# Integration von zellulären Stoffwechselund Signalnetzwerken

Rien ne va plus – nichts geht mehr ohne sie, die früher schon mal als Simulanten und Schönfärber der Wissenschaft Geschmähten. Aus der Simulation, einst eine der Haupttriebfedern für die Entwicklung von Computern überhaupt, ist längst eine allgegenwärtige Querschnittstechnologie geworden, deren Ergebnisdaten in immer größerer Zahl immer schneller produziert – nur durch grafische Aufbereitung oder Visualisierung interpretierbar bleiben.



## 1. Einführung

Experimentelle Beobachtungen und mathematische Modellierung und Simulation sind zwei zentrale und nicht trennbare Aspekte der Systembiologie. Beide Bereiche zeigen in den vergangenen Jahren stürmische Entwicklungen. Technologische Fortschritte im Bereich der Hochdurchsatztechnologien für die Sequenzierung der Genome, die experimentellen Analysen der Expression der genetischen Informationen, die Beobachtungen der mannigfaltigen Interaktionen zwischen den Proteinen und die ganzheitliche Erfassung der Konzentrationen der Metabolite in verschiedenen biologischen Systemen haben dabei zu einer noch nie dagewesenen Fülle von Daten in der experimentellen Biologie geführt. Der durchaus berechtigte Begriff der "Datenfluten" spiegelt eindrucksvoll das unverkennbare Missverhältnis zwischen Datengenerierung und Datenverarbeitung wider. Der Begriff der Verarbeitung beschränkt sich in diesem Zusammenhang nicht auf das Informationsmanagement im Sinne von Datenbanken, sondern zielt auf den Erkenntnisgewinn, also die Generierung von neuem biologischen Wissen, die zielgerichtete Modifikation biologischer Systeme in der Bioprozesstechnik und die Identifikation multipler Targets bei der Entwicklung neuer pharmazeutischer Wirkstoffe. Die zunehmende Erschließung des Wissens um die Genome der hierbei interessierenden biologischen Systeme erfordern neben den bereits weitgehend verfügbaren experimentellen Methoden zur Entschlüsselung der Genome neue Werkzeuge und Methoden zur Quantifizierung der biologischen Komponenten und für die mathematische Modellierung und Simulation.

- Eine besondere Herausforderung bei der genomweiten mathematischen Modellierung und Simulation stellt die Kopplung von Signal- und Stoffwechselnetzwerken dar. Diese Integration ist aber unerlässlich, um die Verarbeitung von Informationen in und zwischen Zellen mit der Verteilung von materiellen Stoffflüssen im biologischen System zu verknüpfen. In der systemorientierten, ganzheitlichen Analyse werden diese Netzwerke häufig getrennt betrachtet, und es ist sogar eine Tendenz zu beobachten, Signaltransduktionsprozesse und Stoffwechselnetzwerke in eigenen wissenschaftlichen Communities zu behandeln.
- Im vorliegenden Beitrag wird versucht, Gemeinsamkeiten aber auch einige Besonderheiten dieser beiden Formen zellulärer Netzwerke herauszustellen. Diese Fragestellungen werden zunächst auf den Ebenen der Identifikation und Strukturanalyse der Netzwerke diskutiert. Am ausgewählten Beispiel der Kopplung von Zellzyklus und Energiestoffwechsel bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* soll darüber hinaus die Kopplung von Modulen aus der Signaltransduktion und dem Stoffwechsel gezeigt werden.

## 2. Rekonstruktion von zellulären Netzwerken

Selbstverständlich müssen vor jedweder Analyse zellulärer Netzwerke, sei es die des Stoffwechsels oder der Informationsverarbeitung, in einem ersten Schritt die für die Lösung der interessierenden Probleme relevanten Netzwerke identifiziert werden. Vor dem Hintergrund der Abertausenden zellulären Komponenten und ihrer gleichermaßen vielfältigen wie komplexen Interaktionen ist dieser Schritt der Rekon-

struktion mit gleichzeitiger Fokussierung auf das Wesentliche keineswegs trivial. Insbesondere ist bei vielen Fragestellungen unklar, welche Details zu berücksichtigen sind, beziehungsweise welche Granularität in der Modellierung erforderlich ist. Prinzipiell stehen für die Lösung dieser schwierigen Aufgabe zwei in der Regel komplementäre Strategien bereit: der Bottom-up und der Topdown Ansatz (01).

- Bei der Rekonstruktion der Netzwerke mit Hilfe des Bottom-up Ansatzes wird versucht, biologisches Detailwissen über Einzelkomponenten und deren molekulare Wechselwirkungen in geeigneten Modulen zu aggregieren, um diese nachfolgend in für ganzheitliche Betrachtungen geeigneten Architekturen zu verschalten. Der Top-down Ansatz geht vom Gesamtsystem aus und verarbeitet dabei ganzheitliche Informationen (Genom, Transkriptom, Proteom etc.). Über globale Optimierungen sind dann die strukturellen gegebenenfalls aber auch die kinetischen Eigenschaften der Komponenten im Gesamtnetzwerk zu rekonstruieren. Die hierfür erforderlichen Operationen werden auch unter dem Begriff des "Reverse Engineering" zusammengefasst. Bei dieser Analyse ist also der Ausgangspunkt für die Netzwerkrekonstruktion bereits eine ganzheitliche Betrachtungsweise.
- In die Bewertung der beiden Ansätze fließen verschiedene Kriterien ein. Zunächst einmal sind Kenntnisse

### SUMMARY

Eine besondere Herausforderung in der Systembiologie stellt die Kopplung von Signal- und Stoffwechselnetzwerken dar. Diese Integration ist aber unerlässlich, da das phänotypische Verhalten von zellulären Systemen sowohl von den Prozessen der Signalübertragung als auch durch Stoffwechselprozesse bestimmt wird. In der systemorientierten, ganzheitlichen Analyse werden diese Netzwerke häufig getrennt betrachtet, und es ist sogar eine Tendenz zu beobachten, Signaltransduktionsprozesse und Stoffwechselnetzwerke in eigenen wissenschaftlichen Communities zu behandeln.

Im vorliegenden Beitrag wird versucht, Gemeinsamkeiten aber auch einige Besonderheiten dieser beiden Formen zellulärer Netzwerke herauszustellen. Diese Fragestellungen werden zunächst auf den Ebenen der Identifikation und Strukturanalyse der Netzwerke diskutiert. Am ausgewählten Beispiel der Kopplung von Zellzyklus und Energiestoffwechsel bei der Hefe Saccharomyces cerevisiae soll darüber hinaus die Kopplung von Modulen aus der Signaltransduktion und dem Stoffwechsel gezeigt werden.

Integrating signalling networks with metabolic networks poses a major challenge in systems biology. The coupling is essential since phenotypic behaviour of cellular systems results from both (1) signal transduction and (2) distribution of metabolic fluxes. In systems biology, however, signalling networks and metabolic networks are often treated separately and, more and more, within specialised scientific communities.

In this contribution, the authors try to work out similarities but also to discriminate between the two network classes. At first, the problem is discussed on the basis of structural network analysis. In the following section, the linkage of modules from signal transduction and metabolism is exemplified by the cell cycle and energy metabolism in the yeast Saccharomyces cerevisiae.



Bottom-up und Top-down Ansätze in der Systembiologie.

über die notwendigen Details bezüglich der zu berücksichtigenden Komponenten des Netzwerkes a priori nicht vorhanden. Demzufolge gibt es natürlich Risiken, bedeutsame Einflussgrößen bei den experimentellen Beobachtungen und der Rekonstruktion des Netzwerkes beim Bottom-up Ansatz zu übersehen. Häufig reicht auch der Stand des Wissens nicht aus, um die zur Lösung des Problems relevanten Komponenten und deren Wechselwirkungen bereit zu stellen. Andererseits ist der Rechenaufwand bei der holistischen Rekonstruktion von Netzwerken via Top-down Ansätzen u.U.



In silico-Netzwerkrekonstruktion. (1) Die Netzwerkkomponenten werden aus der Datenbank gezogen. (2) Das computergestützte Layout beschleunigt die Rekonstruktion. Die Elemente- und Ladungsbilanzen und die damit durchgeführten Konsistenzüberprüfungen laufen im Hintergrund (INSILICO discovery; http://www.insilico-biotechnology.com). Die roten Kästen symbolisieren die Stoffwandler, die blauen Kreise die Stoffspeicher. außerordentlich groß. In der Tat können Methoden der Rekonstruktion der Verschaltung in Regulationsnetzwerken wie genomweite topologische Analysen an der kombinatorischen Explosion scheitern. Neuere Erkenntnisse bei der dynamischen Analyse großer Netzwerke (Mauch et al., unveröffentlichte Untersuchungen) liefern indes Hinweise, dass die Zuordnung des Verhaltens der Einzelkomponenten an Bedeutung verliert. Dieser Sachverhalt geht auf die Beobachtung zurück, dass die Sensitivitäten der Kontrolle über das gesamte Netzwerk verteilt sind. Diese geringere Empfindlichkeit der Verhaltensweise des Einzelbausteins im Kontext des Gesamtsystems entspricht der biologischen Plastizität und erleichtert die dynamische Modellierung großer Netzwerke.

- Der Stand des Wissens und vor allem der Mangel an Methoden und Werkzeugen im Bereich der Top-down Ansätze erlaubt derzeit noch keine zuverlässige beziehungsweise endgültige Bewertung der beiden Strategien. Man darf daher die beiden Methoden als komplementäre Strategien betrachten.
- Die Genome zahlreicher Mikroorganismen, wie z.B. des Bakteriums Escherichia coli und der Hefe Saccharomyces cerevisiae, wurden nicht nur erfolgreich sequenziert, sondern auch bereits funktionell charakterisiert. Die Informationen sind in öffentlich zugänglichen Datenbanken (z.B. EcoCyc, SGD) verfügbar. Die Rekonstruktion von metabolischen Netzwerken wird darüber hinaus durch entsprechende Links zu Proteindatenbanken (z.B. Swiss-Prot) erleichtert. Diese geben darüber Auskunft, welche Gene unter verschiedenartigsten Umweltbedingungen exprimiert werden. Im Falle der Signalnetzwerke stehen vergleichbare Informationen nur außerordentlich beschränkt zur Verfügung und biologisches Wissen über die Funktionalität der einzelnen Bausteine des Netzwerkes muss in der Regel aus primären Literaturquellen extrahiert werden. Die ersten Datenbanken über Signalnetzwerke sind aber im Entstehen (z.B. http://www. signaling-gateway.org).
- Das wichtigste Werkzeug in der Analyse von biologischen Netzwerken ist die Bilanzierung der chemischen Spezies im Netzwerk. Diese Bilanzierung erfordert zunächst einmal eine Überprüfung der Konsistenz des rekonstruierten Netzwerkes. Hierzu sind die Bilanzen der chemischen Elemente und der elektrischen Ladungen der Moleküle zu kontrollieren. Diese Kontrollen geben Hinweise auf Unvollständigkeiten beziehungsweise auch Fehler in den angenommenen Reaktionsgleichungen. Für die Rekonstruktion und das Management dieser Netzwerke stehen verschiedene Modellierungs- und Simulationswerkzeuge zur Verfügung (02). Nach der essentiellen Konsistenzüberprüfung können dann verschiedene topologische Analysen durchgeführt werden. Diese liefern Hinweise über beispielsweise nicht genutzte Transformationsschritte (fehlende Verbindungen im Netz), sogenannte Dead-end Metabolite (fehlende Anschlussreaktionen), parallele Wege und die wichtigen elementaren Moden im System. Diese Elementarmoden, die sich auch für genom-

weite Netze berechnen lassen (Mauch et al., 2002), liefern Hinweise über die unterschiedlichsten Stoffwechselwege im biologischen System, die von einem vorgegebenen Ausgangsstoff (z.B. Nährsubstrat) zu einem Produkt (z.B. ausgeschiedener Metabolit oder Biomasse) führen. Hieraus lassen sich beispielsweise im Fall von biotechnischen Prozessen jene Stoffwechselwege in der Zelle identifizieren, die zu maximalen Ausbeuten (kgProdukt /kgSubstrat) führen. Die gleiche Analyse führt zur Beantwortung der Frage, welche Gene für eine vorgegebene Funktionalität (z.B. Produktion eines Stoffwechselproduktes) essentiell sind, beziehungsweise wie viele Gene gleichzeitig auszuschalten sind, um eine spezifische Dysfunktion des Netzwerkes herbeizuführen. Letztgenannte Analyse führt zum Begriff der "strukturellen Robustheit" des Systems, ein anschauliches Maß für die Sensitivität einer Funktionalität gegenüber genetischen Defekten.

- Außerordentlich hilfreich für die diversen Analysen der interessierenden Systeme sind automatisierte Visualisierungen (Layouts). (03) zeigt als Beispiel das genomweite metabolische Netzwerk des Bakteriums Helicobacter pylori, das aus der Datenbank MetaCyc (http://biocyc.org/meta) rekonstruiert wurde. Bei der Visualisierung der Rekonstruktion wurden die in der klassischen Biochemie definierten Stoffwechselwege, wie z.B. "Glykolyse", "TCA-Zyklus" und "Pentosephosphat-Shunt" in Gruppen aggregiert. Es ist darauf hinzuweisen, dass diese "klassischen" Stoffwechselwege keineswegs mit den oben erwähnten Elementarmoden, die der mathematisch strengen Definition eines elementaren Stoffwechselweges entsprechen, übereinstimmen.
- (04) zeigt die Visualisierung eines Signalnetzwerkes für den transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Dieses Netzwerk wurde aus primären Literaturdaten rekonstruiert. Die Zahl der Netzwerkkomponenten (561) ist in vergleichbarer Grössenordnung wie bei dem metabolischen Netzwerk in (03) (461). Trotz dieser vergleichbaren Grösse der Netze sieht man aber sofort gravierende Unterschiede in den Topologien.
- Zunächst einmal lässt sich in keinem der beiden Netze eine modulare Organisation und klare Abgrenzungen von kleineren, autonomen Netzwerken erkennen. Diese

rein visuelle Beobachtung wird durch Analysen der Netzwerktopologie bestärkt. In der Tat zeigen neuere Untersuchungen (Eeka et al., 2000; Ravasz et al., 2002, Barabasi and Oltvai, 2004), dass die metabolischen Netzwerke durch die Eigenschaften so genannter skalenfreier Topologie gekennzeichnet sind. Aus der Darstellung in **(05)** geht hervor, dass auch das metabolische Netzwerk des Bakteriums Helicobacter pylori eine ska-

lenfreie Topologie zeigt, wobei die Steigung einen Exponenten von 2,4 liefert. Eine charakteristische Eigenschaft dieser skalenfreien Netzwerke ist die Existenz einiger hochvernetzter Knoten (hubs), wie z.B. ATP, NADPH etc., die an einer großen Zahl von Verbindungen (Reaktionen) beteiligt sind. Infolge dieser hochvernetzten Knoten ist eine Dekomposition des Gesamtnetzes in abgegrenzte, autonome Teilnetze (Module) nicht möglich.

Im Unterschied zum metabolischen Netzwerk liefert das Signalnetz den deutlich niedrigeren Exponenten von 1,5 (05). Dies darf man als Hinweis werten, dass die Architektur des Signalnetzes durch eine im Vergleich zum metabolischen Netz geringere Anzahl von hochvernetzten Knoten zusammengehalten wird. Weitere interessante Unter-

schiede lassen sich beobachten, wenn man versucht, das oben erwähnte Konzept der Elementarmoden auf die Signalnetze zu übertragen. Dabei lassen sich zunächst einmal keine Lösungen (Signalwege) finden, die den Eingang (Rezeptor für das Ein-

gangssignal) mit dem Ausgang (z.B. Aktivierung eines Transkriptionsfaktors für die Genexpression) verbindet. Vielmehr zeigen die Lösungen eine Fragmentierung in sehr kleine Regionen, die sich als Signaltransduktionseinheiten interpretieren lassen. Beispiele für diese kleinsten Einheiten sind Assoziationen und Dissoziationen von Proteinkomplexen, Aktivierungen und



Genomweites metabolisches Netzwerk des Bakteriums Helicobacter pylori. Das Netzwerk besteht aus 450 Reaktionen und 461 Metaboliten. (A) Glykolyse (B) Pentosephosphat shunt (C) TCA Zyklus. Datenbank: MetaCyc (http://biocvyc.org/meta). Das H. pylori-Netzwerk kann als SBML-file von http://sbml.org/models/ heruntergeladen werden (SBML: Systems Biology Markup Language).



Signaltransduktionsnetzwerk mit Rezeptoren für den transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Das Netzwerk enthält 553 Reaktionen und 561 Komponenten. Die Mehrzahl der Komponenten sind Proteine. Das TGF- $\beta$  Netzwerk kann als SBML-file von http://sbml.org/models/ heruntergeladen werden.



Verteilung des Verknüpfungsgrades P(k). k ist die Zahl der Verknüpfungen pro Knoten und P(k) ist die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion der Knoten mit k Verknüpfungen im Netz. Links: Verteilung der Verknüpfungen der Metabolite im metabolischen Netz von H. pylori. Rechts: Verteilung der Verbindungen der Speicher im Signalnetz (TGF- $\beta$ ). Deaktivierungen von Enzymen oder Transportprozessen über die Grenzen von Zellkompartimenten. Bei der Aggrega-

tion dieser Einheiten zu größeren Signalnetzen lassen sich direkte Verbindungen der Einheiten zu Signalkaskaden und "Fernwirkungen" über Kinasen beobachten. Während die Regeneration innerhalb der elementaren Einheit durch einen materiellen Stofffluss gekennzeichnet ist, kommt es nach Aggregation nicht mehr zur Übertragung von Stoffflüssen, sondern von Informationen im Signalnetz. Ein weiterer Unterschied zwischen den Signalnetzen und den metabolischen Netzen be-



Materieller Stofffluss im Stoffwechselnetzwerk und Informationsübertragung im Signalnetzwerk. einer anderen Reaktion bewirken kann. Eine Komponente im Signalnetz (z.B. Protein) kann indes sowohl als Reaktand wie auch als Katalysator einer anderen Transformation in Erscheinung treten (**T.01**).

Stoffwechselnetzwerk	Signalnetzwerk
Materieller Stofffluss	Informationsübertragung
Der Stationäre Zustand ist für die Funktio- natität des metabolen Netzwerks von gro- ßer Bedeutung	Die Funktion wird durch transientes Ver- halten bestimmt
Die Enzyme treten nicht als Reaktanden in Erscheinung	Komponenten, die transformiert werden, sind häufig Katalysatoren anderer Reak- tionen

## 3. Integration von Signal- und Stoffwechselnetzwerken

## 3.1. Biologische Fragestellung

Eine inhärente Eigenschaft von Zellpopulationen ist ihre Heterogenität. Diese Heterogenität hat ihre Ursachen in den unterschiedlichen Lebensstadien der individuellen Zellen. Das dynamische Verhalten der Gesamtpopulation ergibt sich demzufolge aus der Superposition der Dynamik der individuellen Zellen. Da sich die Dynamik der zellulären Netzwerke in Abhängigkeit des Zellalters beziehungsweise der jeweiligen Position im Zellzyklus verändert, führt die Superposition zu einem dynamischen Verhalten auf der Populationsebene, das zunächst einmal keine Rückschlüsse auf das Verhalten der Einzelzelle zulässt. Diese systeminhärente Problemstellung manifestiert sich in einer Reihe ebenso interessanter wie auch offener Fragen der systembiologischen Analysen in der Biomedizin wie auch Biotechnologie. Es ist bekannt, dass Subpopulationen unterschiedliche Wirkungen auf Medikamente zeigen können. Beispielsweise ist die Wirkung der Cytostatika in der Krebstherapie von der Zellzyklusposition der individuellen Zellen im Tumor abhängig (Smith et al., 2000; Kitano 2003). Gänzlich andere Auswirkungen kann die Heterogenität der individuellen Zellen in biotechnologischen Anwendungen haben. So kann der Gehalt der Plasmide, Träger zusätzlicher extrachromomaler DNA, von Zelle zu Zelle varijeren. Diese Phänomene sind dann für quantitative Analysen von Prozessen mit rekombinanten Mikroorganismen von großer Bedeutung.

> Die zentrale Rolle des sekundären Messengers cAMP (cyclisches AMP) bei der Koordinierung des Energiestoffwechsels und des Zellzyklus bei der Hefe Saccharomyces cerevisiae soll als Beispiel für die Unterschiede des Verhaltens auf der Ebene der individuellen Zellen und den Eigenschaften der Population dienen. Mit diesem Beispiel soll aber auch zugleich die Bedeutung der Kopplung von Stoffwechsel- und Signal-

netzwerken aufgezeigt werden. In Anwendung dieser Kopplung auf die individuelle

Charakteristische Eigenschaften der Stoffwechsel- und Signalnetzwerke. Zelle wird schließlich die Frage adressiert, wie der unterschiedliche Energiebedarf während der verschiedenen Phasen des Zellzyklus abgedeckt werden kann. Für die mathematische Modellierung dieser Problemstellung wird ein Konzept vorgestellt, das auf der Aggregation verschiedener Module basiert. Diese Modellierungsstrategie ist dann dem in (**01**) skizzierten Bottom-up Ansatz zuzuordnen.

## 3.2. Kopplung des Zellzyklus mit dem Energiestoffwechsel

- (07) illustriert die wichtigsten Teile des cAMP-Signalnetzwerkes in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und dessen Ankopplung an den Energie- und Speicherstoffwechsel. Das Signal des Botenstoffs cAMP wird in Folge einer Aktivierung der Adenylatcyclase gebildet und durch die Wirkung der Phosphodiesterasen wieder abgebaut. Ausgelöst wird der für die Bildung des Signals entscheidende Teil des Signalweges entweder durch einen zellexternen Stimulus (z.B. Zugabe von Glucose) oder durch zellinterne Signalkaskaden unter Mitwirkung der RAS-Proteine.
- Die allgemeine Aufgabe des cAMPs besteht in der Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Hierbei dissoziiert das Tetramer in die zwei katalytischen und ein Dimer der regulatorischen Untereinheiten (C und R). Die katalytischen Untereinheiten können dann verschiedene Substratproteine phosphorylieren. In (07) sind einige der Zielproteine (Enzyme) im Energie- und Speicherstoffwechsel der Hefe dagestellt. In der Glykolyse ist es zunächst einmal die Phosphofructokinase 2 (PFK 2), die die Umwandlung des Metaboliten Fructose-6phosphat in Fructose-2,6-bisphosphat katalysiert. Das Produkt dieser Reaktion ist seinerseits ein sehr starker Aktivator des glykolytischen Enzyms Phosphofructokinase 1 (PFK 1), das die Umwandlung von Fructose-6-phosphat in Fructose-1,6-bisphosphat katalysiert. Der integrale Effekt dieser Phosphorylierung und Aktivierung ist eine Erhöhung der Aktivität des Enzyms PFK 1, so dass eine Verstärkung des Stoffflusses durch die Glykolyse stattfinden kann, wenn unter den entsprechenden physiologischen Bedingungen dieses Enzym einen Einfluss auf die Flusskontrolle ausübt. Weitere durch die katalytische Untereinheit der PKA phosphorylierte Enzyme findet man im Speicherstoffwech-



sel. Hier kommt es zu einer Aktivierung der Trehalase, die für den Abbau des Speicherstoffes Trehalose verantwortlich ist, sowie einer Aktivierung der Glykogenphosphorylase und Inhibierung der Glykogensynthase, was schließlich zum Abbau des zweiten wichtigen Speicherstoffs der Hefe, des Glykogens, führt. Der integrale Effekt dieser zellinternen Regulation ist eine Mobilisierung der Speicherstoffe, die eine Verstärkung des Stoffflusses durch die Glykolyse bewirkt. Mit dieser Stoffflussverstärkung ist eine Zunahme der ATP-Bildung verknüpft.

Neben diesen Zielproteinen im Energiestoffwechsel übernimmt die aktivierte PKA auch wichtige Funktionen in der Regulation des Zellzyklus **(08)**. Hier sind vor allem zwei wichtige Ereignisse herauszustellen. Gemeinsam mit anderen Schlüsselproteinen der Wachstumsregulation (TOR) führt der Anstieg der PKA-Aktivität zu einer Verstärkung der Proteinbiosynthe-



Schematische Darstellung der cAMP-PKA Signaltransduktionskaskade und ausgewählte Verbindungen zum Energiestoffwechsel und Zellzyklus. Die ausgezogenen Linien sind Reaktionen, die gestrichelten Linien repräsentieren Stimulationen ( $\rightarrow$ ) und Inhibierungen ( $\top$ ). Ellipsen sind Proteine, auch zusätzlich markiert, um Phosphorylierungen anzuzeigen.

Abkürzungen: Ac: Acetat, Acald: Acetaldehyd, AcCoA: Acetyl-CoA, APC: anaphase promoting complex, ATP: Adenosintriphosphat, C: Katalvtische Untereinheit der PKA. EtOH: Ethanol, F6P: Fuctose-6-Phosphat, F16BP: Fructose-1,6-Bisphosphat, F26Bpase: Fructose-2,6-Bisphosphatase, Glc: Glucose, G1P: Glucose-1-Phosphat, G6P: Glucose-6-Phosphat, Hxk: Hexokinase, PDC: Pyruvatdecarboxylase, PDH: Pyruvatdehydrogenase, PFK1: Phosphofructokinase 1, PFK2: Phosphofructokinase 2, Pyr: Pyruvat, R: Regulatorische Untereinheit der PKA, TCA: Tricarbonsäurezyklus, UDPG: UDP-Glucose.

Die Phasen des Zellzyklus und dessen Interaktion mit der Proteinkinase A.

Preparation and Cultivation of Synchronous Cultures



Von der kontinuierlichen Züchtung der Hefe Saccharomyces cerevisiae im Bioreaktor über die Elutriationszentrifugation zu der Auftrennung der Zellpopulation in verschiedene Fraktionen. Die kleinen Tochterzellen werden als Inokulum für die nachfolgende Züchtung einer Synchronkultur herangezogen.

se, was über eine Verkürzung der in (08) skizzierten G1-Phase zu einem Anstieg der Wachstumsrate der Hefe führt. Für die Verkürzung diese G1-Phase ist eine weitere Rückkopplung zwischen PKA und den G1-Cyclinen von Bedeutung (Baroni et al., 1994), die schließlich für den Startpunkt des Eintritts in die nächste Zellzyklusphase (S) relevant ist. Des weiteren beeinflusst PKA aber auch den Austritt aus der Mitose, in der die Zellteilung erfolgt. Dieser Einfluss erfolgt ver-

mutlich über eine Inhibierung des Proteinkomplexes APC (anaphase promoting complex), der für die zeitliche Regulation der Trennung der Schwesterchromatiden verantwortlich ist. Diese beiden Schlüsselfunktionen der PKA legen die Vermutung nahe, dass die Konzentration des auslösenden Signals für die PKA-Aktivierung, das cAMP, während des Zellzyklus variieren muss.

Diese Vermutung lässt sich durch gezielte Messungen der Dynamik der Konzentration des intrazellulären Botenstoffes in sogenannten Synchronkulturen erhärten. Ausgangspunkt dieser Synchronkulturen sind zunächst Züchtungen der Hefe bei kontinuierlicher Prozessführung, d.h. zeit-



Dynamik der intrazellulären cAMP-Konzentration, des Gelöstsauerstoffs, des Budding Index (Kennzeichnung der Geburtsnarben; BI) in einer Glucose-limitierten Kultur (Miiller et al., 2003). Die als Cartoon gekennzeichneten Hefezellen zeigen die Zellzyklusposition. lich konstanter spezifischer Wachstumsrate beziehungsweise Verdopplungszeit. Dieser Kultur wird eine Probe entnommen und in einer speziellen Zentrifugation (Elutriationszentrifuge) die Hefezellen in Fraktionen verschiedener Zellgrößen aufgetrennt (09). Mit der dabei gewonnenen Fraktion der kleinsten Tochterzellen wird anschließend ein neuer Prozess unter kontrollierten Wachstumsbedingungen gestartet. Da hierbei alle Zellen

zumindest während eines Zellzyklus das gleiche Alter haben, spricht man auch von einer synchronisierten Kultur. In Verbindung mit schneller Probenahmetechnik (Theobald et al., 1993; Buziol et al., 2002) lassen sich die zeitlichen Verläufe der intraextrazellulären Metabolite sowie des cAMPs verfolgen. Die in (**10**) dargestellten

Ergebnisse bestätigen die Vermutungen bezüglich des Zeitverhaltens des cAMPs (Anstieg in der Nähe der S-Phase und rapider Abfall in der M-Phase (Mitose)), um die Trennung der Zellen sicherzustellen. Weitere experimentelle Untersuchungen zeigen, dass der Anstieg des cAMP Signals zu der erwarteten Mobilisierung der Speicherstoffe der Zelle führt, so dass zusätzlich benötigtes ATP bereitgestellt werden kann. Die durch die Mobilisierung der Speicherstoffe bewirkte Verstärkung des Stoffflusses durch die Glykolyse manifestiert sich auch in einer entsprechenden Erniedrigung des Gelöstsauerstoffs. Offenbar wird ein Teil des zusätzlichen Stoffflusses dem TCA-Zyklus zugeführt, was mit einer Erhöhung des Sauerstoffbedarfs der Kultur einhergeht. Ein weiterer Teil des zusätzlichen Stoffflusses wird aber über einen sogenannten "Metabolic overflow" zum Ethanol umgeleitet, was sich durch entsprechende Messungen des ausgeschiedenen Ethanols belegen lässt.

Eine nach wie vor noch nicht zufriedenstellend beantwortete Frage betrifft das Problem, welcher Stimulus die Aktivität der Adenylat-cyclase beziehungsweise der Phosphodiesterasen in einer zellzyklusabhängigen Art und Weise beeinflusst. Vor dem Hintergrund von Konzepten zur hierarchischen Strukturierung zellulärer Regulationsnetzwerke scheinen zwei Strategien denkbar. Entweder kommt der Stimulus direkt aus dem Zellzyklus oder aber der Energiezustand der Zelle greift direkt in die Regulation ein ("demand control"). Messungen von Adenin- und Guaninnukleotiden während des Zellzyklus (Müller et al., unveröffentlichte Untersuchungen) zeigen Variationen der Konzentrationen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen wird derzeit ein direkter Eingriff des Energiezustandes über die in (07) skizzierte Ras-Kaskade postuliert, die ebenfalls eine Aktivierung der Adenylat-Cyclase bewirken kann.

## 3.3. Entwurf eines modularen Modells für die Kopplung von Energiestoffwechsel und Zellzyklus

Die Fragestellung der quantitativen Beschreibung des Einflusses des cAMP auf das Wachstum der Zellpopulation erfordert im ersten Schritt die mathematische Modellierung und Simulation auf der Ebene der Einzelzelle. Um sicherzustellen, dass das detaillierte biologische Wissen möglichst umfassend Berücksichtigung findet, ist es erforderlich, zunächst auf den in (**01**) dargestellten Bottom-up Ansatz zurückzugreifen. Dieses Modellierungskonzept basiert auf der modularen Strukturierung, wozu Funktionsmodule in geeigneter Weise zu definieren sind. Die für das Einzelzellmodell definierten Funktionsmodule sind nebst ihrer Verschaltung in (**11**) dargestellt.

- Der Funktionsmodul für die Signaltransduktion umfasst die für die Beschreibung der Bildung und Abbau des Botenstoffes cAMP erforderlichen Reaktionen sowie das Teilmodell für die Aktivierung der PKA. Eine für zahlreiche Signaltransduktionsprozesse charakteristische dynamische Eigenschaft dieses Signals ist das über Rückwirkungen im System bewirkte adaptive Verhalten. Im konkreten Fall sind zwei Rückwirkungen von Bedeutung und im Modell zu berücksichtigen. Wie in (07) bereits skizziert, wird eine der für den Abbau des cAMPs verantwortlichen Phosphodiesterasen (Pde1) durch die katalytische Untereinheit C der PKA via Phosphorylierung aktiviert (Ma et al., 1999). Eine Verstärkung erfährt die Rückführung durch die Einwirkung der PKA auf die Konzentration des membrangebundenen Adenylat-Cyclase-Komplexes. Die beiden Rückführungen bewirken eine Rückstellung des cAMP-Signals auch unter Bedingungen anhaltender Stimulation des Signalweges durch extrazelluläre Glucose. Diese Simulationsergebnisse finden ihre Bestätigung im Experiment. Die Bedeutung des adaptiven Verhaltens lässt sich besonders anschaulich an der Dynamik des cAMP-Signals im Zellzyklus erkennen (10). Dem beim Übergang in die S/G2-Phase erkennbaren Maximum in der Konzentration des cAMPs folgt ein rascher Abfall, um die für die Regulation der Trennung der Schwesterchromatiden erforderliche niedrige PKA-Aktivität sicherzustellen.
- Im Kern des Funktionsmoduls für das Stoffwechselnetzwerk stehen die bereits früher am Institut für Bioverfahrenstechnik entwickelten und durch Messungen von intrazellulären Metaboliten validierten dynamischen Modelle für die Glykolyse und den Pentosephosphat-Shunt (Rizzi et al., 1997; Vaseghi et al., 1999). Diese wurden durch Teilmodelle für den Speicherstoffwechsel (Auf- und Abbaureaktionen

der Trehalose und des Glykogens) erweitert. Von besonderer Bedeutung für die Kopplung der Signaltransduktion mit dem Stoffwechselnetzwerk ist die Berücksichtigung der Aktivitätsänderung der Enzyme infolge der Phosphorylierung durch die katalytische Untereinheit der PKA. Dies lässt sich in den kinetischen Ansätzen dadurch berücksichtigen, dass die Maximalraten beziehungsweise Kapazitäten der

Enzyme als Funktion der Konzentration der katalytischen Untereinheit angesetzt werden:

# $r = r_{\max} \left( c_C \right) f \left( \vec{c}_M, \vec{p} \right)$



Architektur des durch Aggregation von verschiedenen Funktionsmodulen resultierenden Einzelzellmodells ( $\mu$  = spezifische Wachstumsrate, r = Rate der enzymkatalysierten Reaktion).

mit  $\vec{c}_{\rm M}$  Vektor der Metaboliten, die die Reaktionsrate beeinflussen und Parametervektor. Auch bei den hier ablaufenden Phosphorylierungen der Zielproteine im Metabolismus beobachtet man adaptives Verhalten. Die im Modell zu berücksichtigenden Rückführungen betreffen Phosphatasen, die die Zielproteine wieder de-

phosphorylieren. Die negative Rückführung wird durch die experimentell zu beobachtende Aktivierung der Phosphatasen durch die katalytische Untereinheit der PKA sichergestellt. Die zwei weiteren in (11)

gezeigten Module betreffen das Zellwachstum und den Zellzyklus. Das Wachstum wird unter Berücksichtigung der Stöchiometrie proportional zu den Stoffflüssen, die das Stoffwech-

selmodul verlassen, angesetzt. Das Zellzyklusmodell basiert auf einem im Schrifttum für die Hefe vorgeschlagenen Modell (Chen et al., 2000; Cross, 2003), das um einige die PKA betreffenden Reaktionen erweitert wurde.

(12) zeigt ein exemplarisches Simulationsergebnis. Bei dieser Simulation wurde als dynamischer Eingang in das Modell die experimentell beobachtete Abhängigkeit des cAMPs im Zellzyklus (10) in einer analytischen Funktion abgebildet. Das



Simulierte Antwort der PKA und Enzymaktivitäten für die Produktion und Degradation des Speicherstoffs Glycogen als Antwort auf das gemessene cAMP Signal während des Zellzyklus. AC: Adenylat-Cyclase, Pde1: Niedrigaffine Phosphodiesterase. Blaue Pfeile illustrieren Stimulationen, rote Pfeile inhibitorische Effekte. r<sub>Gdeg</sub> ist die Reaktionsrate der Glycogenphosphorylase, r<sub>GlySyn</sub> die Rate der Glycogensynthase. Modell beschreibt den Anstieg der Konzentration der katalytischen Untereinheit der PKA am G1/S-Übergang und die hierdurch bewirkte Aktivierung der Glykogenphosphorylase und Inhibierung der Glykogensynthase. Dies bewirkt einen Abfall der Glykogenkonzentration, Anstieg des glykolytischen Flusses und zusätzlichen ATP-Gewinn. In der M-Phase sinkt infolge der fallenden cAMP-Konzentration die PKA-Aktivität wieder ab, während die für das adaptive Verhalten der Zielproteinphosphorylierung wichtige Phosphataseaktivität (PP2A) zunimmt. Die simulierte Dynamik der Glykogenkonzentration während des Zellzyklus stimmt qualitativ mit den experimentellen Beobachtungen (Sillje et al, 1997; Müller et al., 2003) überein.

- Das integrierte Modell erlaubt eine dynamische Simulation der cAMP abhängigen Regulation des Stoffwechsels und der Progression des Zellzyklus. Die modulare Struktur verbindet die Prozesse der Signaltransduktion, des Stoffwechsels und der Zellzyklusdynamik auf der Ebene der Einzelzelle. Für die natürlich ebenfalls interessierende Simulation der Dynamik der Zellpopulation muss die Dynamik der Einzelzellen zu größeren Zellensembles aggregiert werden. Dieser Ensembleansatz, bei dem die Spezies zusätzlich über ausgeschiedene und wieder aufgenommene Metabolite oder Signalsubstanzen kommunizieren und interagieren können, hat sich für die quantitative Beschreibung der Heterogenität von Zellpopulationen bewährt (Henson et al., 2002).
- Der hier gezeigte modulare Ansatz, bei dem das zelluläre Geschehen durch eine Dekomposition in Funktionsmodule strukturiert wird, ist vielversprechend und für zahlreiche Problemstellungen eine zielgerichtete Vorgehensweise. Gleichwohl gibt es auch Einschränkungen. Nach wie vor erlaubt die komplexe Verschaltung der zellulären Netzwerke keine eindeutige Definition dieser Module, die hier als abgegrenzte Teilsysteme für Submodelle herangezogen werden. Ein besonderes Problem stellen biologische Komponenten dar, die in Abhängigkeit der Zeit, der subzellulären Lokalisation oder aber auch von zellexternen Stimuli in unterschiedlichen Modulen mit unter Umständen sogar veränderten Funktionen auftreten.

Bei der hier diskutierten Fragestellung gibt es eine weitere Einschränkung. Die kürzlich am Institut abgeschlossenen experimentellen Beobachtungen über die zeitlichen Variationen der Konzentrationen der Adenin- und Guaninnukleotide während des Zellzyklus zeigen eine ausgeprägte Dynamik, die unter Umständen mit der in (07) gezeigten Ras-Kaskade wechselwirkt und auf diese Weise Einfluss auf die Aktivität der Adenylat-Cyclase nimmt. Eine solche direkte Interaktion erlaubt über die oben skizzierte Signaltransduktion in die Aktivitäten des Stoffwechsels eine zusätzliche Energielieferung bei Bedarf, der sich beispielsweise im Absinken der ATP-Konzentration manifestiert. Während diese "demokratische" Hierarchie zellulärer Regulation den Umweg über die übergeordnete hierarchische Ebene des Zellzyklus einspart und damit u.U. sehr viel schneller und effizienter ist, stellt dies für die Modellierung und Simulation eine erhebliche Erweiterung der Komplexität dar. Besonders das ATP ist einer der in Abschnitt 1 vorgestellten hochvernetzten Knoten (Hubs) im Netzwerk. Eine Bilanzierung dieser Komponente lässt sich nicht mehr über Submodelle bewerkstelligen und verlangt demzufolge ein großskaliges Gesamtmodell. Zur effizienteren Lösung dieser schwierigen Fragestellungen im Grenzgebiet zwischen den Top-down und Bottom-up Ansätzen empfiehlt sich unter Umständen eine Strategie, bei der ein detailliertes und leistungsfähiges Modell einer Funktionseinheit mit einer weniger detaillierten Beschreibung des Gesamtnetzwerkes vernetzt wird, um die Dynamik der hochvernetzten Knoten mit hinreichender Genauigkeit zu erfassen. Im Entwurf dieser großskaligen, deutlich über die Grenzen von Funktionsmodulen hinausreichenden dynamischen Zellmodelle, wird man sich auf die strukturellen Informationen zur Topologie der Stoffwechselund Signalnetze stützen.

> Klaus Mauch Dirk Müller Matthias Reuss

## Literatur

- Anghileri P, Branduardi P, Sternieri F, Monti P, Visintin R, Bevilacqua A, Alberghina L, Martegani E, Baroni MD (1999) Chromosome separation and exit from mitosis in budding yeast: Dependence on growth revealed by cAMP-mediated inhibition. Exp Cell Res 250:510–523
- Barabási A-L, Oltvai ZN (2004) Network biology: understanding the cell's functional organization. Nature Genetics 5:101– 113
- Baroni MD, Monti P, Alberghina L (1994) Repression of growth-regulated G1 cyclin expression by cyclic AMP in budding yeast. Nature 371:339–342
- Buziol S, Bashir I, Baumeister A, Claassen W, Noisommit-Rizzi N, Mailinger W, Reuss M (2002) New bioreactor-coupled rapid stopped-flow sampling technique for measurements of metabolite dynamics on a subsecond time scale. Biotechnol Bioeng 80:632–636

- Chen KC, Csikasz-Nagy A, Gyorffy B, Val J, Novak B, Tyson JJ (2000) Kinetic analysis of a molecular model of the budding yeast cell cycle. Mol Biol Cell 11:369–391.
- Cross FR (2003) Two redundant oscillatory mechanisms in the yeast cell cycle. Dev Cell 4:741–752
- Eéka A, Hawoong J, Barabási A-L (2000) Error and attack tolerance of complex networks. Nature 406:378–382
- Henson MA, Müller D, Reuss M (2002) Cell population modelling of yeast glycolytic oscillations. Biochem J 368:433–446
- Kitano H (2003) Cancer robustness: tumour tactics. Nature 426:125
- Ma P, Wera S, Van Dijck P, Thevelein JM (1999) The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast Saccharomyces cerevisiae has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling. Mol Biol Cell 10:91–104

#### DIE AUTOREN



# KLAUS MAUCH

Studierte Chemieingenieurwesen an der TH Karlsruhe. Von 1994 bis 2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart mit dem Arbeitsschwerpunkt "Analyse und Gestaltung von Stoffwechselnetzwerken". Ab 2000 wissenschaftlicher Hochschulassistent und Leiter der Arbeitsgruppe "Metabolic Engineering – Angewandte Systembiologie". Seit 2001 geschäftsführender Gesellschafter der INSILICO biotechnology GmbH mit den Verantwortungsbereichen "Architektur und Design von Modellierungswerkzeugen" sowie "Modellierungssystematik".



## Dirk Müller

Geboren 1974 in Braunschweig, studierte von 1993 bis 1999 Verfahrens- und Chemietechnik an der TU Hamburg-Harburg und von 1996 bis 1997 Chemical Engineering an der University of Waterloo in Ontario, Kanada. Er ist seit 1999 am Institut für Bioverfahrenstechnik als wissenschaftlicher Mitarbeiter tätig. Im Rahmen seiner Promotion untersucht er den Einfluss der Signaltransduktion über zyklisches AMP auf die Koordination von Stoffwechsel- und Zellteilungsprozessen in der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae. Für diese Arbeiten wurde ihm 2002 von der EFB Section on Biochemical Engineering Science der Malcolm D. Lilly Award verliehen.



## PROF. DR.-ING. MATTHIAS REUSS

Geboren 1941. Nach dem Studium der Verfahrenstechnik an der Technischen Universität Berlin Promotion zum Dr.-Ing. im Jahre 1970 an der gleichen Universität. Von 1971 bis 1976 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Biotechnologie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GFB) in Braunschweig. Von 1976 bis 1987 Professor für das Fachgebiet Bioverfahrenstechnik an der Technischen Universität Berlin und seit 1988 Professor für Bioverfahrenstechnik und Direktor des gleichnamigen Lehrstuhls und Instituts an der Universität Stuttgart. Sonstige systembiologische Aktivitäten: Koordinator des Netzwerks "Detoxifikation und Dedifferenzierung von Hepatocyten" in der BMBF-Förderinitiative "Systeme des Lebens – Systembiologie" und designierter Sprecher des geplanten Zentrums für Systembiologie an der Universität Stuttgart.

## Kontakt

Universität Stuttgart, Institut für Bioverfahrenstechnik Allmandring 31, 70569 Stuttgart Tel. 0711/685-4574, Fax 0711/685-5164 E-Mail: secret@ibvt.uni-stuttgart.de Internet:http://www.ibvt.uni-stuttgart.de/

- Mauch K, Buziol S, Schmid JW, Reuss M (2002) Computer aided design of metabolic networks. AIChE Symposium Series 98: 82–91
- Müller D, Exler S, Aguilera-Vázquez L, Guerrero-Martín E, Reuss M (2003) Cyclic AMP mediates the cell cycle dynamics of energy metabolism in Saccharomyces cerevisiae. Yeast 20:351–367
- Ravasz E, Somera L, Mongru DA, Oltvai ZN, Barabási A-L (2002) Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. Science?:1551–1555
- Rizzi M, Baltes M, Theobald U, Reuss M (1997) In vivo analysis of metabolic dynamics in Saccharomyces cerevisiae. 2. Mathematical model. Biotechnol Bioeng 55:592–608
- Silljé HH, ter Schure EG, Rommens AJ, Huls PG, Woldringh CL, Verkleij AJ, Boonstra J, Verrips CT (1997) Effects of different carbon fluxes on G1 phase duration, cyclin expression, and reserve carbohydrate metabolism in Saccharomyces cerevisiae. J Bacteriol 179:6560–6565
- Theobald U, Mailinger W, Reuss M, Rizzi M (1993) In vivo analysis of glucoseinduced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique. Anal Biochem 214:31–37
- Vaseghi S, Baumeister A, Rizzi M, Reuss M (1999) In vivo dynamics of the pentose phosphate pathway in Saccharomyces cerevisiae. Metab Eng 1:128–140.