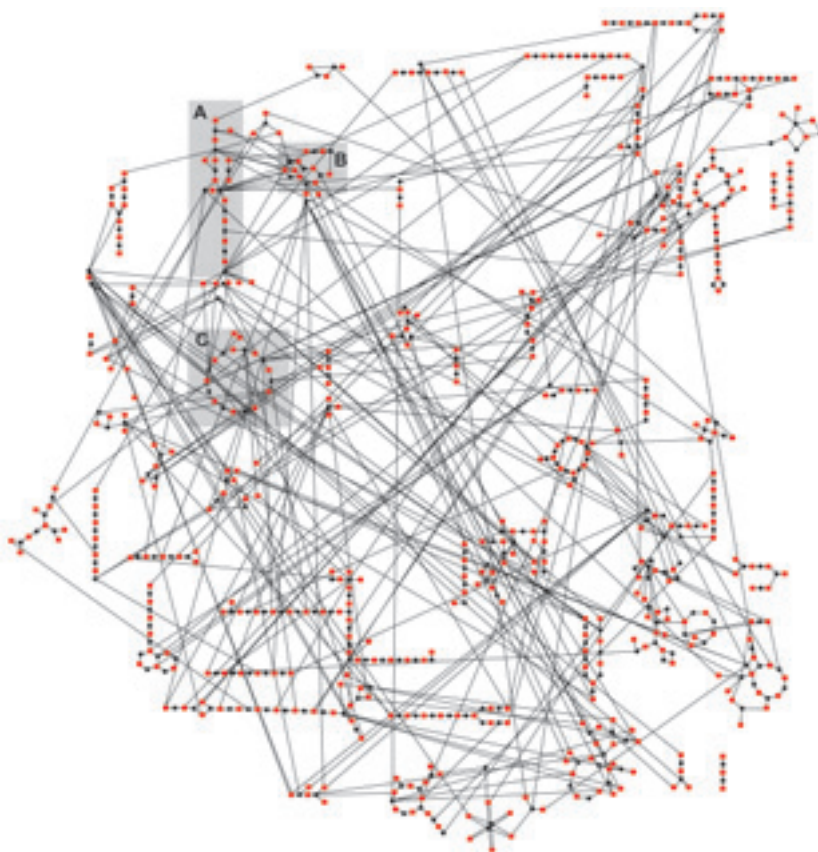


Integration von zellulären Stoffwechsel- und Signalnetzwerken

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 Erkenntnis-

gewinn, also die Generierung von neuem biologischen Wissen, die zielgerichtete Modifikation biologischer Systeme in der Bioprosesstechnik 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 Top-down 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 gegebenfalls 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

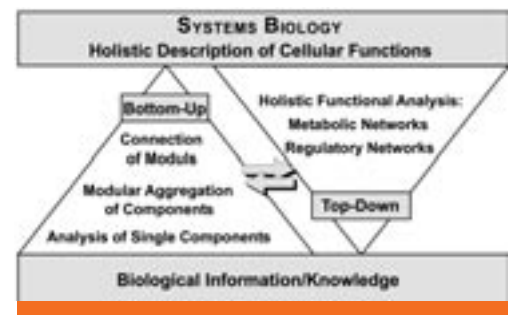
SUMMARY

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*.*



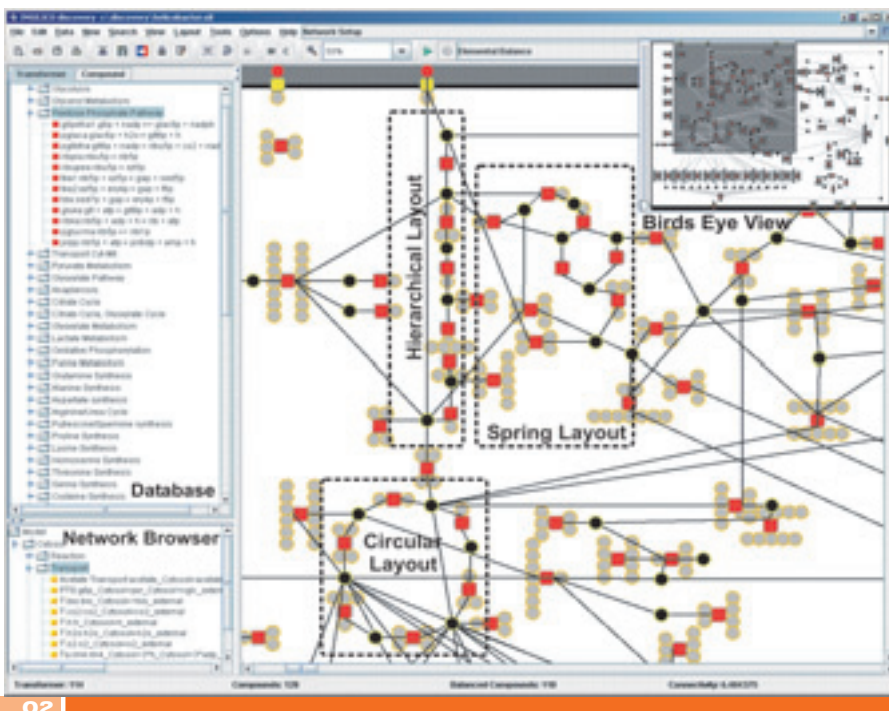
Bottom-up and Top-down Ansätze in der Systembiologie.

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.

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 Transformationschritte (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-



02

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.

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.

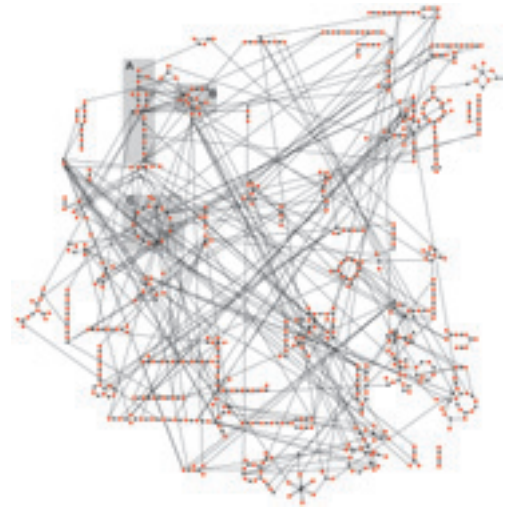
(04) zeigt die Visualisierung eines Signalnetzwerkes für den transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β). Dieses Netzwerk wurde aus primären Literaturdaten rekonstruiert. Die Zahl der Netzwerkkomponenten (561) ist in vergleichbarer Größenordnung wie bei dem metabolischen Netzwerk in (03) (461). Trotz 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 skalenfreie 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.

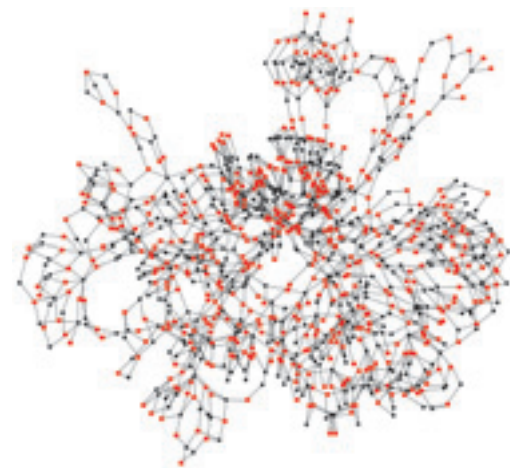
Im Unterschied zum metabolischen Netzwerk liefert das Signalnetz den deutlich niedrigeren Exponenten von 1,5 (05). Dies darf man als Hinweis werten, dass die Architektur des Signalnetzes durch eine im Vergleich zum metabolischen Netzwerk geringere Anzahl von hochvernetzten Knoten zusammengehalten wird.

Weitere interessante Unterschiede 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 Eingangssignal) 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



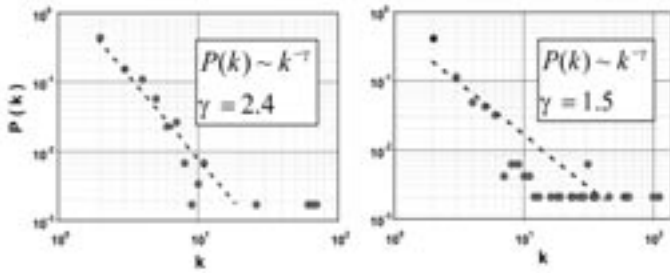
03

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://biocyc.org/meta>). Das *H. pylori*-Netzwerk kann als SBML-File von <http://sbml.org/models> heruntergeladen werden (SBML: Systems Biology Markup Language).



04

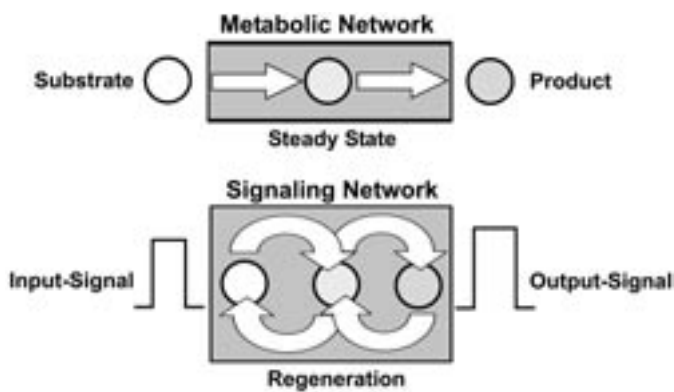
Signaltransduktionsnetzwerk mit Rezeptoren für den transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β). Das Netzwerk enthält 553 Reaktionen und 561 Komponenten. Die Mehrzahl der Komponenten sind Proteine. Das TGF- β Netzwerk kann als SBML-File von <http://sbml.org/models> heruntergeladen werden.



05

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- β).

Deaktivierungen von Enzymen oder Transportprozessen über die Grenzen von Zellkompartimenten. Bei der Aggregation 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 besteht darin,



06

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).

Deaktivierungen von Enzymen oder Transportprozessen über die Grenzen von Zellkompartimenten. Bei der Aggregation

dass im Stoffwechselnetzwerk eine Komponente (Metabolit) stets nur Substrat oder Produkt einer Reaktion darstellt und demzufolge keine Katalyse

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 variieren. 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

Stoffwechselnetzwerk

Materieller Stofffluss

Der Stationäre Zustand ist für die Funktionalität des metabolischen Netzwerks von großer Bedeutung

Die Enzyme treten nicht als Reaktanden in Erscheinung

Signalnetzwerk

Informationsübertragung

Die Funktion wird durch transientes Verhalten bestimmt

Komponenten, die transformiert werden, sind häufig Katalysatoren anderer Reaktionen

T.01

Charakteristische Eigenschaften der Stoffwechsel- und Signalnetzwerke.



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-

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 gelösten Sauerstoffs. 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.

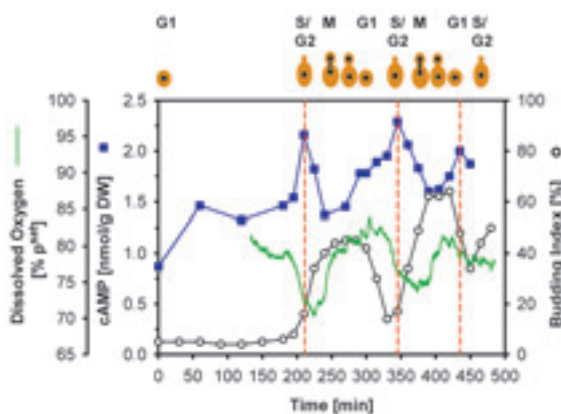
Eine nach wie vor noch nicht zufriedenstellend beantwortete Frage betrifft das Problem, welcher Stimulus die Aktivität der Adenylat-cyclase beziehungsweise der Phosphodiesterasen in einer zellzyklusabhängigen Art und Weise beeinflusst. Vor dem Hintergrund von Konzepten zur hierarchischen Strukturierung 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 Guanin-nukleotiden 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.

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

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. zeitlich 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 intra- und extrazellulären Metabolite sowie des cAMPs verfolgen. Die in (10) dargestellten



Dynamik der intrazellulären cAMP-Konzentration, des gelösten Sauerstoffs, des Budding Index (Kennzeichnung der Geburtsnarben; BI) in einer Glucose-limitierten Kultur (Müller et al., 2003). Die als Cartoon gekennzeichneten Hefezellen zeigen die Zellzyklusposition.

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 Ebe-

ne 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 neben 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 Speich-

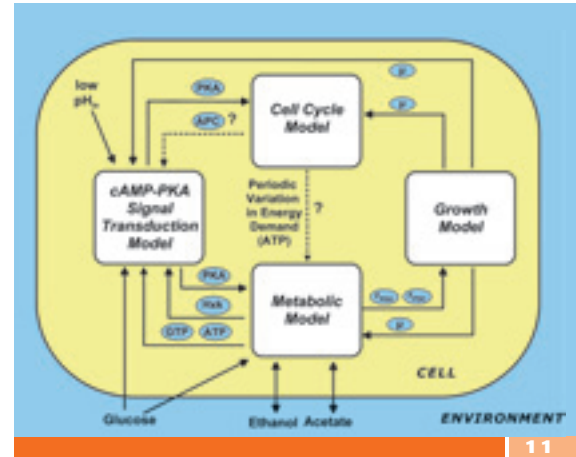
der Trehalose und des Glykogens) erweitert. Von besonderer Bedeutung für die Kopplung der Signaltransduktion mit dem Stoffwechselnetzwerk ist die Berücksichtigung der Aktivitätsänderung der Enzyme infolge der Phosphorylierung durch die katalytische Untereinheit der PKA. Dies lässt sich in den kinetischen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

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

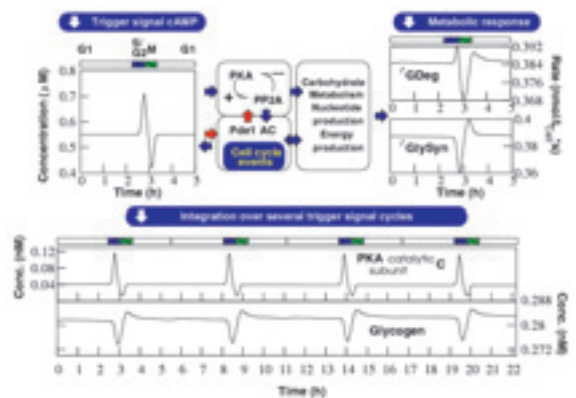
mit \vec{c}_M Vektor der Metaboliten, die die Reaktionsrate beeinflussen und Parametervektor. Auch bei den hier ablaufenden Phosphorylierungen der Zielproteine im Metabolismus beobachtet man adaptives Verhalten. Die im Modell zu berücksichtigenden Rückführungen betreffen Phosphatasen, die die Zielproteine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



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



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_{Deg} ist die Reaktionsrate der Glycogenphosphorylase, r_{GlySyn} die Rate der Glycogensynthese.

