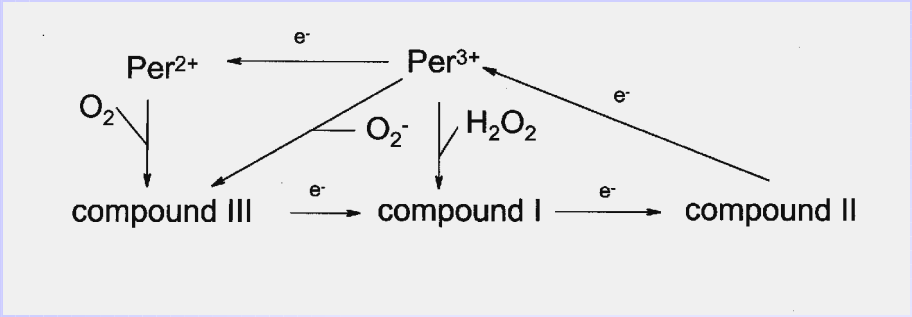
Peroxidase aus Pflanzen und Tieren

Fallbeispiel 2 - Peroxidase

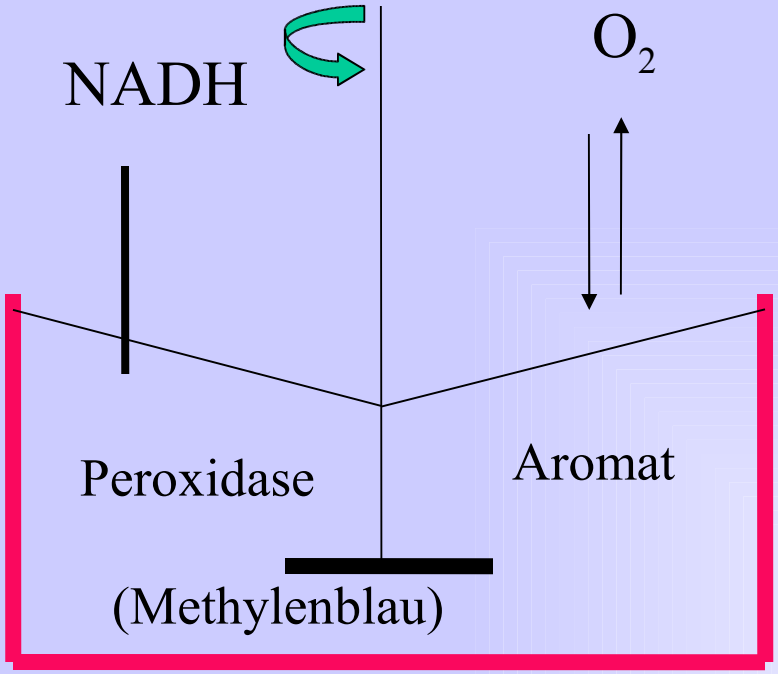
Struktur



Enzymintermediate

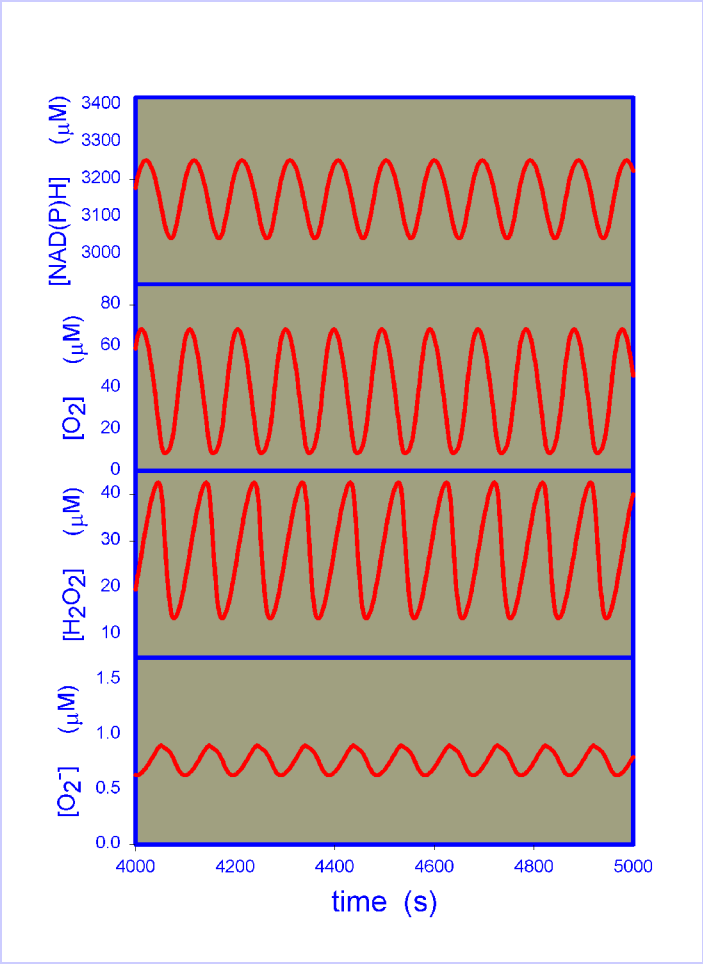


Fallbeispiel 2 - Peroxidase *in vitro*



$$2NADH + O_2 \longrightarrow 2NAD^+ + 2H_2O$$

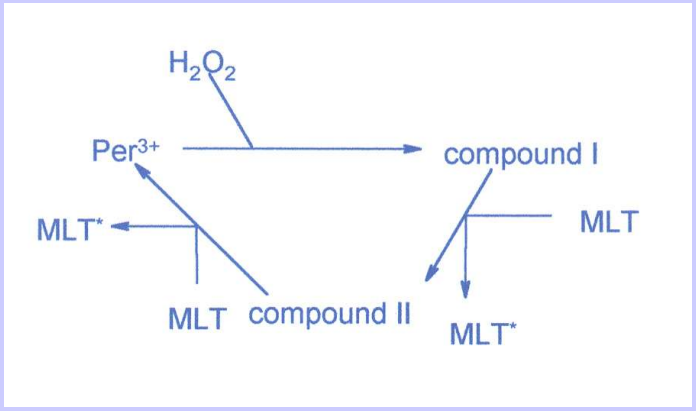
Fallbeispiel 2 - Peroxidase Kinetik

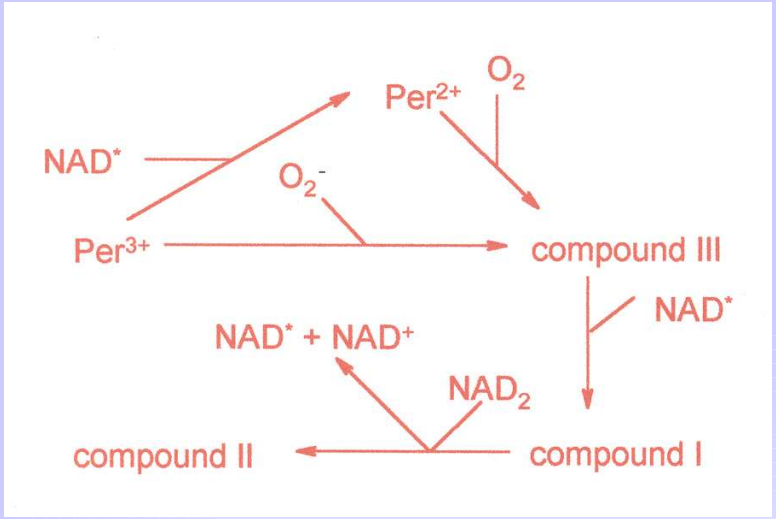


- Die Reaktion oszilliert unter verschiedenen Bedingungen
- Die Oszillationen können viele Stunden andauern

Fallbeispiel 2 - Peroxidase

Elementarreaktionen





$NADH + MLT^* \longrightarrow NAD^* + MLT + H^+$

$NAD^* + O_2 \longrightarrow NAD^+ + O_2^-$

$2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$

$2NAD^* \longrightarrow NAD_2$

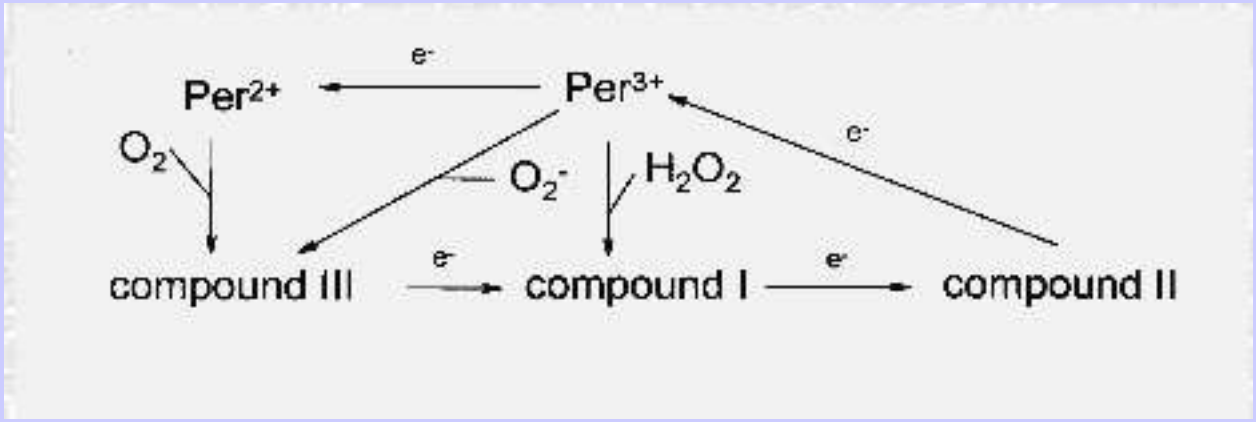
$NADH + O_2 + H^+ \longrightarrow NAD^+ + H_2O_2$

$NAD^+ \longrightarrow NADH$ (enzymatic)

$\rightleftharpoons O_2$

$2NADH + O_2 + 2H^+ \rightarrow 2NAD^+ + 2H_2O$ (respiration)

Fallbeispiel 2 - Peroxidase



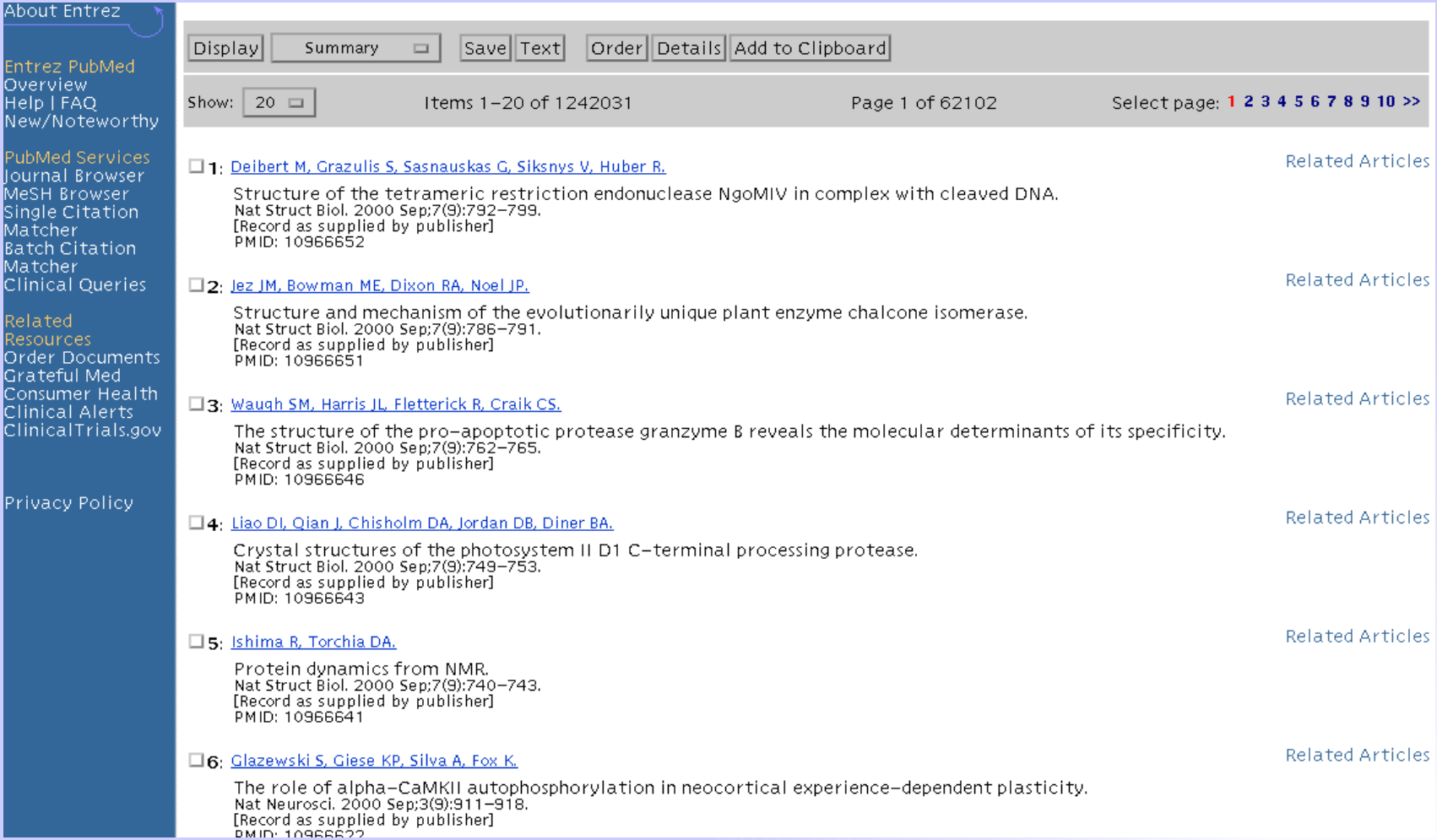
1. $H_2O_2 + per^{3-} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} coI$	$k_1[H_2O_2]_p[Per^{3+}]_p - k_{-1}[coI]_p$	$k_1 = 5.0 \times 10^7\ M^{-1}\ s^{-1}$ $k_{-1} = 58\ s^{-1}$
2. $coI + MLTH \xrightarrow{k_2} coII + MLT^{\cdot}$	$k_2[coI]_p[MLTH]_p$	$k_2 = 1.0 \times 10^7\ M^{-1}\ s^{-1}$
3. $coI + MLTH \xrightarrow{k_3} per^{3+} + MLT^{\cdot}$	$k_3[coII]_p[MLTH]_p$	$k_3 = 4.0 \times 10^3\ M^{-1}\ s^{-1}$
4. $per^{3+} + O_2^- \xrightarrow{k_4} coII$	$k_4[per^{3+}]_p[O_2^-]_p$	$k_4 = 1.1 \times 10^7\ M^{-1}\ s^{-1}$
5. $2H^+ + 2O_2^- \xrightarrow{k_5} H_2O_2 + O_2$	$k_5[O_2^-]_c^2$	$k_5 = 1.0 \times 10^7\ M^{-1}\ s^{-1}$
6. $coII + O_2^- \xrightarrow{k_6} coI + O_2$	$k_6[coII]_p[O_2^-]_p$	$k_6 = 1.0 \times 10^5\ M^{-1}\ s^{-1}$
Reactions occurring in cytoplasm:		
7. $NADPH + O_2 \xrightarrow{k_7} NADP^+ + H_2O_2$	$k_7[NADPH]_c[O_2]_c$	$k_7 = 1\ M^{-1}\ s^{-1}$
8. $NADP^{\cdot} + O_2 \xrightarrow{k_8} NADP^+ + O_2^-$	$k_8[NADP^{\cdot}]_c[O_2]_c$	$k_8 = 5.0 \times 10^7\ M^{-1}\ s^{-1}$
9. $2H^+ + 2O_2^- \xrightarrow{k_9} H_2O_2 + O_2$	$k_9[O_2^-]_c^2$	$k_9 = 5.0 \times 10^8\ M^{-1}\ s^{-1}$
10. $MLT^{\cdot} + NADPH \xrightarrow{k_{10}} MLTH + NADP^{\cdot}$	$k_{10}[MLT^{\cdot}]_c[NADPH]_c$	$k_{10} = 1.0 \times 10^7\ M^{-1}\ s^{-1}$
11. $2NADP^{\cdot} \xrightarrow{k_{11}} (NADP)_2$	$k_{11}[NADP^{\cdot}]_c^2$	$k_{11} = 6.0 \times 10^7\ M^{-1}\ s^{-1}$
12. $\xrightarrow{k_{12}} NADPH$	k_{12}	$k_{12} = 22\text{–}35\ \mu M\ s^{-1}$
13. $\underset{k_{-13}}{\overset{k_{13}}{\rightleftharpoons}} O_2(cytoplasm)$	$k_{13} - k_{-13}[O_2]_c$	$k_{13} = 12.5\ \mu M\ s^{-1}$ $k_{-13} = 4.5 \times 10^{-2}\ s^{-1}$
Diffusion terms:		
14. $O_2\ (phagosome) \underset{k_{-14}}{\overset{k_{14}}{\rightleftharpoons}} O_2\ (cytoplasm)$	$k_{14}([O_2]_p - [O_2]_c)$	$k_{14} = 30\ s^{-1}$
15. $H_2O_2\ (phagosome) \underset{k_{-15}}{\overset{k_{15}}{\rightleftharpoons}} H_2O_2\ (cytoplasm)$	$k_{15}([H_2O_2]_p - [H_2O_2]_c)$	$k_{15} = 30\ s^{-1}$
16. $MLTH\ (phagosome) \underset{k_{-16}}{\overset{k_{16}}{\rightleftharpoons}} MLTH\ (cytoplasm)$	$k_{16}([MLTH]_p - [MLTH]_c)$	$k_{16} = 10\ s^{-1}$
17. $MLT^{\cdot}\ (phagosome) \underset{k_{-17}}{\overset{k_{17}}{\rightleftharpoons}} MLT^{\cdot}\ (cytoplasm)$	$k_{17}([MLT^{\cdot}]_p - [MLT^{\cdot}]_c)$	$k_{17} = 10\ s^{-1}$
18. $O_2^-\ (phagosome) \underset{k_{-18}}{\overset{k_{18}}{\rightleftharpoons}} O_2^-\ (cytoplasm)$	$k_{18}([O_2^-]_p - [O_2^-]_c)$	$k_{18} = < 0.01\ s^{-1}$
NADPH oxidase:		

Beispiel für Systemgleichung:

coII’ = k2*coI*MLTH - k3*coII*MLTH

Datenbanken 1

- Wenig Quellen für kinetische Parameter außerhalb der Literatur!
  Als Literaturdatenbank empfehlenswert: PubMed



Datenbanken 2

Zur Identifikation der Funktion von Enzymen, gibt es einige DB:

- Metabolische Pfade
  - KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes http://www.genome.ad.jp/kegg/metabolism.html
  - Auschnitte aus der Boehringer Map http://www.expasy.ch/cgi-bin/search-biochem-index

Datenbanken 3

NiceProt View of SWISS-PROT: P21730

[General] [Name and origin] [References] [Comments] [Cross-references] [Keywords] [Features] [Sequence] [Tools]

General information about the entry	
Entry name	**C5AR_HUMAN**
Primary accession number	**P21730**
Secondary accession number(s)	None
Entered in SWISS-PROT in	Release 18, May 1991
Sequence was last modified in	Release 18, May 1991
Annotations were last modified in	Release 36, July 1998

Name and origin of the protein	
Protein name	C5A ANAPHYLATOXIN CHEMOTACTIC RECEPTOR
Synonym(s)	C5A-R CD88 ANTIGEN
Gene name(s)	C5R1 OR C5AR
From	Homo sapiens (Human)
Taxonomy	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

References

[1]
SEQUENCE FROM N.A.
MEDLINE=91156029; PubMed=1847994. [NCBI, ExPASy, Israel, Japan]
Gerard N.P., Gerard C.;
"The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin.";
Nature 349:614-617(1991).

[2]
SEQUENCE FROM N.A.
MEDLINE=91175748; PubMed=2007135. [NCBI, ExPASy, Israel, Japan]
Boulay F., Mery L., Tardif M., Brouchon L., Vignais P.;
"Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells.";
Biochemistry 30:2993-2999(1991).

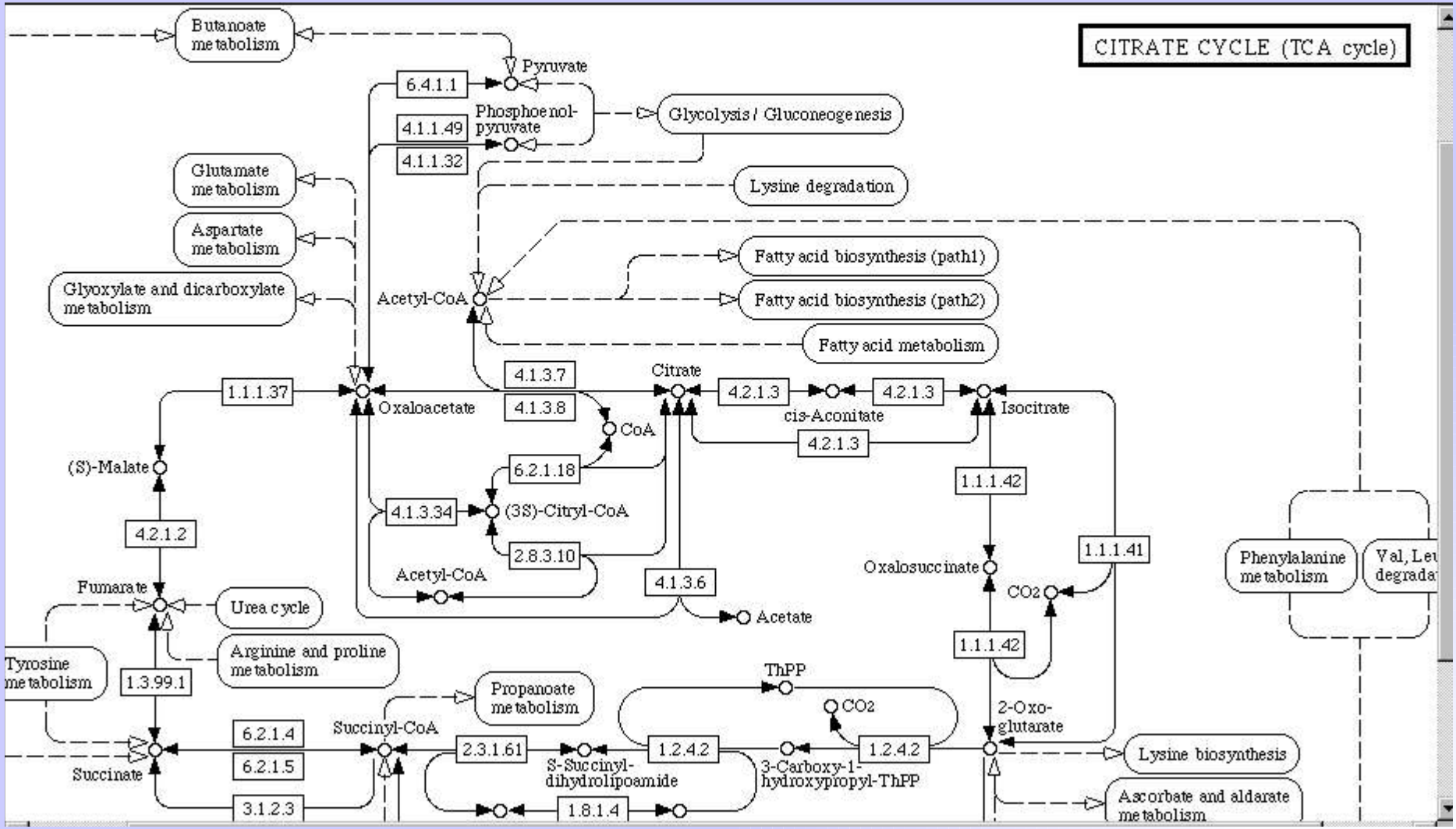
Comments

- ***FUNCTION***: RECEPTOR FOR THE CHEMOTACTIC AND INFLAMMATORY PEPTIDE ANAPHYLATOXIN C5A. THIS RECEPTOR STIMULATES CHEMOTAXIS, GRANULE ENZYME RELEASE AND SUPEROXIDE ANION PRODUCTION.
- ***SUBCELLULAR LOCATION***: INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN.
- ***SIMILARITY***: BELONGS TO FAMILY 1 OF G-PROTEIN COUPLED RECEPTORS.
- ***DATABASE***: NAME=PROW; NOTE=CD guide CD88 entry; WWW="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/cd/cd88.htm".

Copyright

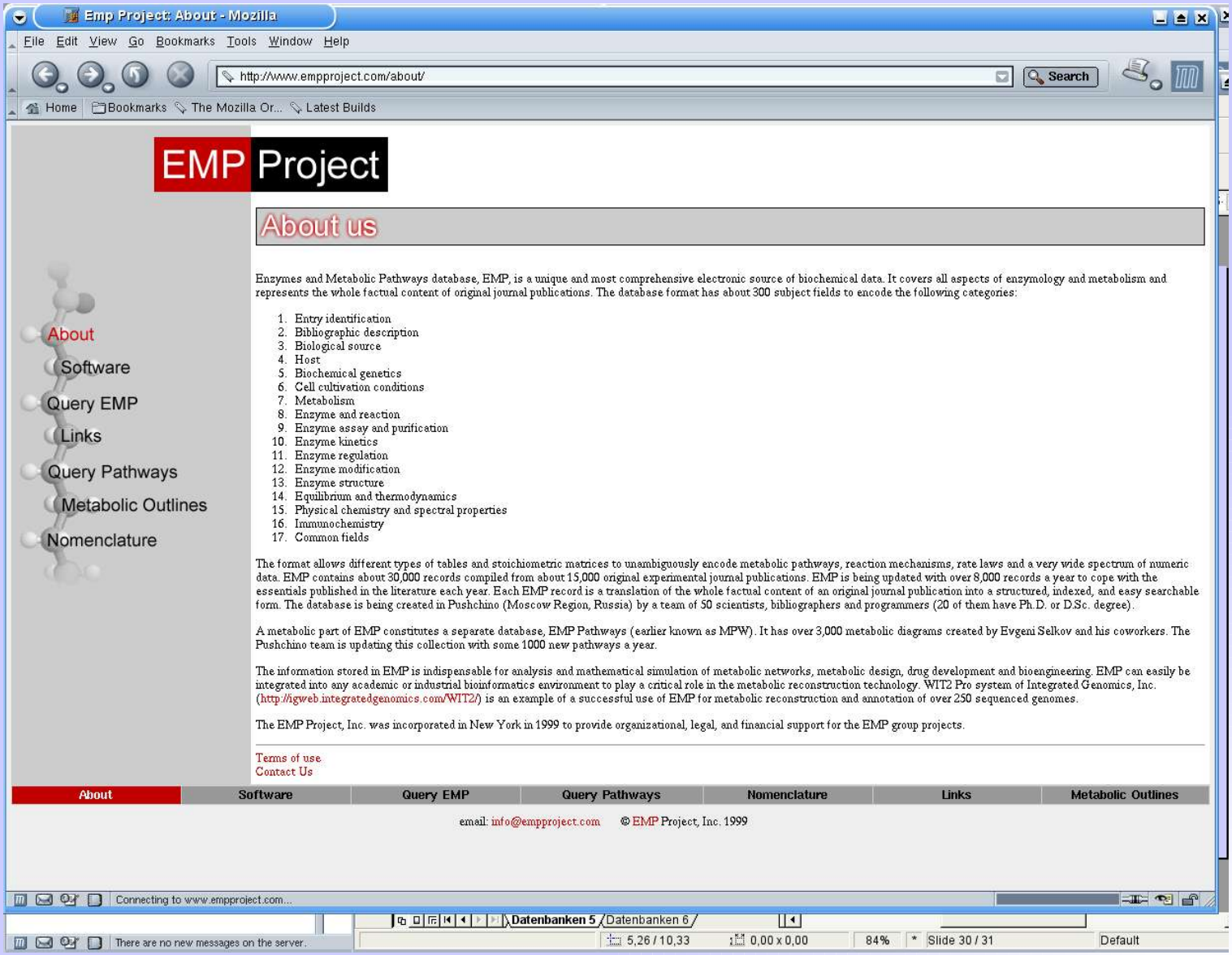
Datenbanken 4

KEGG:



EMP:

Datenbanken 5



Datenbanken 6

- Kinetische Daten im Wesentlichen bei BRENDA erhältlich
- BRENDA ist manuell hergestellt! -> fehlerbehaftet
- Oft unvollständig
- www.brenda.uni-koeln.de