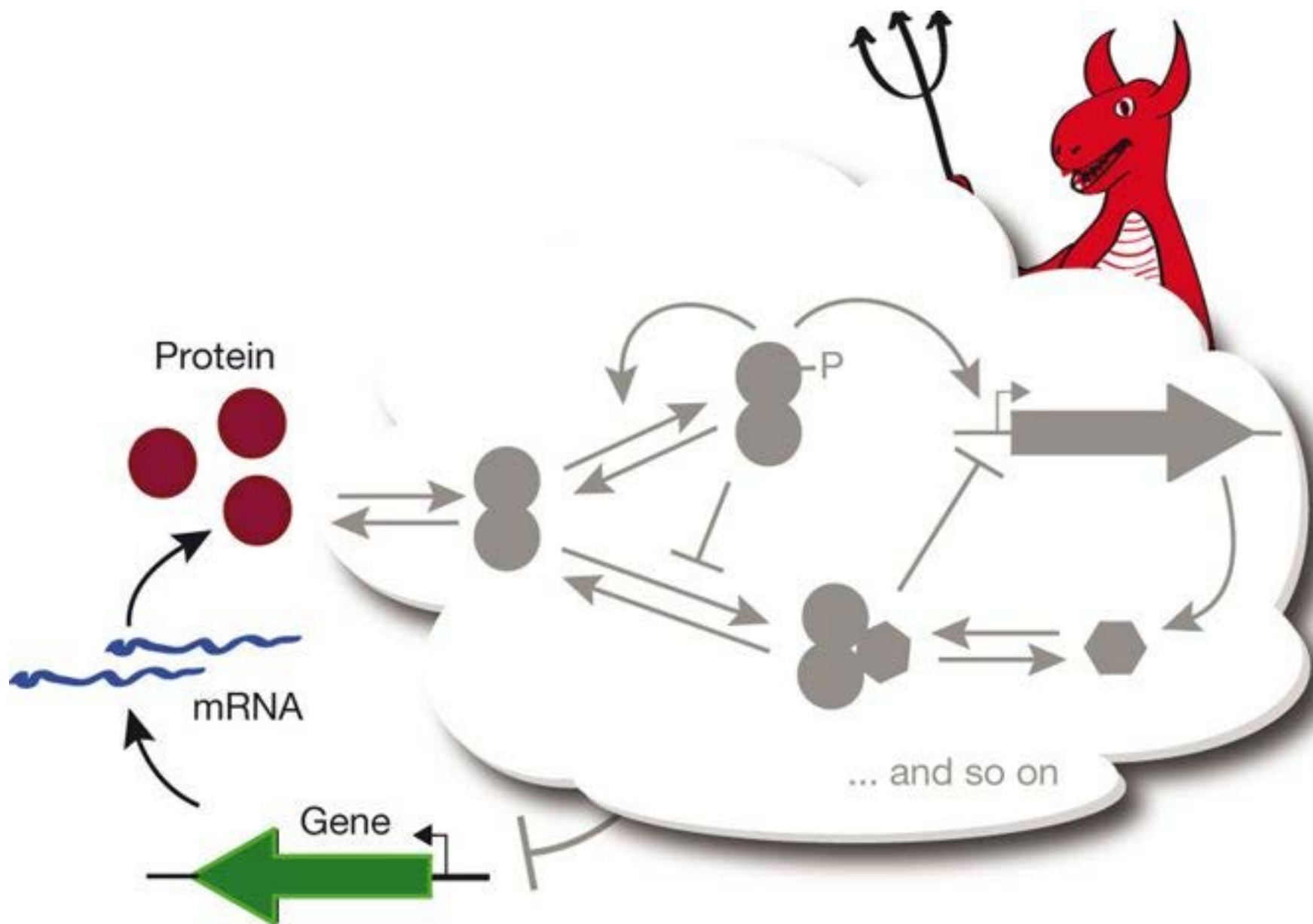


Zeitablauf biologischer Reaktionen

Stand: 20.11.2020



Dynamik molekularer, zellulärer Prozesse
Populationsdynamik

Kinetik

Reaktionsmechanismus ?

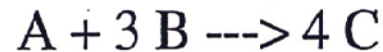
- Enzymforschung
- Nervenerregung
- Photosynthese

- mathematischer Formalismus zur
Beschreibung zeitabhängiger Phänomene
- Populationsdynamik
 - Stoffwechselkinetik (MFA metabolische
Flußanalyse)
 - Pharmakokinetik

1. Definition Reaktionsgeschwindigkeit

Definitionsziele:

- pos. Reaktionsgeschwindigkeit;
- eine Kennziffer die unabhängig vom betrachteten Stoff ist.



$$r = \frac{1}{\nu_A} \frac{dC_A}{dt} = \frac{1}{\nu_B} \frac{dC_B}{dt} = \frac{1}{\nu_C} \frac{dC_C}{dt} = \frac{d\xi}{dt} \qquad r = -\frac{dC_A}{dt} = -\frac{1}{3} \frac{dC_B}{dt} = \frac{1}{4} \frac{dC_C}{dt} = \frac{d\xi}{dt}$$

2. Molekularität und Reaktionsordnung

Elementarreaktion <---> **zusammengesetzte, komplexe oder simultane R.**

(Reaktionsablauf kann einfachere Reaktionsmodelle vortäuschen !!!!)

Reaktionsordnung

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom Exponenten, mit dem die Konzentration eines bestimmten Reaktanten in das Geschwindigkeitsgesetz eingeht, wird als Reaktionsordnung in Bezug auf diesen Reaktanten bezeichnet.

Zeitablauf durch
Integration

$$\frac{d A}{d t} = k_i \cdot A^n$$

Reaktionsordnung

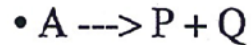
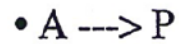
n = 0 (nullte Ordnung)

n = 1 (erste Ordnung)

.....

Geschwindigkeits-
konstante

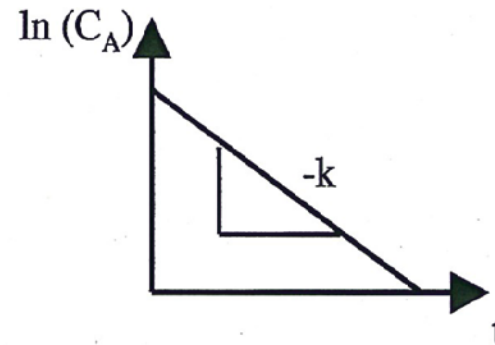
2.1 Monomolekulare Reaktion:



$$r = -\frac{dC_A}{dt} = k C_A \quad -k \int_0^t dt = \int_{C_A^0}^{C_A} \frac{dC_A}{C_A}$$

Integration

$$\ln(C_A) = \ln(C_A^0) - kt$$



Beispiele:

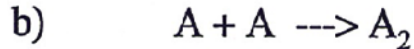
- Mikrobielles Wachstum in der exponentiellen Phase
- Radioaktiver Zerfall
- Thermische Zersetzungereaktionen
- Inversion von Rohrzucker

2.2 Bimolekulare Reaktion:

Fall a)



$$r = -\frac{dC_A}{dt} = k C_A C_B$$



C_A und C_B entwickeln sich nicht unabhängig, also: $C_A = C_A^0 - \xi$ $C_B = C_B^0 - \xi$

$$dC_A = dC_B = -d\xi$$

$$r = -\frac{d\xi}{dt} = k (C_A^0 - \xi)(C_B^0 - \xi) \quad -\int_0^t k dt = \int_{\xi_0}^{\xi} \frac{d\xi}{(C_A^0 - \xi)(C_B^0 - \xi)}$$

so nicht lösbar, also Partialbruchzerlegung

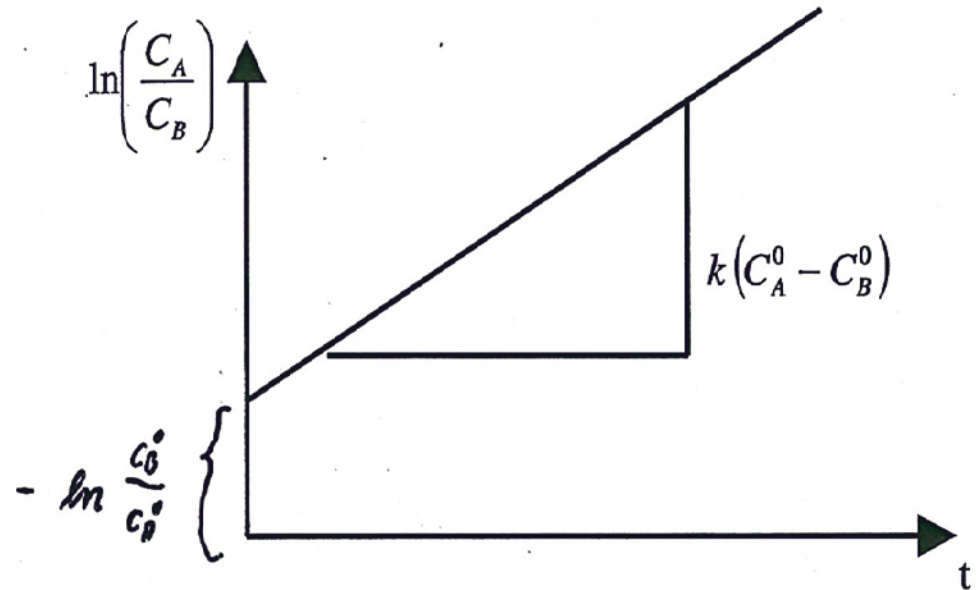
$$\frac{1}{(C_A^0 - \xi)(C_B^0 - \xi)} = \frac{1}{(C_A^0 - C_B^0)} \left(\frac{1}{(C_B^0 - \xi)} - \frac{1}{(C_A^0 - \xi)} \right)$$

integrierbar zu:

$$-kt = \frac{1}{(C_A^0 - C_B^0)} \left(\ln \left(\frac{C_B^0 - \xi}{C_B^0} \right) - \ln \left(\frac{C_A^0 - \xi}{C_A^0} \right) \right)$$

Rücksubstitution: $C_A = C_A^0 - \xi$ $C_B = C_B^0 - \xi$

$$t = \frac{1}{k(C_A^0 - C_B^0)} \left(\ln \left(\frac{C_A}{C_B} \right) + \ln \left(\frac{C_B^0}{C_A^0} \right) \right)$$

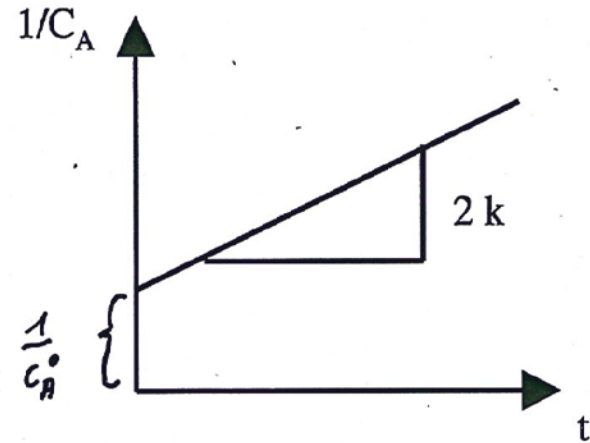


Fall b) $2A \rightarrow A_2$

$$r = -\frac{1}{2} \frac{dC_A}{dt} = k C_A^2$$

$$-\int_0^t 2k dt = \int_{C_A^0}^{C_A} \frac{dC_A}{C_A^2} \quad -2kt = \left(\frac{1}{C_A^0} - \frac{1}{C_A} \right)$$

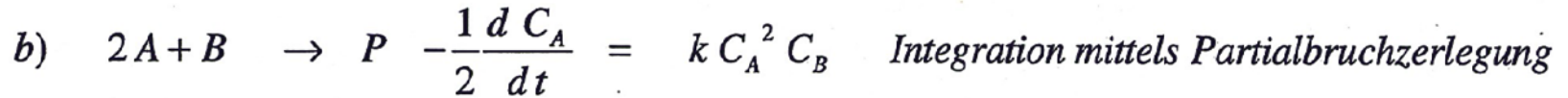
$$2kt = \left(\frac{1}{C_A} - \frac{1}{C_A^0} \right) \quad C_A = \frac{C_A^0}{C_A^0 2kt + 1}$$



Beispiele:

- Jodwasserstoffreaktion $H_2 + J_2 \rightarrow 2 HJ$ bimolekulare Gasphasenreaktion
- einige Veresterungs- und Verseifungsreaktionen $CH_3COOC_2H_5 + Na^+ + OH^- \rightarrow CH_3COO^- Na^+ + C_2H_5OH$
- Antigen-Antikörper-Reaktionen (außerordentliche Spezifität + große Geschwindigkeitskonstanten)
- Radikal-Radikal-Reaktionen z.B. $H\cdot + OH\cdot \rightarrow H_2O$, $H\cdot + H\cdot \rightarrow H_2$
- DNA Reassoziationen

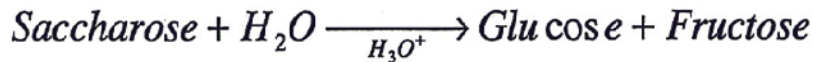
2.3 trimolekulare Reaktionen oder Reaktionen höherer Ordnung:



$$r = -\frac{1}{n} \frac{d C_A}{dt} = k C_A^n \quad \int_0^t -n k dt = \int_{C_A^0}^{C_A} \frac{d C_A}{C_A^n}$$

$$k = \frac{1}{t(n-1)} \left[\frac{1}{C_A^{(n-1)}} - \frac{1}{C_A^{0(n-1)}} \right]$$

Pseudoordnung:

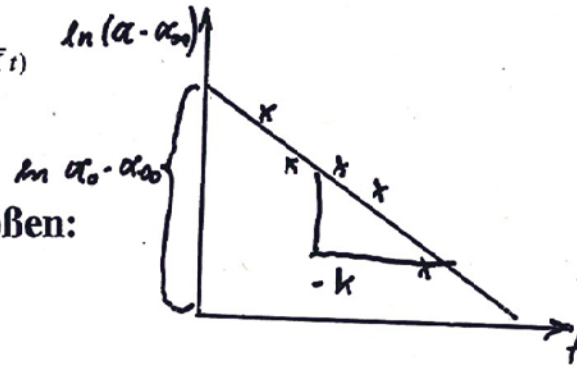


A B C D

$$r = -\frac{dC_A}{dt} = k C_A C_B \quad \text{Überschuß H}_2\text{O} \quad r = -\frac{dC_A}{dt} = \bar{K} C_A \quad \text{mit} \quad \bar{K} = k C_B$$

deshalb simples Zeitgesetz

$$C_A = C_A^0 e^{(-\bar{K}t)}$$



Einsatz konzentrationsproportionaler Größen:

- Drehwinkel
- Partialdruck
- Absorption

$$\bar{k} = k C_B = \frac{1}{t} \ln \frac{C_A^0}{C_A}$$

Beispiel Drehwinkel:

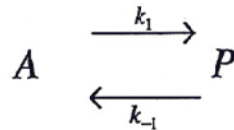
$$\begin{aligned} C_A^0 &\equiv \alpha_0 - \alpha_\infty \\ C_A &\equiv \alpha(t) - \alpha_\infty \end{aligned}$$

$$\bar{K} = k C_B = \frac{1}{t} \ln \left(\frac{\alpha_0 - \alpha_\infty}{\alpha(t) - \alpha_\infty} \right)$$

3. zusammengesetzte, komplexe oder simultane Reaktionen:

3.1 reversible Reaktionen:

Monomolekulare Hin- und Rückreaktion

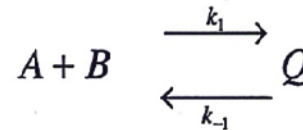


$$\frac{dC_A}{dt} = -k_1 C_A + k_{-1} C_P$$

im Gleichgewicht:

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{C_P}{C_A} = K$$

Bimolekulare Hin- und monomolekulare Rückreaktion



$$\frac{dC_A}{dt} = -k_1 C_A C_B + k_{-1} C_Q$$

$$\frac{dC_A}{dt} = 0$$

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{C_Q}{C_A C_B} = K$$

Verknüpfung kinetische und thermodynamische Definition des Gleichgewichtes

$$K = e^{\frac{\Delta_R G^\circ}{RT}}$$

Integration einer reversible Reaktion:

$$\frac{dC_A}{dt} = -k_1 C_A + k_{-1} C_P \quad C_A = C_A^0 - \xi \quad C_P = C_P^0 + \xi \quad dC_A = -d\xi$$

$$\frac{d\xi}{dt} = -k_1 (C_A^0 - \xi) + k_{-1} (C_P^0 + \xi) = \xi (k_1 + k_{-1}) - k_1 C_A^0 + k_{-1} C_P^0 = \xi a + b = Z$$

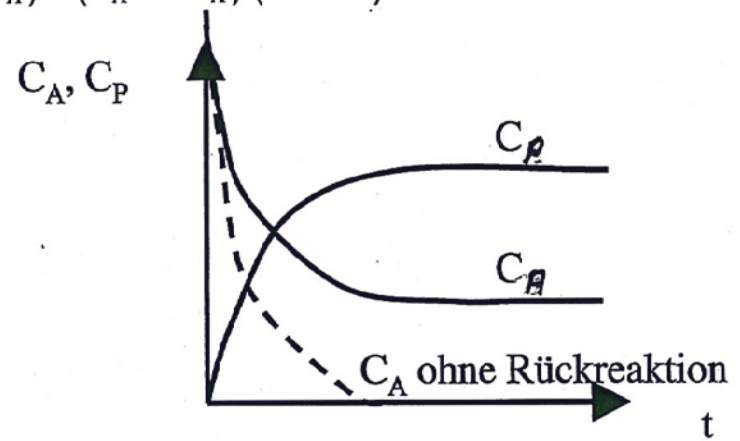
$$-\frac{d\xi}{dt} = a\xi + b \quad \frac{dZ}{d\xi} = a \quad -\frac{1}{a} \frac{dZ}{dt} = Z \quad \int_{Z_0}^Z \frac{dZ}{Z} = \int_0^t -a dt$$

$a = k_1 + k_{-1}$
 $b = k_{-1} C_P^0 - k_1 C_A^0$

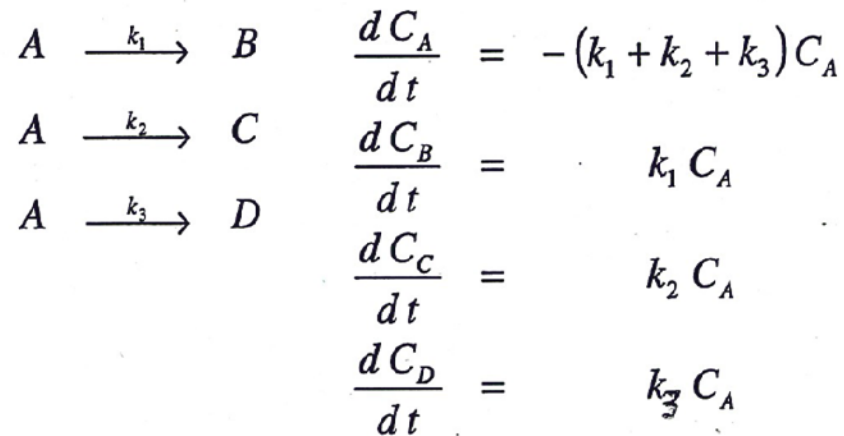
$$\ln\left(\frac{a\xi + b}{b}\right) = -at \quad \xi = \frac{b}{a} (e^{-at} - 1)$$

$$\xi(t \rightarrow \infty) = -\frac{b}{a} = C_A^0 - C_A^{eq} \quad (C_A^0 - C_A) = (C_A^{eq} - C_A^0) (e^{-at} - 1)$$

$$\ln\left(\frac{(C_A^0 - C_A^{eq})}{(C_A - C_A^{eq})}\right) = (k_1 + k_{-1})t$$



3.2 Nebenreaktionen:



Wegscheiderprinzip:

Verhältnis

Reaktionsgeschwindigkeiten

$$\begin{array}{l} \frac{dC_B}{dC_C} = \frac{k_1}{k_2} \\ \frac{dC_B}{dC_D} = \frac{k_1}{k_3} \end{array}$$

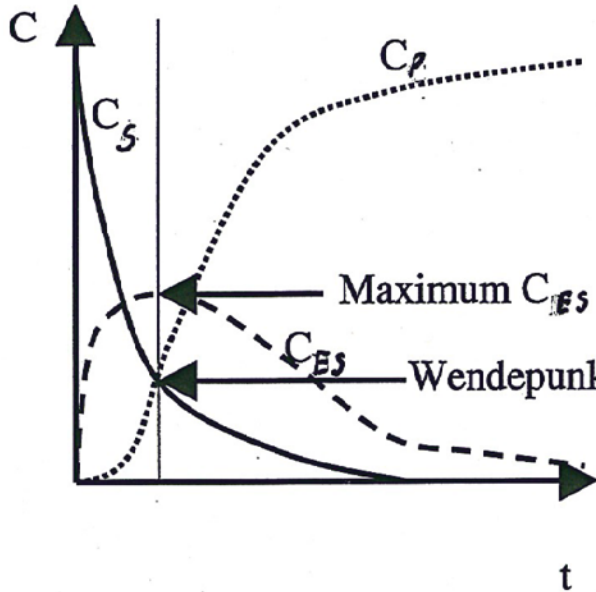
Konzentrationen

$$\begin{array}{l} \frac{C_B}{C_C} = \frac{k_1}{k_2} \\ \frac{C_B}{C_D} = \frac{k_1}{k_3} \end{array}$$

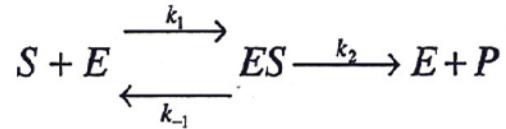
3.2

Folgereaktionen:

(Am Beispiel enzymatisch katalysierter Reaktionen)



Das Modell:



Das DGL-System:

$$\begin{aligned} \frac{dC_S}{dt} &= -k_1 C_S C_E + k_{-1} C_{ES} \\ \frac{dC_E}{dt} &= -k_1 C_S C_E + (k_{-1} + k_2) C_{ES} \\ \frac{dC_{ES}}{dt} &= k_1 C_S C_E - (k_{-1} + k_2) C_{ES} \\ \frac{dC_P}{dt} &= k_2 C_{ES} \end{aligned}$$

Die Stoffbilanz:

$$\begin{aligned} C_S^0 &= C_S + C_{ES} + C_P \\ C_E^0 &= C_E + C_{ES} \end{aligned}$$

Die Näherung: (Bodensteinsche Stationaritätsbedingung) $\frac{dC_{ES}}{dt} = 0 \quad C_{ES} = const.$



Die Lösung:

aus: $\frac{dC_{ES}}{dt} = 0 = k_1 C_S C_E - (k_{-1} + k_2) C_{ES}$ folgt: $\frac{C_E C_S}{C_{ES}} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M$

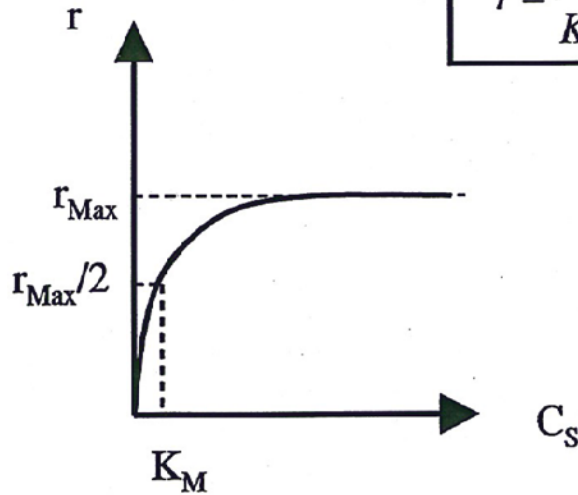
aus Enzymbilanz $C_E^0 = C_E + C_{ES}$ folgt: $C_{ES} = \frac{C_E^0 C_S}{K_M + C_S}$

aus: $\frac{dC_P}{dt} = k_2 C_{ES}$ folgt: $r = \frac{dC_P}{dt} = \frac{k_2 C_E^0 C_S}{K_M + C_S}$

Michaelis-Gleichung:

$$r = \frac{r_{\max} C_S}{K_M + C_S} \quad \text{mit} \quad r_{\max} = k_2 C_E^0$$

Analoge Beschreibung für Wachstum (Monod)



wenn $C_S \gg K_M$: $r = r_{\max}$

wenn $C_S \ll K_M$: $r = \frac{r_{\max}}{K_M} C_S$

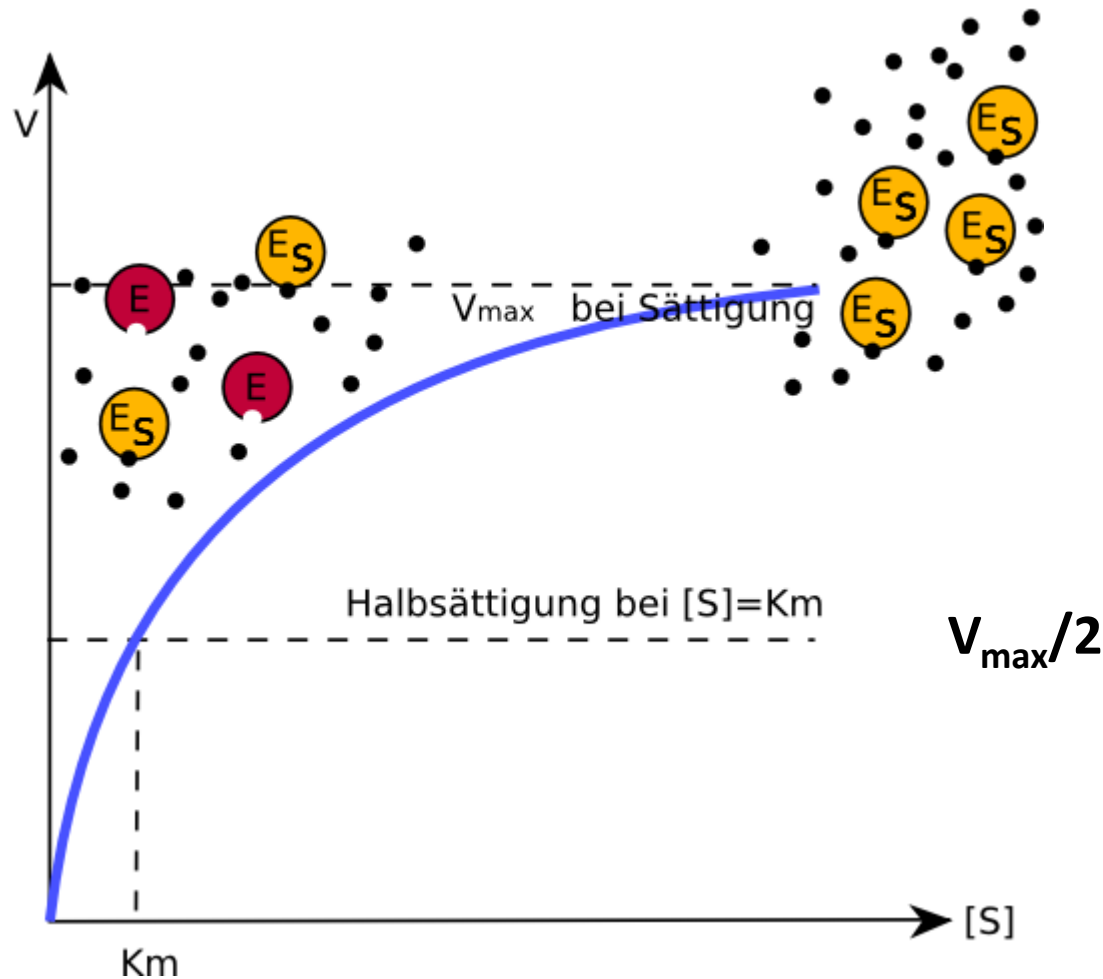
Wichtige Kenngrößen

$$r_{max} = k_{cat} \cdot E_0$$

k_{cat} = Wechselzahl, turnover number [s^{-1}]

k_M = Halbsättigungskonstant [mol L $^{-1}$]

Michaelis-Menten-Kinetik



Leonor Michaelis/ Maud Menten



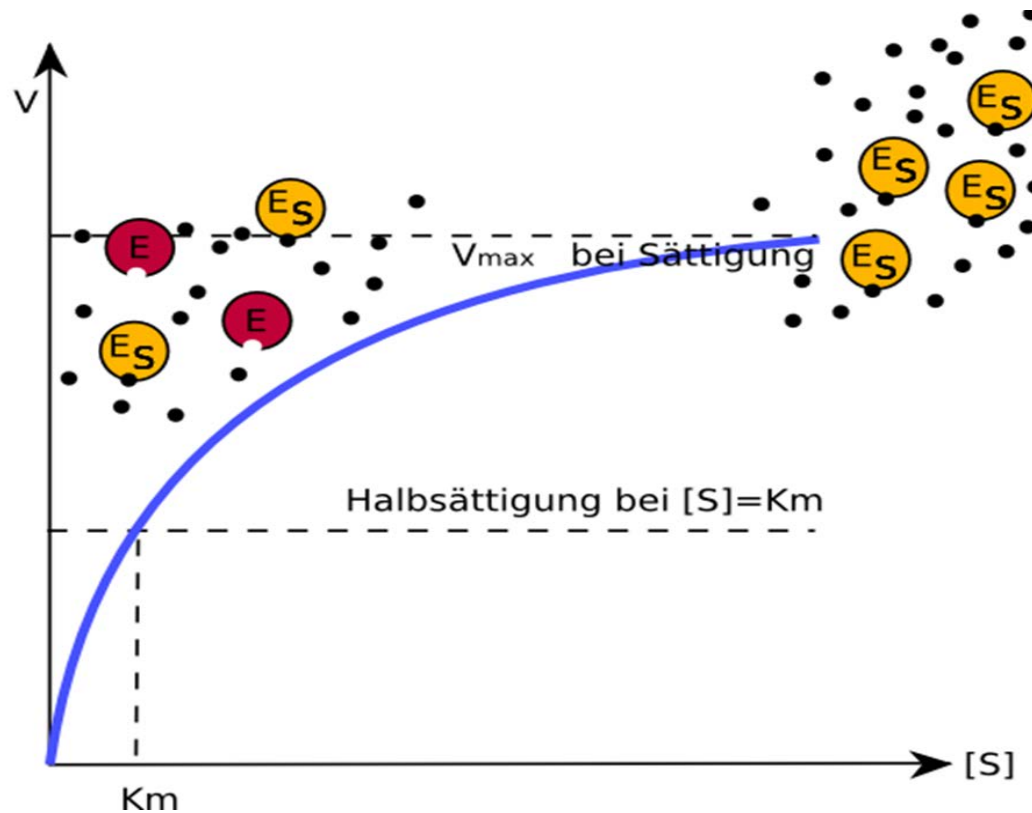
1880 – Theorie einer Komplexes als Zwischenprodukt (Adolphe Wurtz)

1902 – Ableitung der Gleichung (Victor Henri)

1913 – verbesserte experimentelle und Auswertemethoden für Enzyme

Wie bestimme ich die Parameter ?

$$v = v_{max} \cdot \frac{C_S}{K_M + C_S}$$



Weitere Linearisierungen

Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{C_S} + \frac{1}{v_{max}}$$

An der Tafel
Vorrechnen !!!

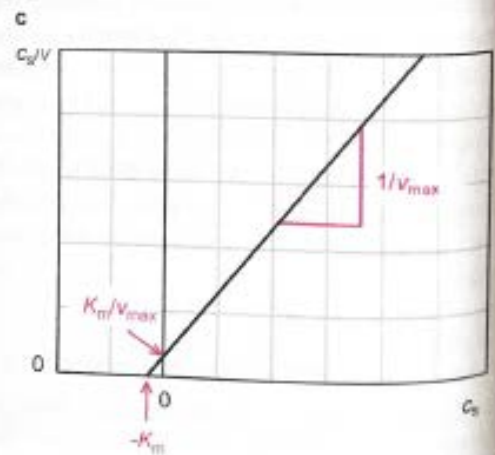
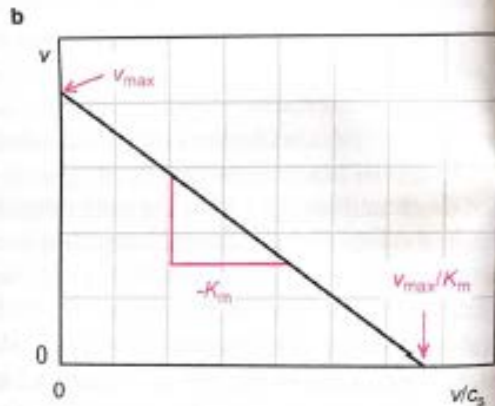
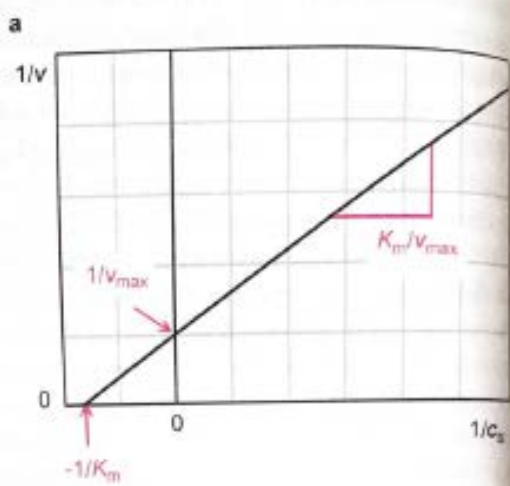
Eadie-Hofstee

$$v = -K_M \cdot \frac{v}{C_S} + v_{max}$$

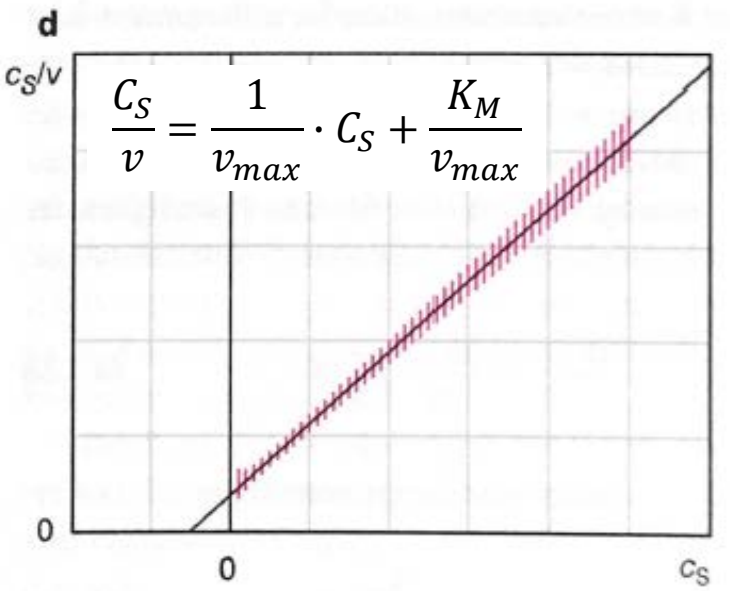
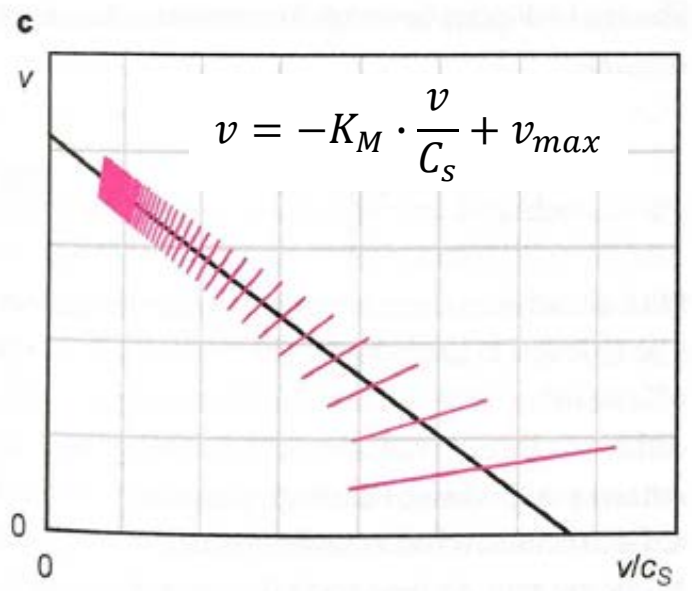
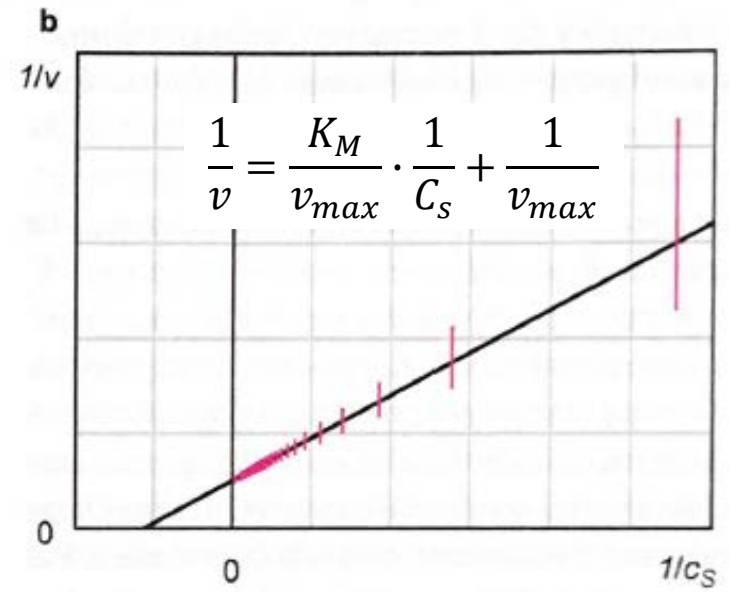
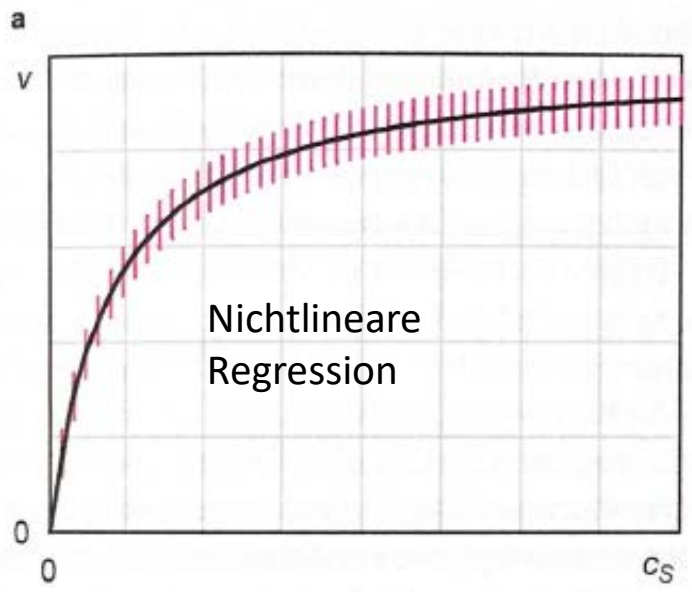
Was können die
Probleme der
Linearisierung sein ?

Hanes-Woolf

$$\frac{C_S}{v} = \frac{1}{v_{max}} \cdot C_S + \frac{K_M}{v_{max}}$$



Fehlergrenzen in den verschiedenen Parameteranpassungen



Katalytische Wirksamkeit eines Enzyms:

Enzymaktivität A_E : $A_E = r_{\max} * V$ Dimension unit

1 unit = 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$

spezifische Enzymaktivität a_E : $a_E = A_E / m_E$

1 unit/mg

Enzyme Commission: Katal (kat oder kat/kg)

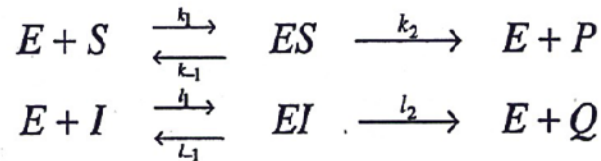
1 kat = 1 mol/s

Kompetitive Hemmung:

A) Konkurrenz von S und I um eine Bindungsstelle

B) getrennte Bindungsstellen von S und I aber Konformationsänderung

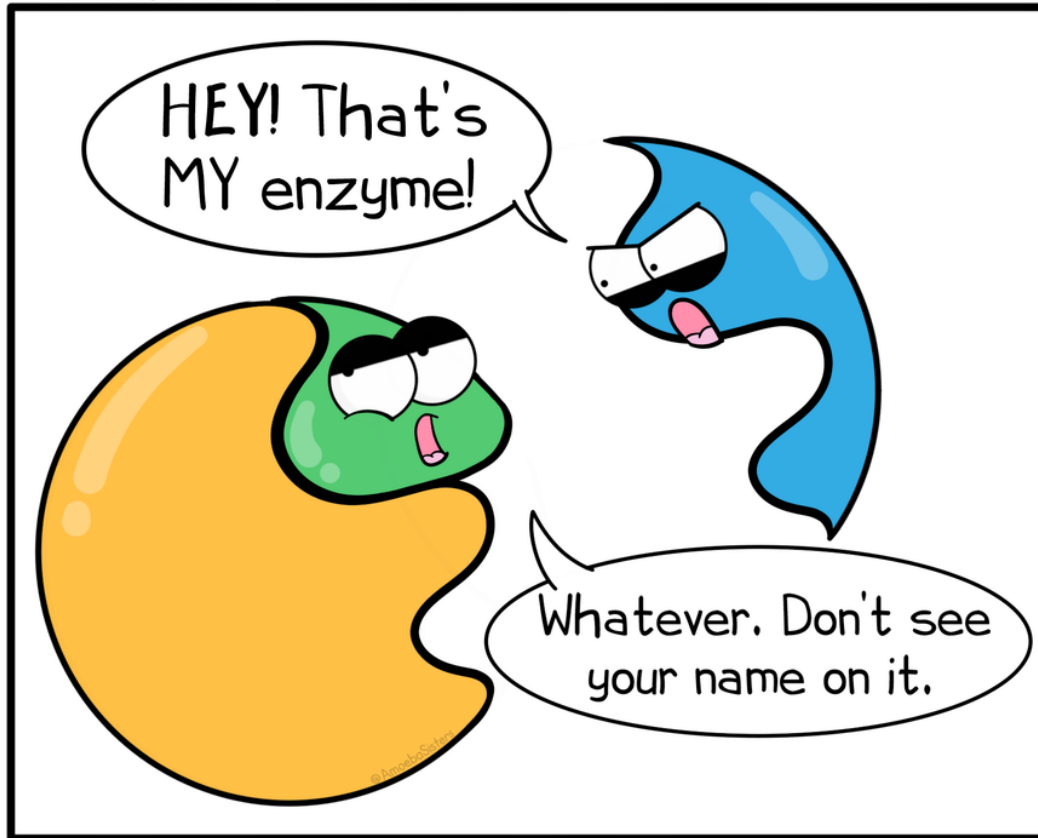
(allosterische Hemmung)



Kompetitive Hemmung

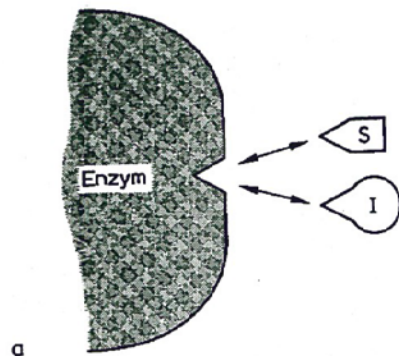
Paramecium Parlor

@AmoebaSisters

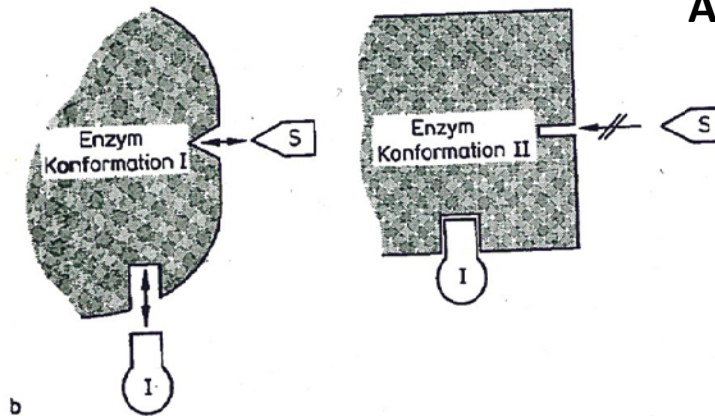


Competitive Inhibitors: If it fits, it sits.

Kompetitive Hemmungen von Enzymreaktionen



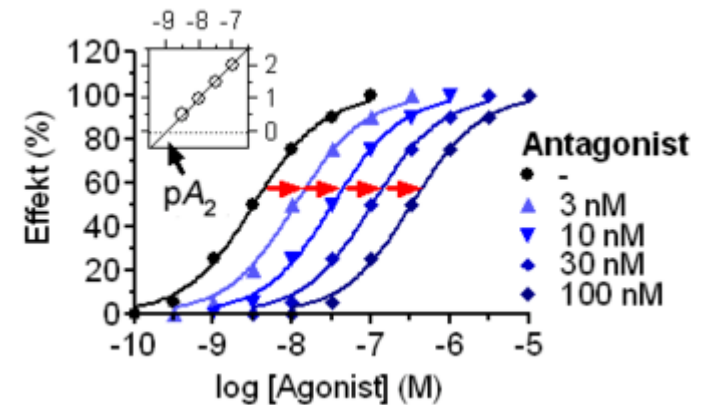
Konkurrenz um einen Bindungsplatz



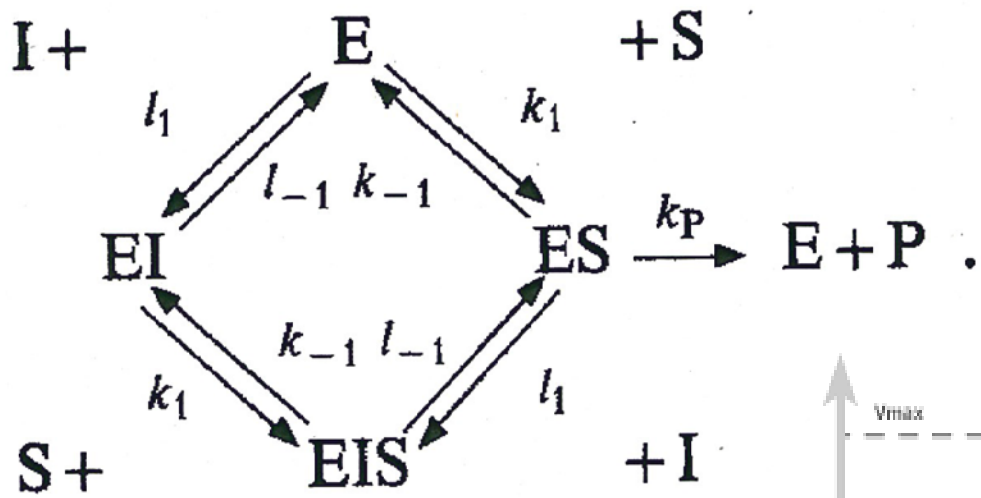
Allosterische Hemmung

Kinetik für kompetitive Hemmung:

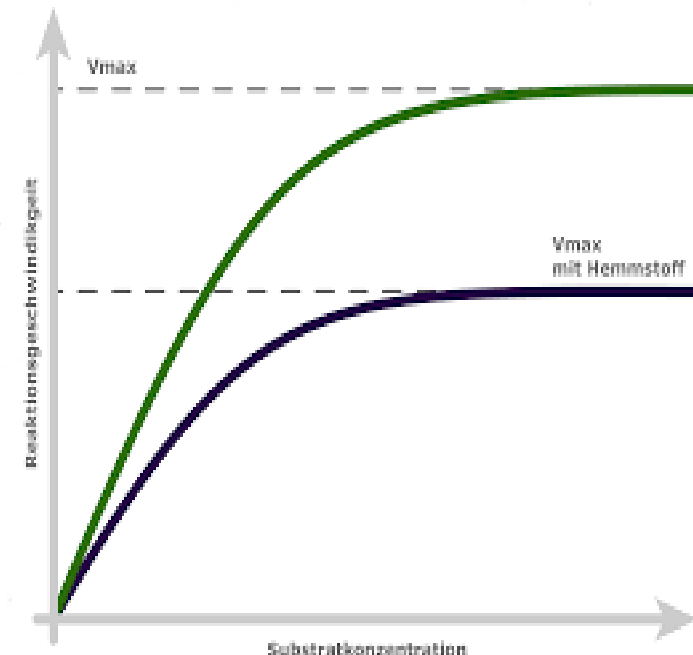
$$r = \frac{k_2 C_E^0 C_S}{C_S + K_M (1 + C_I / K_I)} = \frac{r_{\max} C_S}{C_S + K_M + k_I C_I}$$



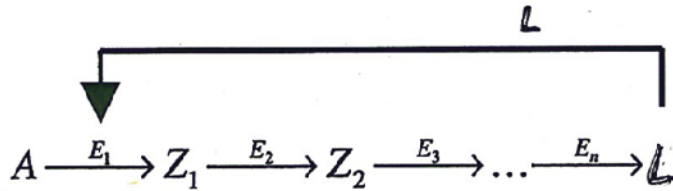
Nicht-kompetitive Hemmung:



Unterschiedlicher Zeitablauf



Regulation biologischer Aktivität:



Feedback-Inhibition, chemischer Schalter

Modelle für chemischer Schalter:

1.) Das sequenzielle Modell (Beispiel 2 Untereinheiten)



nur T = katalytisch aktiv

m Liganden binden an n Bindungsstellen eines Proteins

Konformation T = offener Kreis, freie Bindungsstelle,

R = Quadrat, besetzte Bindungsstelle

2. Bindung durch Konformationsänderung begünstigt oder erschwert

Gleichgewichte

$$K_1 = \frac{C^{L0}}{C^{00} C_L} = \frac{C^{0L}}{C^{00} C_L} \quad K_2 = \frac{C^{LL}}{C^{0L} C_L} = \frac{C^{LL}}{C^{L0} C_L}$$

Bindungsgrad

$$m = \frac{C^{0L} + C^{L0} + 2 C^{LL}}{C^{00} + C^{0L} + C^{L0} + 2 C^{LL}} =$$

$$m = \frac{2 \cdot K_1 \cdot C^{00} \cdot C_L + 2 \cdot K_2 \cdot C^{0L} \cdot C_L}{C^{00} + 2 \cdot K_1 \cdot C^{00} \cdot C_L + 2 \cdot K_2 \cdot C^{0L} \cdot C_L}$$

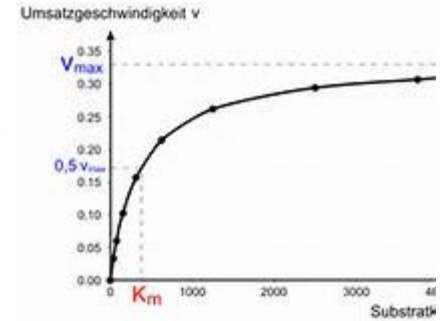
$$m = \frac{2 \cdot K_1 \cdot C^{00} \cdot C_L + 2 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot C^{00} \cdot C_L^2}{C^{00} + 2 \cdot K_1 \cdot C^{00} \cdot C_L + 2 \cdot K_2 \cdot C^{0L} \cdot C_L}$$

$$m = \frac{2 \cdot K_1 \cdot C_L + 2 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot C_L^2}{1 + 2 \cdot K_1 \cdot C_L + 2 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot C_L^2}$$

a) Vernachlässigung der Wechselwirkung der Ligandenbindung: $K_1=K_2=K$

$$m = \frac{2K C_L}{1 + K C_L}$$

$$m = \frac{2 \cdot K_1 \cdot C_L + \cancel{2 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot C_L^2}}{1 + 2 \cdot K_1 \cdot C_L + \cancel{2 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot C_L^2}}$$



daraus folgt hyperbolischer Verlauf

b) Starke Wechselwirkungen der Ligandenbindung: $C^{LL} \gg C^{OL}$ $C^{LL} \gg C^{LO}$

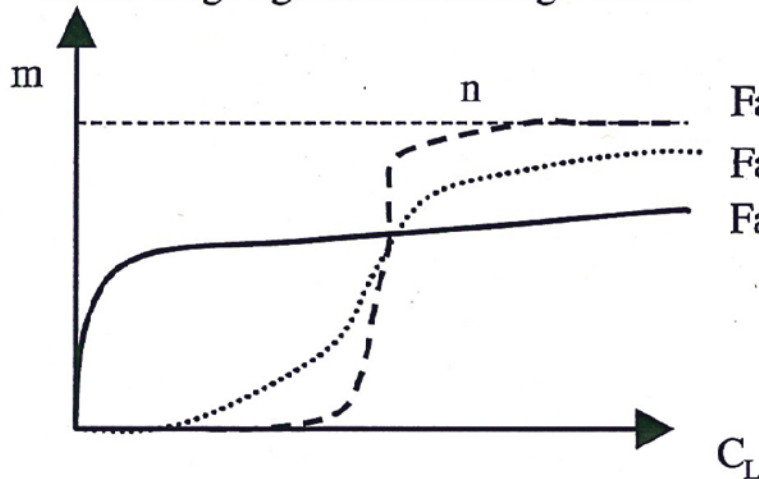
$$m = \frac{2K^* C_L^2}{1 + K^* C_L^2} \text{ mit } K^* = K_1 K_2$$

mit n Bindungsstellen

$$m = \frac{n K^* C_L^n}{1 + K^* C_L^n}$$

daraus folgt sigmoider Bindungsverlauf

$$m = \frac{\cancel{2 \cdot K_1 \cdot C_L} + 2 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot C_L^2}{1 + \cancel{2 \cdot K_1 \cdot C_L} + 2 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot C_L^2}$$



Fall b) für n=6

Fall b) für n=2

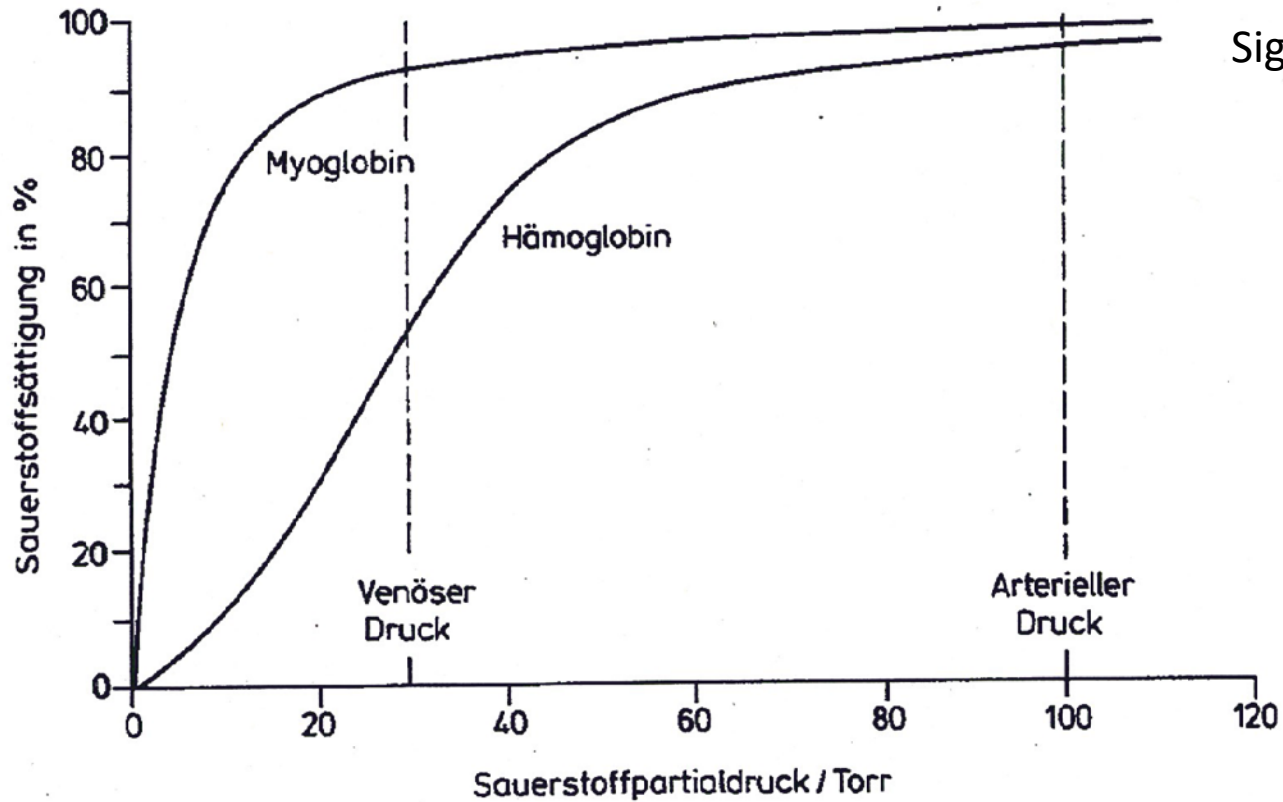
Fall a)

Beispiel zur Bedeutung sigmoider Bindungskurven:

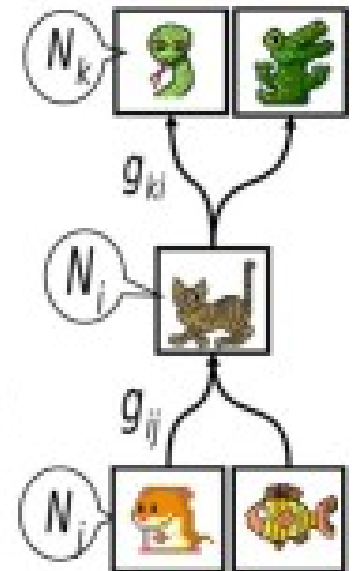
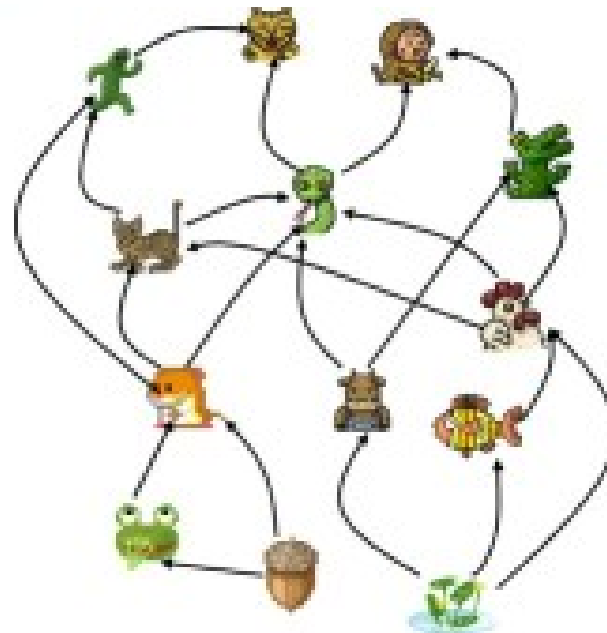
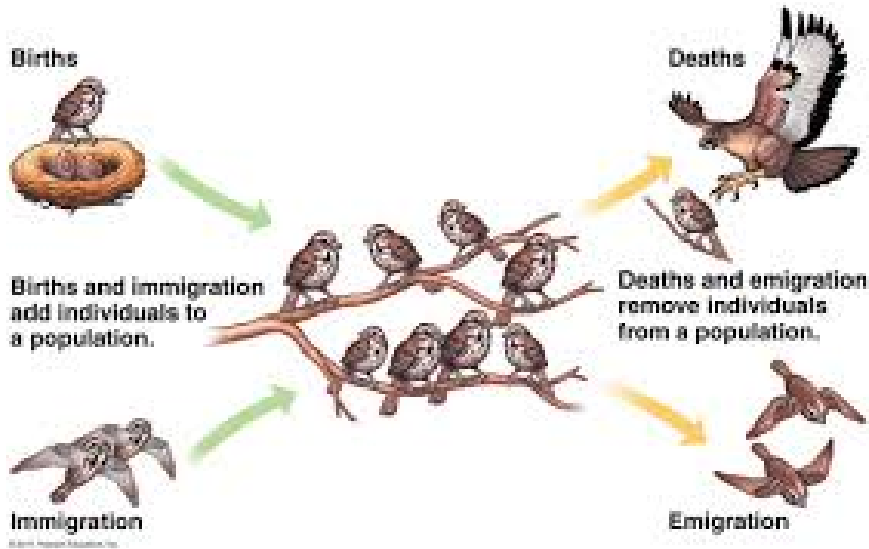
Myoglobin als Kurzzeitsauerstoffspeicher in Muskeln

hyperbolisch

Sigmoid



Populationsdynamik



Populationsdynamik:

Geburtenkoeffizient g , Sterbekoeffizient s

$$\frac{dN}{dt} = (g - s)N \quad \text{mit} \quad r = (g - s) \quad N = N_0 e^{rt}$$



Thomas Malthus
1766-1834

Malthus-Gleichung geeignet für nicht-limitiertes Wachstum

Nahrungsverknappung:

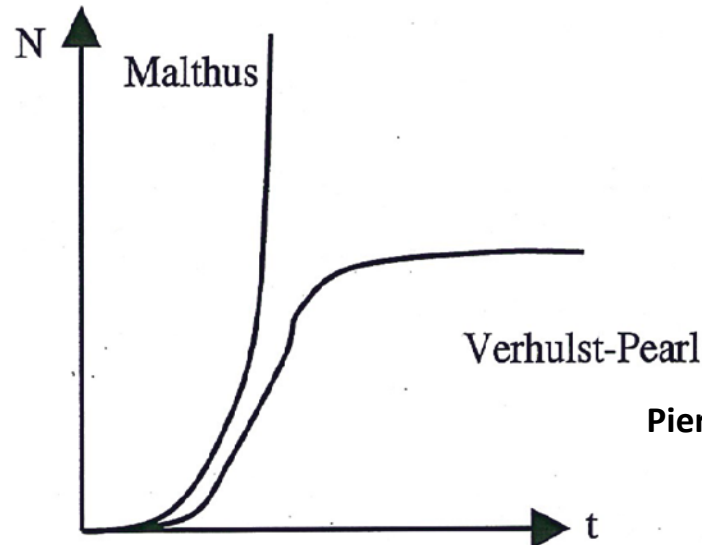
Annahme: Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit proportional zur Individuenanzahl

(Verhulst-Pearl)

$$r = r^0 - mN$$

$$\frac{dN}{dt} = (r^0 - mN)N$$

$$N = \frac{N_0 r_0 e^{r_0 t}}{r_0 + m N_0 (e^{r_0 t} - 1)}$$



Pierre-Francois Verhulst
1804-1849

Logistische Gleichung (Medizin, Lebensmittelbiotechnologie)

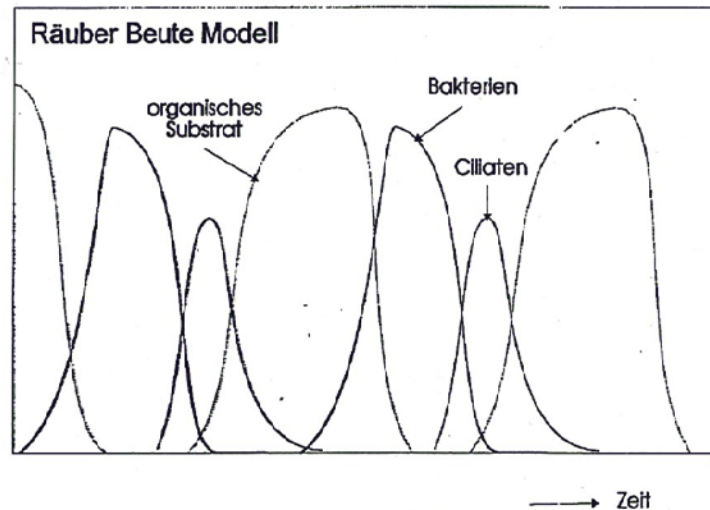
Populationsdynamik komplexerer Systeme

Beispiel: 2 konkurrierende Arten

$$\frac{dN_1}{dt} = (r_1^0 - \alpha_{11} N_1 - \alpha_{12} N_2) N_1$$
$$\frac{dN_2}{dt} = (r_2^0 - \alpha_{22} N_2 - \alpha_{21} N_1) N_2$$

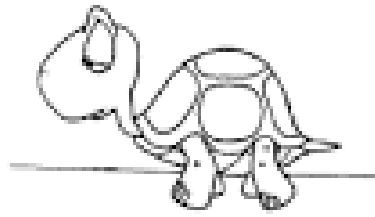
α_{11} α_{22} WWW von Individuen derselben Art
 α_{12} α_{21} gegenseitige WW.

- Exklusion (Verschwinden)
- Koexistenz
- periodische Populationsschwankungen der Räuber-Beute-Korrelation



Lotka-Volterra Modell (1925/1926)

Probleme und deren Lösung bei schnellen Reaktionen?



Slow Reaction

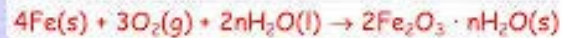
vs.



Fast Reaction

Very slow reactions

Rusting of iron



Praktische Durchführung kinetischer Untersuchungen:

Problem: Was passiert bis zur Analyse ? Wie Proben einfrieren ?

1.) Konzentrationsproportionale Größen

- Druckänderung bei Gasreaktionen, bei kleinem P ideales Gas
- Leitfähigkeitsänderungen bei Ionenreaktionen in Lösung
- Drehung des Polarisationswinkels von Licht
- Absorption monochromatischen Lichtes

(NADH bei 260 und 340 nm wohingegen NAD⁺ nur bei 260 nm)

- Fluoreszenz (gemessen 90 Grad, Absolutmessung, empfindlich)

(FR Fluoreszenzrate (Quanten/Zeit), ϕ_{FL} (Quantenausbeute)

(Beispiel: AS Tryptophan Anregung bei 220 nm und Emission bei 340nm)

$$FR = A (I_0 - I) \phi_{FL} = A I_0 \phi_{FL} (1 - 10^{-\epsilon c d}) \quad 10^x \approx 1 + X \ln(10) \quad \text{für } X \ll 1$$

$$FR = g c \epsilon \quad \text{mit } g = A I_0 \phi_{FL} d \ln(10)$$

$$P = \frac{nRT}{v}$$

$$\lambda = C F (u_+ + u_-)$$

$$\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = A = \epsilon d c$$

Praktische Durchführung kinetischer Untersuchungen:

Problem: Was passiert bei sehr schnellen Reaktionen ? Wie kann man den Einfluß der Mischkinetik minimieren?

Mischmethoden

Continuous flow-Methode $t=d/u$

(Geschwindigkeit einige m/s, hoher Chemikalienverbrauch)

Stopped flow-Methode

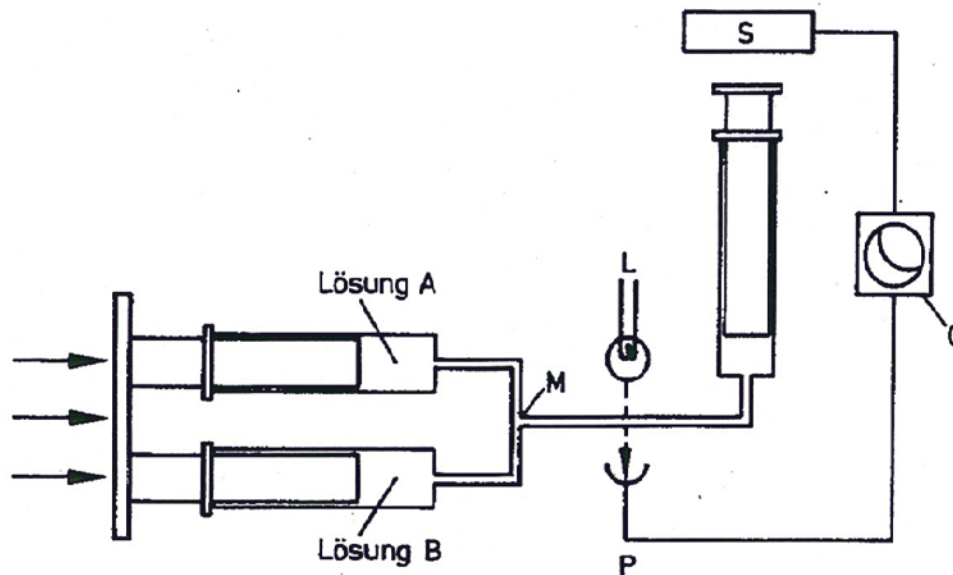
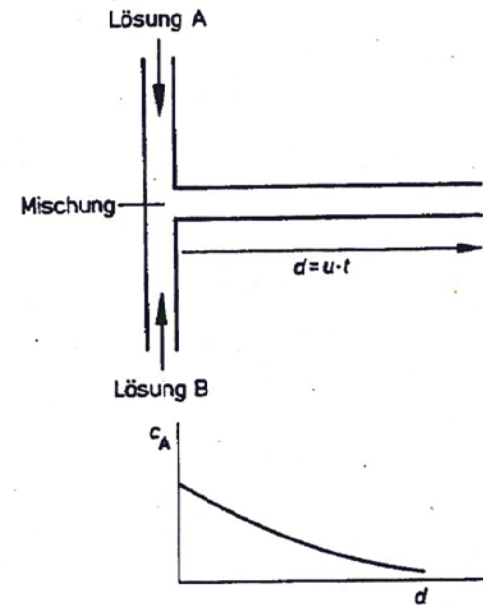


Abb. 10.24. Prinzip der Stopped flow-Methode

rw-Methode



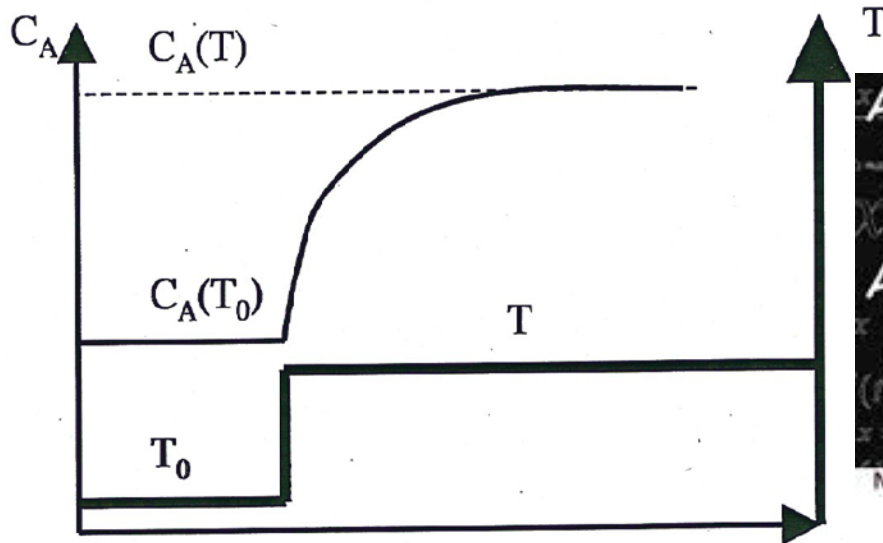
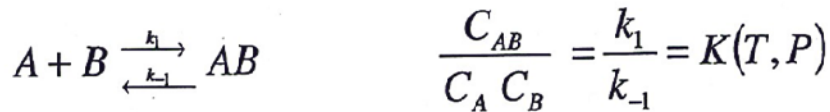
Praktische Durchführung kinetischer Untersuchungen:

Problem: Was kann man bei Reaktionen in ns-Bereich tun?


Relaxationsverfahren

(Störung eines GGW durch eine sprunghafte/periodische Änderung einer phys. Größe,

Manfred Eigen 1959) *Nobelpreis*



A **theory** has only the alternative of being right or wrong.
A **model** has a third possibility: it may be right, but irrelevant.



Manfred Eigen

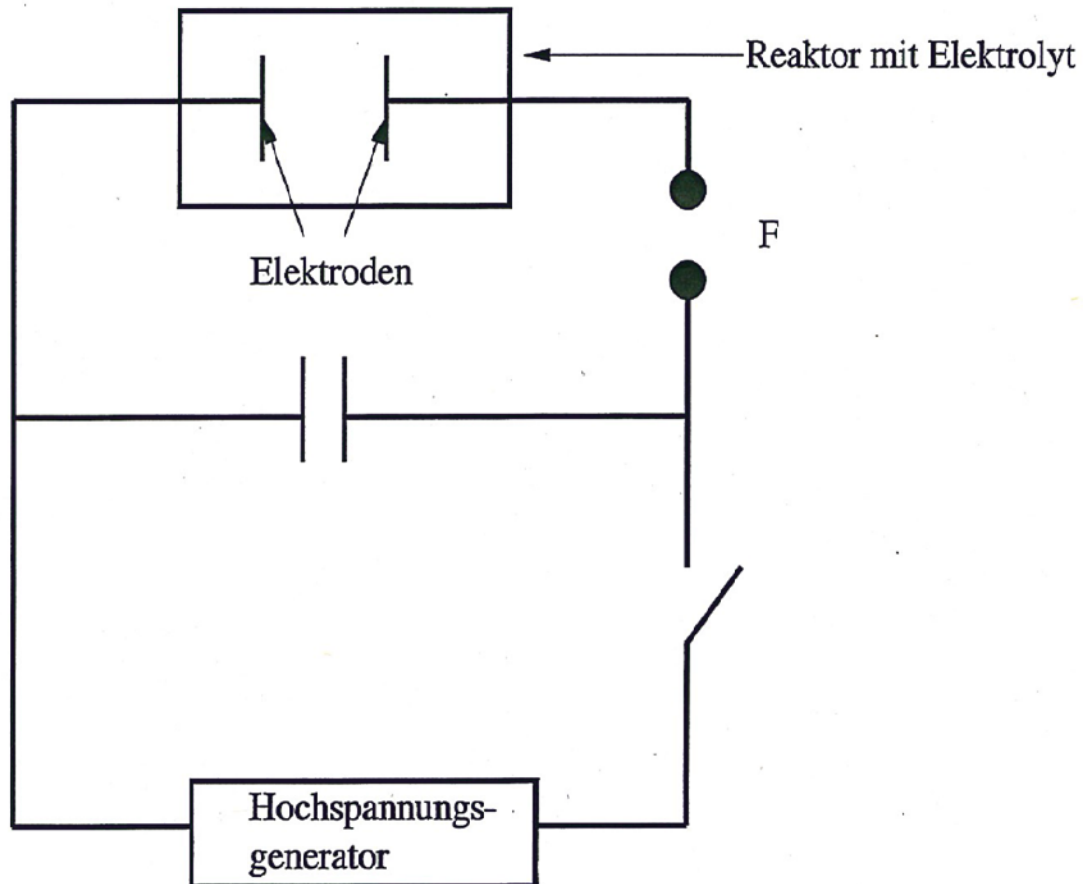
More science quotes at Today in Science History todayinsci.com

t

Relaxationsverfahren:

Problem: Wie erreicht man schnelle Aufheizraten?

ΔT ca. 5 - 10 K, Aufheizzeit von 50 ns bis $1\mu s$

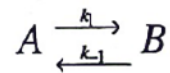


Relaxationsverfahren:

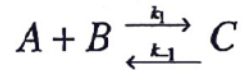
Mathematische Form für alle Konzentrationsrelaxationen (einstufige Reaktionen) identisch

$$C_A(t) = C_A^{eq}(T) \left(1 - a e^{-t/\tau} \right) \quad \text{mit} \quad a = \frac{C_A^{eq}(T) - C_A^{eq}(T_0)}{C_A^{eq}(T)}$$

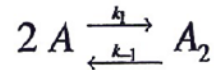
lediglich die Relaxationszeit unterscheidet sich



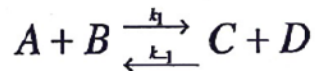
$$\frac{1}{\tau} = k_1 + k_{-1}$$



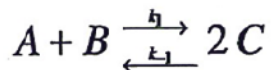
$$\frac{1}{\tau} = k_1 (C_A + C_B) + k_{-1}$$



$$\frac{1}{\tau} = 4k_1 C_A + k_{-1}$$



$$\frac{1}{\tau} = k_1 (C_A + C_B) + k_{-1} (C_C + C_D)$$

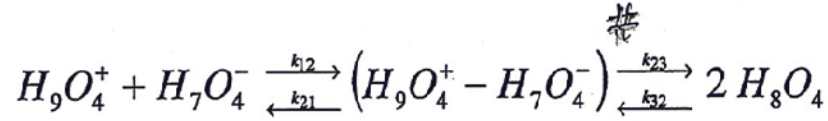


$$\frac{1}{\tau} = k_1 (C_A + C_B) + 4k_{-1} C_C$$

Relaxationsverfahren:

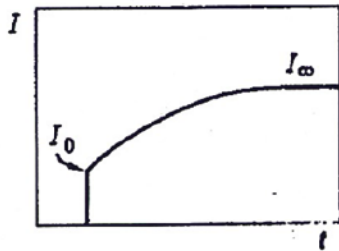
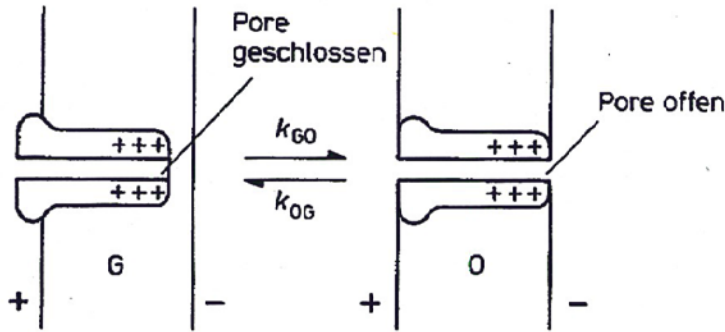
Beispiele der Anwendung:

Dissoziation von Wasser:

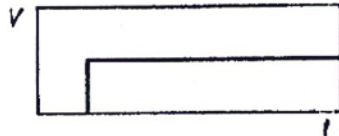


$$k_{12} = 1.4 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Kinetik eines Ionenkanals (Nervenerregung):



$$I(t) = I_\infty(T) \left(1 - a e^{-t/\tau} \right) \quad \text{mit} \quad a = \frac{I_\infty - I_0}{I_\infty}$$



$$\frac{1}{\tau} = k_{G0} + k_{OG}$$

MFA – Metabolic Flux analysis

Andere Begriffe: **FBA** - Flux Balance Analysis, **MPA** - Metabolic Pathway Analysis

Fluss-Definition: “Reaktionsgeschwindigkeit” bezogen auf die Trockenmasse.

$$CO_2 - Fluss = \frac{CO_2 - produziert \left[mol l^{-1} \right]}{t[s] \quad Biomasse \left[mol l^{-1} \right]}$$

Massenbilanz: (mathematische Grundlage der MFA)

Akkumulation = Reaktion + Transport

$$\frac{d M_n}{d t} = S_n v_n - b_n$$

M_n – Metabolitvektor

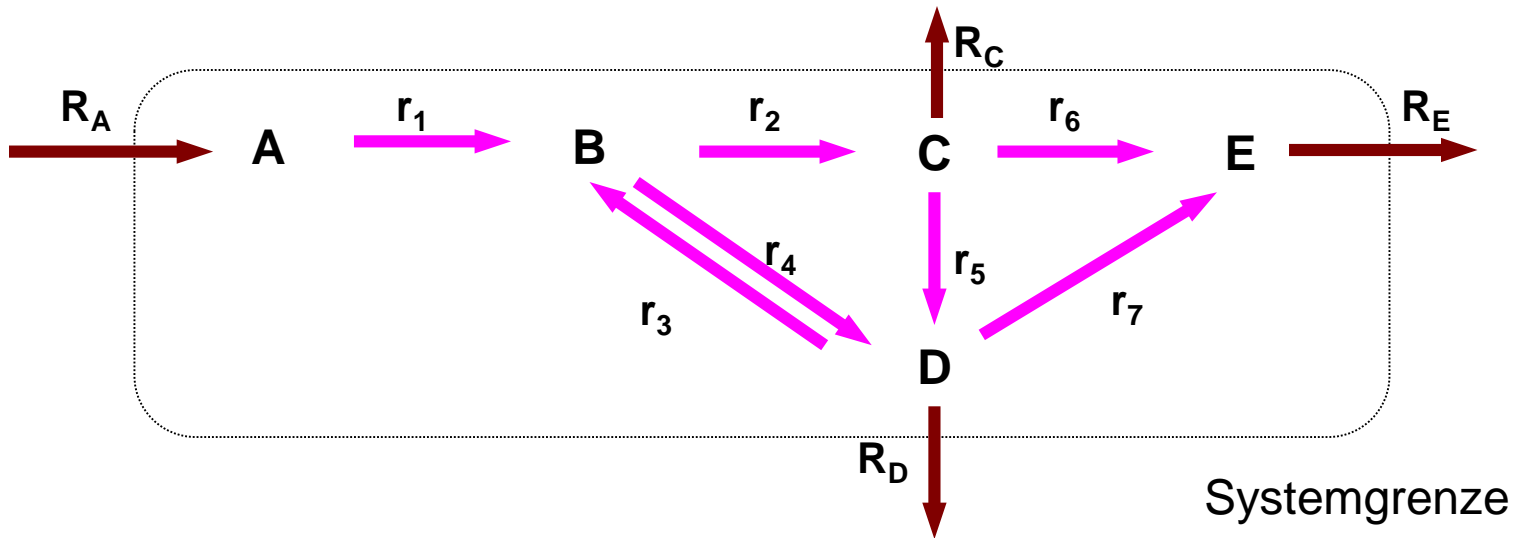
S_n – Stöchiometrische Matrix

b_n - Transportvektor

Grundannahme: *stationärer Zustand*

$$\frac{d M_n}{d t} = 0 = S_n v_n - b_n$$

Die Zeitkonstanten des Wachstums ist sehr viel größer als die assoziiert mit den Metabolitreaktionen



Massenbilanz

$$\mathbf{A}: -r_1 = -R_A$$

$$\mathbf{B}: +r_1 - r_4 - r_2 + r_3 = 0$$

$$\mathbf{C}: r_2 - r_5 - r_6 = +R_C$$

$$\mathbf{D}: -r_3 + r_5 + r_4 - r_7 = +R_D$$

$$\mathbf{E}: +r_6 + r_7 = +R_E$$

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = \mathbf{b}$$



$$\begin{matrix}
 \begin{bmatrix} r_1 & r_2 & r_3 & r_4 & r_5 & r_6 & r_7 \end{bmatrix} \\
 \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & -1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 1 & 1 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 \end{pmatrix} \\
 \underbrace{\hspace{15em}}_{\text{Interne Flüsse}}
 \end{matrix}
 =
 \begin{matrix}
 \begin{pmatrix} -R_A \\ 0 \\ R_C \\ R_D \\ R_E \end{pmatrix} \\
 \underbrace{\hspace{15em}}_{\text{Transport Fluss}}
 \end{matrix}$$

Zahl der Freiheitsgrade=

Zahl der unbekanntes Flüsse – Anzahl
der Bestimmungsgleichungen- Anzahl der
exp. Informationen

> 0

$= 0$

< 0

Mehrere Lösungen
möglich; schließe
weitere Experimente ein;
oder Optimiere

Es existiert eine Lösung

System überbestimmt,
statistische Absicherung

Vorgehensweise

- I. Konstruktion der stöchiometrischen Matrix
- II. Einbau der experimentellen Parameters in das Modell
- III. Definieren der physiologisch sinnvollen Zielfunktion und der einschränkenden Bedingungen
- IV. Graphische Visualisierung und Analyse der Flüsse

Genutzte Reaktionen (*E. coli*)

Teil I

Glycolysis

-1ATP+1ADP+2Pi-1G1P+1Glycogen;
+1G1P-1G6P;
-1ATP+1ADP-1Glc+1Pi+1G6P;
+1F6P-1G6P;
-1F6P+1G6P;
+1NADH+1ATP-1ADP-1Pi-1T3P+1ThreePG;
-1NADH-1ATP+1ADP+1Pi+1T3P-1ThreePG;
+1PEP-1ThreePG;
-1PEP+1ThreePG;
+1ATP-1ADP-1Pi-1PEP+1Pyr;
-2ATP+2ADP+2Pi+1PEP-1Pyr;
+1CO-1ATP+1ADP+1Pi+1PEP-1OA;
-1CO-1PEP+1OA;
-1NADH-1Pyr+1Lactate;
+1NADH+1Pyr-1Lactate;
-1Pyr+1AcCoA+1Formate;
+1Pyr-1AcCoA-1Formate;
+1ATP-1ADP-1Pi-1AcCoA+1Acetate;
-1ATP+1ADP+1Pi+1AcCoA-1Acetate;
-2ATP+2ADP+2Pi+1AcCoA-1Acetate;
-2NADH-1AcCoA+1Ethol;
-1ATP+1ADP-1GL+1GL3P;
+1NADH+1T3P-1GL3P;
-1NADPH-1T3P+1GL3P;

Pentose Pathway

+2NADPH+1CO+1R5P-1G6P;
-1ATP+1ADP+1Pi+2T3P-1F6P;
+1Pi-2T3P+1F6P;
+1E4P-2R5P+1F6P;
-1E4P+2R5P-1F6P;
-1E4P+1T3P-1R5P+1F6P;
+1E4P-1T3P+1R5P-1F6P;
-1T3P+2R5P-1S7P;
+1T3P-2R5P+1S7P;
-1E4P+1T3P-1F6P+1S7P;
+1E4P-1T3P+1F6P-1S7P;

Citric Acid Cycle

+1CO+1NADH-1Pyr+1AcCoA;
-1OA-1AcCoA+1Citrate;
-1Citrate+1ICitrate;
+1Citrate-1ICitrate;
+1NADPH+1CO+1aKG-1ICitrate;
-1NADPH-1CO-1aKG+1ICitrate;
+1CO+1NADH-1aKG+1SuccCoA;
+1ATP-1ADP-1Pi-1SuccCoA+1Succ;
-1ATP+1ADP+1Pi+1SuccCoA-1Succ;
+1FADH-1Succ+1Fum;
-1Fum+1Malate;
+1Fum-1Malate;
+1NADH+1OA-1Malate;
+1NADPH+1CO+1Pyr-1Malate;
+1CO+1NADH+1Pyr-1Malate;

Gloxalate Shunt

-1AcCoA-1Glx+1Malate;
+1Succ+1Glx-1ICitrate;

Transfer of 1 Carbon Compounds

-1DHF-1NADPH;
-1GLY+1NH+1MethyleneTHF+1CO;
-1MethyleneTHF-1FADH+1MethylTHF;
-1MethyleneTHF+1MethenylHF+1NADH;
-1MethenylHF+1FormylTHF;

Genutzte Reaktionen (*E. coli*)

Teil II

Trans-hydrogenation reactions

-1NADPH+1NADH;
+1NADPH-1NADH-2Hexp;
-1NADH+1QH;
-1NADH+2Hexp+1QH;
-1FADH+1QH;
+2Hexp-1QH-0.5Oxygen;
-1ATP+1ADP+1Pi+3Hexp;
+1ATP-1ADP-1Pi-3Hexp;

Lipid Synthesis

-1CO-1ATP+1ADP+1Pi-1AcCoA+1MalACP;
-12NADPH-1AcCoA-6MalACP+1C4C;
-11NADPH-1AcCoA-6MalACP+1C4iC;
-14NADPH-1AcCoA-7MalACP+1C6C;
-13NADPH-1AcCoA-7MalACP+1C6iC;
-15NADPH-1AcCoA-8MalACP+1C8IC;
-1GL3P-1C6C-1C6iC+1PA;
+1PPi-1CTP-1PA+1CDPDG;
-1SER+1CMP-1CDPDG+1PS;
+1CO-1PS+1PE;
+1Pi+1CMP-1GL3P-1CDPDG+1PG;
+1GL-2PG+1CL;

Amino Acid Synthesis

-1CO-1GLN-2ATP+1GLU+1CAP+2ADP+1Pi;
-1NADPH-1ATP+1ADP+4Pi-1E4P-2PEP+1Chor;
+1CO-1GLU-1Chor+1aKG+1PHE;
+1CO+1NADH-1GLU-1Chor+1aKG+1TYR;
+1CO-1GLN+1GLU-1Chor-1PRPP+1IGP+1Pyr+1PPi;
-1IGP-1SER+1T3P+1TRP;
-1GLU+1aKG-1OA+1ASP;
-1GLN-1ATP+1GLU+1ADP+1Pi-1ASP+1ASN;
-1NADPH-1ATP+1ADP+1Pi-1ASP+1ASPSA;
-1NADPH-1GLU+1aKG-1Pyr-1ASPSA-
1SuccCoA+1Succ+1mDAP;
+1CO-1mDAP+1LYS;
-1NADPH-1ASPSA+1HSer;
+1NH-1MethylTHF+1Pyr-1SuccCoA+1Succ-1HSer-
1CYS+1MET;
-1ATP+1ADP+2Pi-1HSer+1THR;
-1NADPH+1NH+1CO-1GLU+1aKG-1Pyr-1THR+1ILE;
-1NADPH-1NH+1GLU-1aKG;
-1NH+1GLN-1ATP-1GLU+1ADP+1Pi;
-1NADPH-1GLN+2GLU-1aKG;
-2NADPH-1NADH-1ATP-1GLU+1ADP+1Pi+1PRO;
-1NADPH-1ATP-2GLU+1ADP+1Pi+1aKG-
1AcCoA+1Acetate+1Om;
-1CAP+1Pi-1Om+1Citr;
-1ATP+1PPi-1ASP-1Citr+1Fum+1ARG+1AMP;
-1GLU+1aKG+1SER-1ThreePG;
+1GLY+1MethyleneTHF-1SER;
-1SER+1CYS-1AcCoA+1Acetate-1H2S;
-1GLU+1aKG-1Pyr+1ALA;
-1NADPH+1CO-2Pyr+1Kval;
-1GLU+1aKG-1Kval+1VAL;
+1CO+1NADH-1GLU+1aKG-1AcCoA-1Kval+1LEU;
-1ATP+1PRPP+1AMP-1R5P;
+2NADH-1GLN-1ATP+1Pi+1aKG-1PRPP+2PPi+1HIS+1PRAIC;
-1GLY-1CO-1MethenylHF-2GLN-4ATP+2GLU+4ADP+4Pi-
1PRPP+1PPi-1ASP+1Fum+1PRAIC;

Genutzte Reaktionen (*E. coli*)

Teil III

Nucleotide Biosynthesis

-1FormylTHF-1PRAIC+1IMP;
+1Pi-1ASP+1Fum+1AMP-1IMP-1GTP+1GDP;
+1NADH-1GLN-1ATP+1GLU+1PPi+1AMP-1IMP+1GMP;
+1CO+1FADH-1CAP+1Pi-1PRPP+1PPi-1ASP+1UMP;
-1GLN-1ATP+1GLU+1ADP+1Pi-1UTP+1CTP;
-1ATP+2ADP-1AMP;
-1ATP+1ADP+1GDP-1GMP;
-1ATP+1ADP-1UMP+1UDP;
-1ATP+1ADP-1CMP+1CDP;
-1ATP+1ADP+1GTP-1GDP;
+1ATP-1ADP-1GTP+1GDP;
-1ATP+1ADP+1UTP-1UDP;
-1ATP+1ADP+1CTP-1CDP;
+1Pi-1CTP+1CDP;
-1ADP-1TREDH+1dADP;
-1GDP-1TREDH+1dGDP;
-1CDP-1TREDH+1dCDP;
-1UDP-1TREDH+1dUDP;
-1ATP+1ADP-1dADP+1dATP;
-1ATP+1ADP-1dGDP+1dGTP;
-1ATP+1ADP-1dCDP+1dCTP;
-1ATP+1ADP-1dUDP+1dUTP;
+1DHF-1MethyleneTHF-2ATP+2ADP+1PPi-1dUTP+1dTTP;
+1NH-1dCTP+1dUTP;
-1NADPH+1TREDH;

Cell Wall Synthesis

-1GLN+1GLU+1PPi-1AcCoA-1UTP-1F6P+1UDPNAG;
+2Pi-1PEP+1PPi-1R5P-1CTP+1CMPKDO;
-1ATP+6ADP+2Pi+1PPi+2Acetate+1UMP+1UDP+3CMP+3CDP-2C4C-4C4iC-2UDPNAG-3CMPKDO-3CDPEtN-2ADPGlc-3ADPHexp+1LPS;
+1CO-1ATP+1ADP+1PPi-1SER-1CTP+1CDPEtN;
-1ATP+1PPi+1ADPGlc-1G1P;
-1ATP+1PPi+1ADPHexp-1S7P;
-1NADPH-5ATP-1GLU+5ADP+7Pi-1PEP-1mDAP-2ALA+1UMP+1UDP-2UDPNAG+1Pept;
+1CO-1Om+1PTRSC;
+1MethyleneTHF+1CO-2ATP+1ADP+1Pi+1PPi-1MET+1AMP+1H2S-1PTRSC+1SPRMD;

Sulphur

-4NADPH-2ATP+1ADP+1Pi+1PPi+1AMP+1H2S;

Phosphate

+2Pi-1PPi;

Transport

+1Pi;
+1Oxygen;
+1NH;
-1CO;
-1BIOM;
+1Glc;
+1Acetate;

Wachstumsgleichung

Resultiert aus den Metabolitanforderungen für eine gegebene Biomassezusammensetzung von *E.coli*.

+1BIOM-0.582GLY-0.0485MethylTHF-0.25GLN-**45.135ATP+44.96ADP+ 44.96Pi**-
0.25GLU-0.176PHE-0.131TYR-0.205SER-0.054TRP-0.229ASP-0.229ASN-0.326LYS-
0.087CYS-0.146MET-0.241THR-0.276ILE-0.21PRO-0.281ARG-0.488ALA-0.402VAL-
0.428LEU-0.09HIS-0.203GTP-0.136UTP-0.126CTP-0.0247dATP-0.0254dGTP-
0.0254dCTP-0.0247dTTP-0.00258PS -0.09675PE-0.02322PG-0.00645CL-
0.00785LPS-0.0276Pept-0.0341PTRSC-0.007SPRMD-0.154Glycogen;

Millimoles Metabolit in 1 g trockene Biomasse

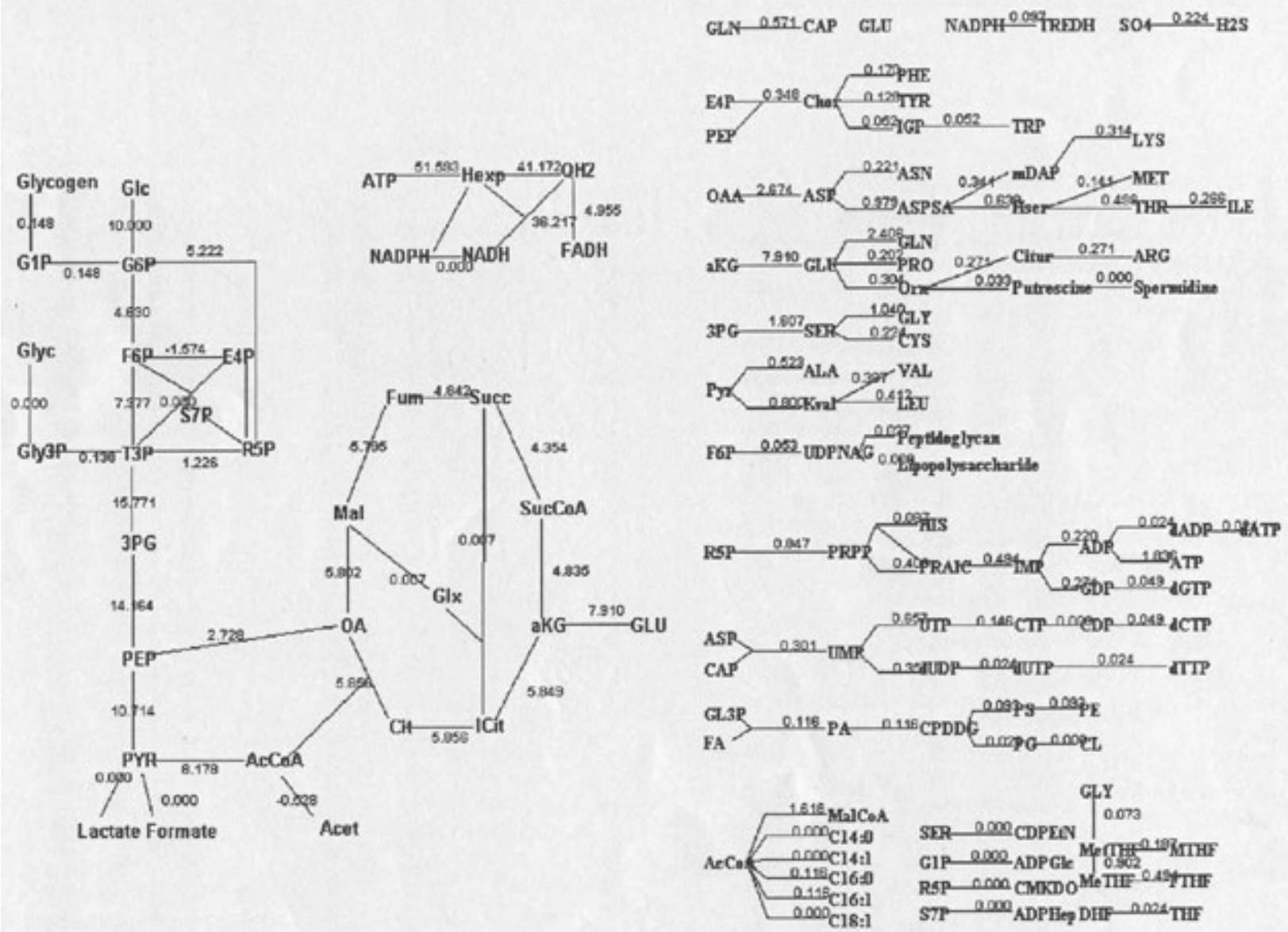
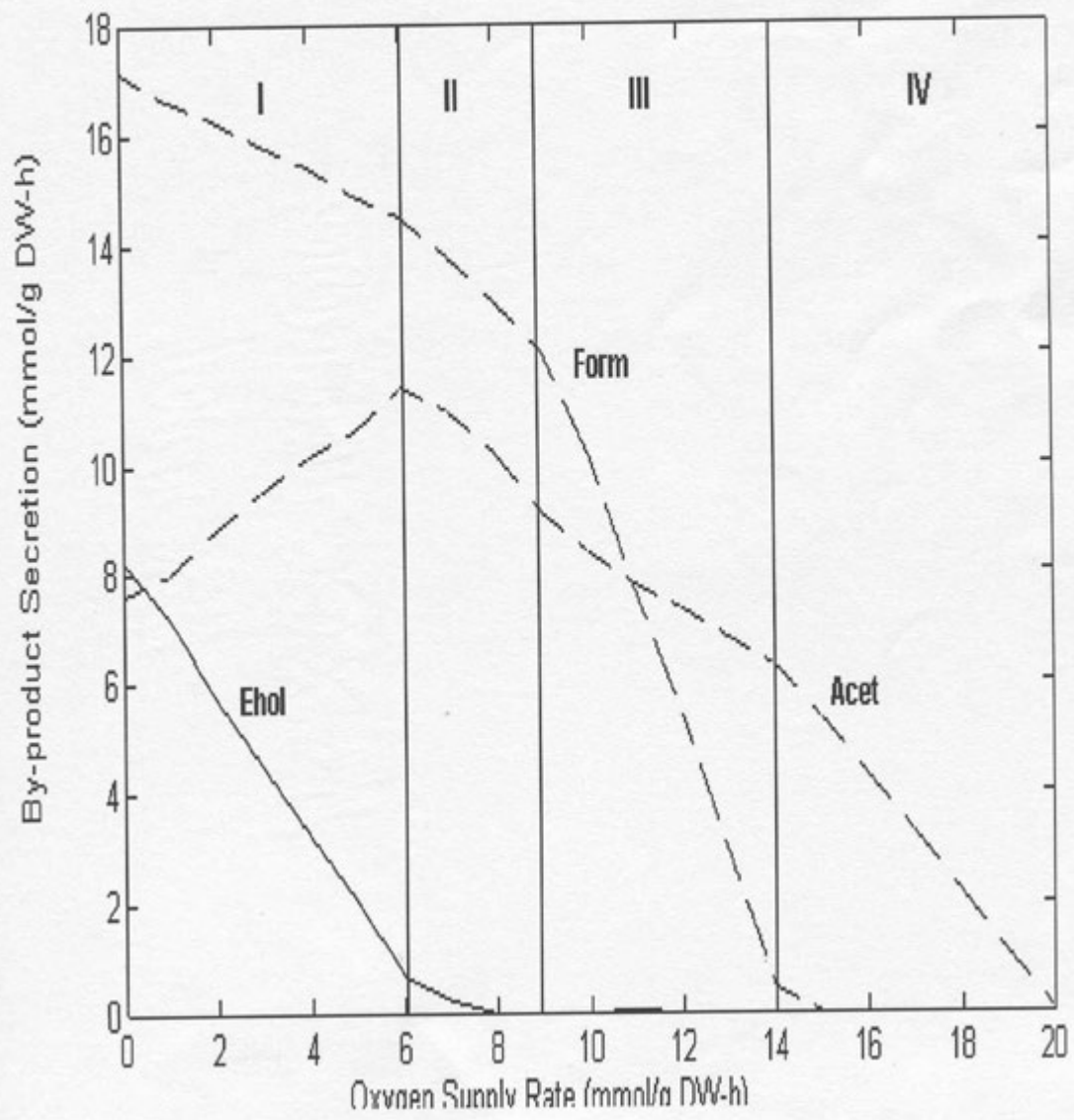
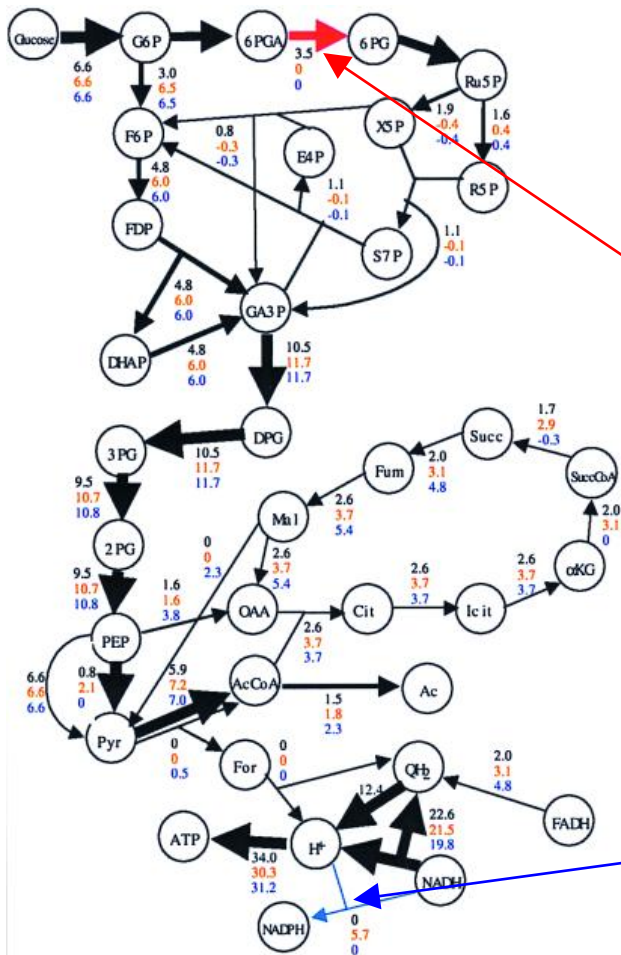


Figure 2. Optimal Flux distribution with 10 mmol/g DW-h Glucose

Optimal By-product Secretion for Various Oxygenation Rate



Edwards & Palsson (2000)



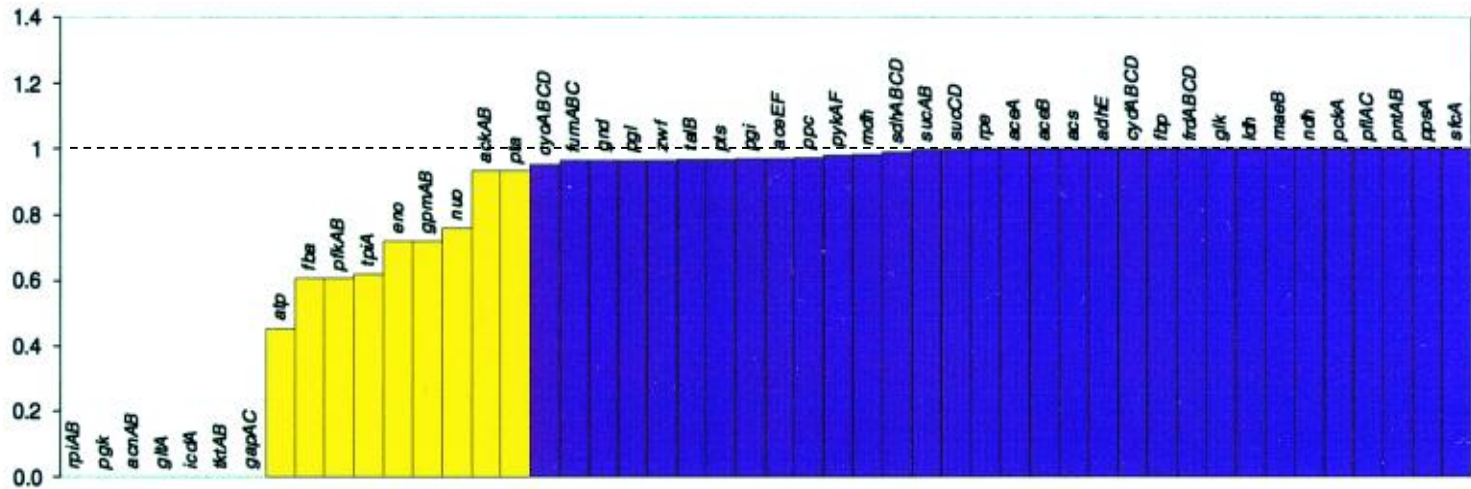
Reference: *PNAS* **97**: 5528-33, 2000.

Metabolic Flux Analysis wird angewandt um die Konsequenzen der Lösung von Enzymen für *E. coli* vorherzusagen.

Konsequenzen der **Löschung** von Enzymen.

Edwards & Palsson (2000)

Bruchteil der normalen Wachstumsrate



Genlösungen, die das Wachstum stoppen sollten.

Genlösungen, die das Wachstum beeinflussen sollten

Genlösungen, die Wachstum nicht beeinflussen sollte

Edwards & Palsson (2000)

Vergleich der Vorhersagen zum Verhalten der *E. coli* Mutanten mit dem Experiment zeigt:

In 68 von 79 Fällen (86%) stimmt die Vorhersage !!!

Anwendungen

- Quantifizierung der verschiedenen intrazellulären Flüsse
- Identifizierung metabolischer Flaschenhälse
- Berechnung nicht-messbarer extrazellulärer Flüsse
- Einfluss alternativer Routen auf die Flussverteilung
- Berechnung des maximal möglichen Ertrages
- Hinweise zur phenotypischen Optimierung
- Hinweise zur genotypischen Optimierung

Theorie chemischer Reaktionen / Temperaturabhängigkeit d. Geschwindigkeitskonstanten

1) Arrhenius Theorie (1885)



$$r_A = k C_{A^*}$$

$$K^* = \frac{C_{A^*}}{C_A}$$

$$r_A = k K^* C_A$$

Idee: nur ein Bruchteil der Ausgangsstoffe A ist für eine Reaktion befähigt (aktivierte A*)

diese stehen im GGW mit den passiven Molekülen

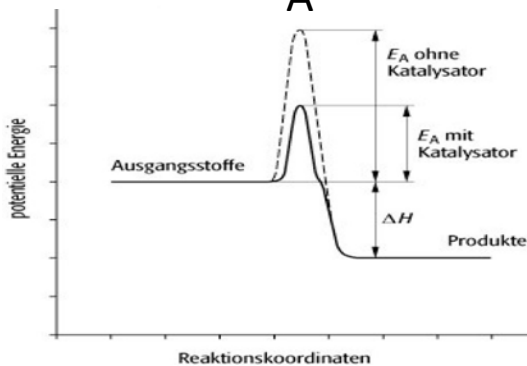
$$K^*(T) = C \exp\left(-\frac{\Delta U^*}{RT}\right)$$

van 't - Hoffsche Reaktionsisochore

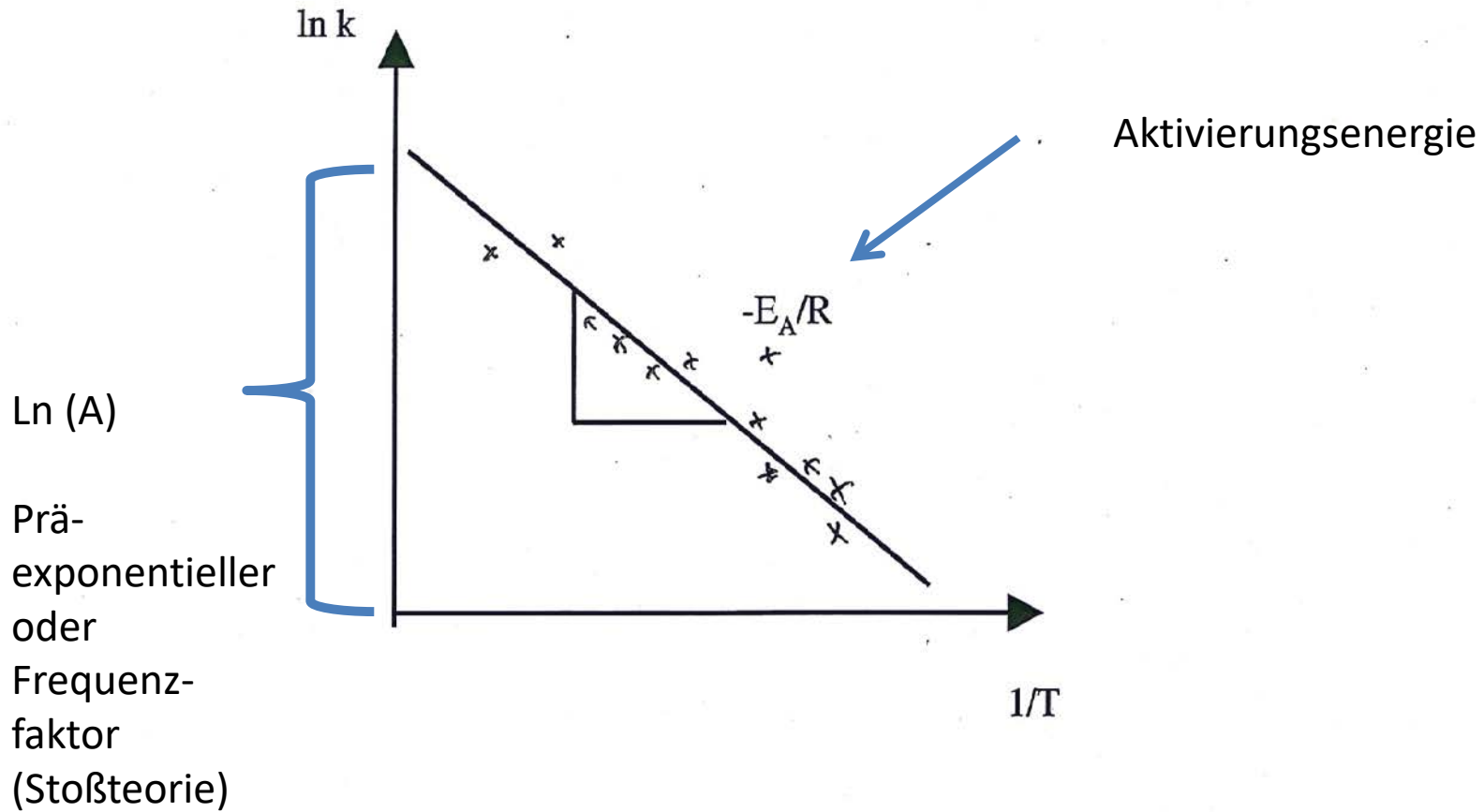
$$k(T) = A \exp\left(-\frac{E_A}{RT}\right)$$

E_A Aktivierungsenergie

A Frequenz- oder Häufigkeitsfaktor



Ermittlung der Arrheniuskonstanten



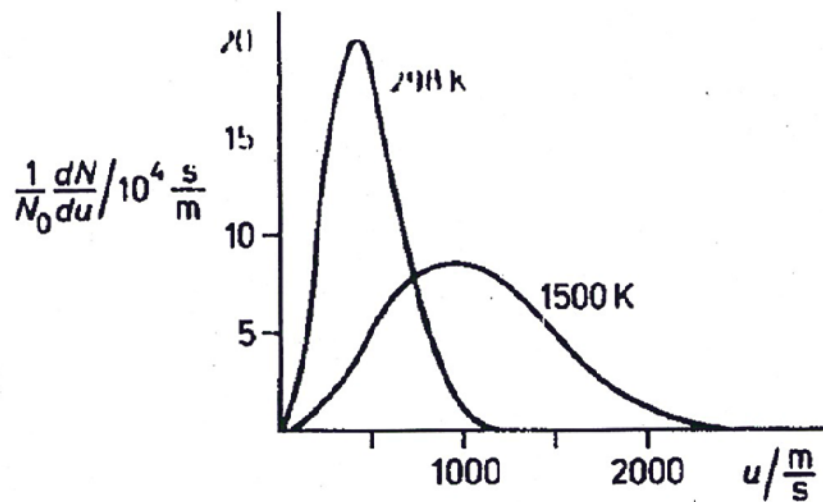
Theorie chemischer Reaktionen

2) Stoßtheorie

Moleküle begegnen sich im Reaktionsraum (stoßen, kollidieren)

nur energiereiche Stöße überwinden eine Reaktionsbarriere, führen zur Reaktion

die Geschwindigkeits-, Energieverteilung folgt aus der kinetischen Gastheorie



$$\frac{1}{N_0} \frac{dN}{du} = \frac{m}{kT} u \exp\left(-\frac{mu^2}{2kT}\right)$$

↓
Boltzmann
u - Geschwindigkeit
m - Masse
T - Temperatur
k - Boltzmann-Konstante

$$-\frac{dN_A}{dt} = k N_A N_B = Z_{AB} Q p$$

Z_{AB} Zahl der Zusammenstöße
 Q der Bruchteil der Stöße, der zu einer Reaktion führt
 p Anteil der sterisch günstigen Stöße

$$k = p (d_A + d_B)^2 \sqrt{\frac{\pi R T}{2 \mu}} e^{-E_A/RT}$$

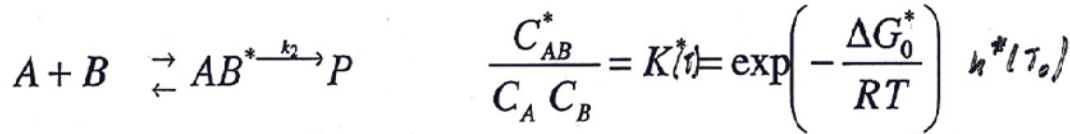
$(d_A + d_B)$ Summe der Moleküldurchmesser
 μ reduzierte Molmasse $M_A M_B / (M_A + M_B)$

Besonderheit:

Temperaturabhängigkeit des Frequenzfaktors

Theorie chemischer Reaktionen

3) Eyring Theorie

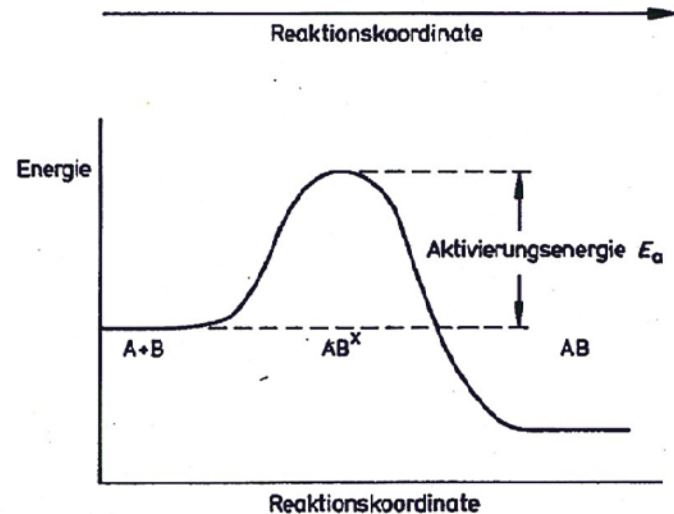


kurzlebige Zwischenzustände AB^* , die durch ein GGW beschrieben werden, das durch eine Folgereaktion kaum gestört wird

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{\Delta S_0^*}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H_0^*}{RT}\right)$$



$$\begin{aligned} \frac{dP}{dt} &= k_2 C_{AB^*} = k_2 k^\ddagger(T) C_A C_B \\ &= k_2 k^\ddagger(T_0) \exp\left(-\frac{\Delta G_0^*}{RT}\right) C_A C_B \\ &= \underbrace{k_2 k^\ddagger(T_0)}_{QC} \exp\left(\frac{\Delta S_0^*}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H_0^*}{RT}\right) \end{aligned}$$



Thank you for your attention and...

wake up it's over...



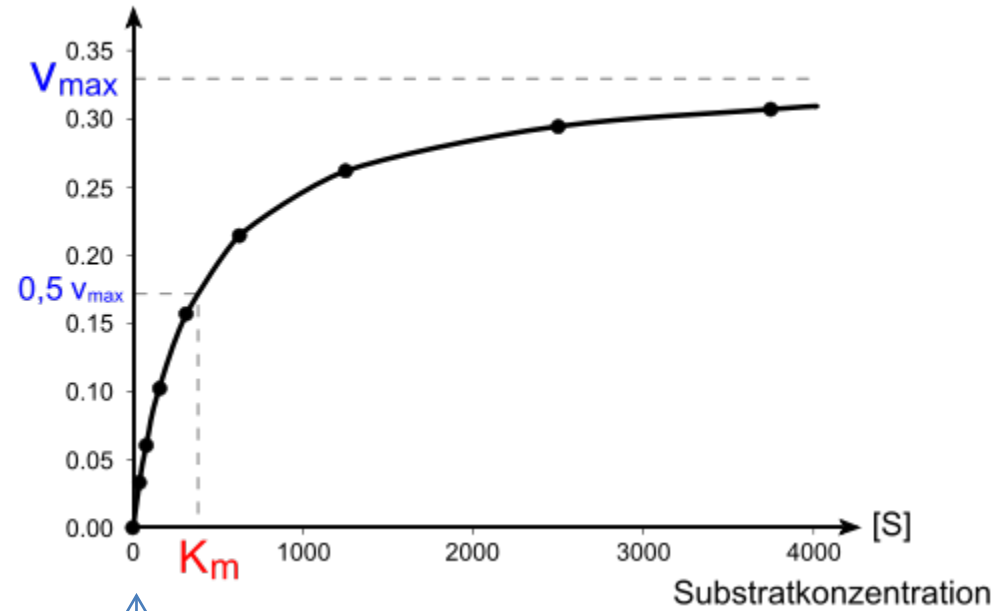
Reservefolien

- Inhalt schon bei irreversibler Thermodynamik gezeigt

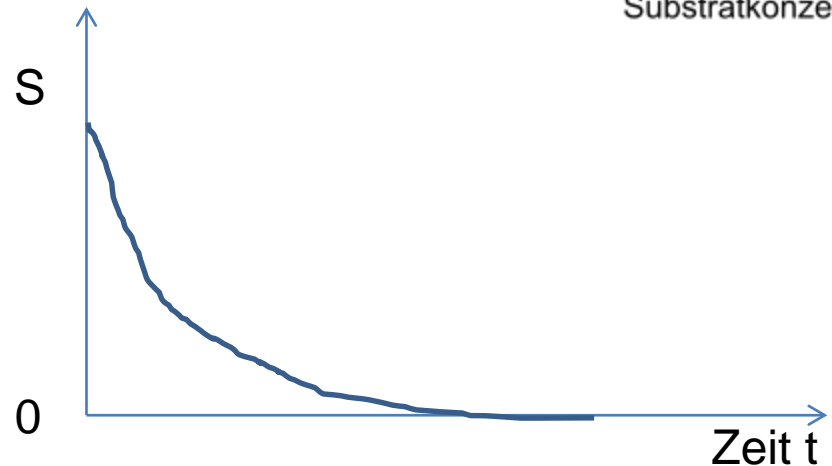
Warum ist Michaelis/Menten manchmal unzureichend?

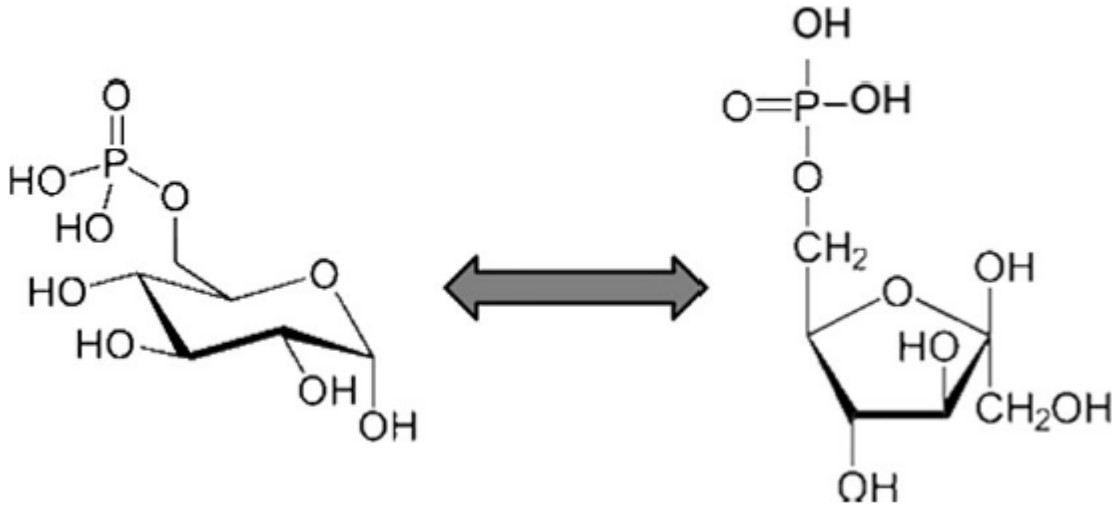
$$\frac{dS}{dt} = r = r_{Max} \cdot \frac{S}{k_S + S}$$

Umsatzgeschwindigkeit v



Substrat-
konzentration S



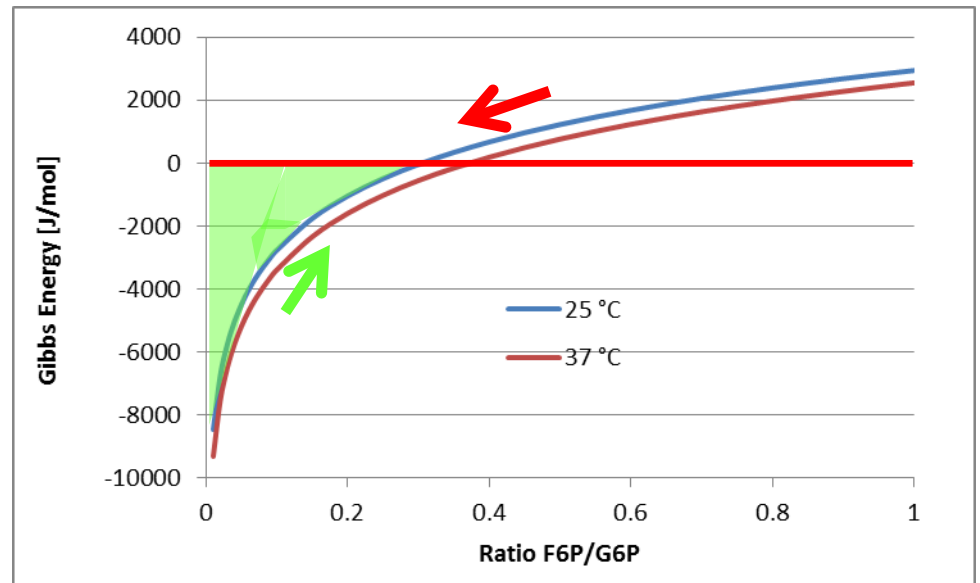


G6P



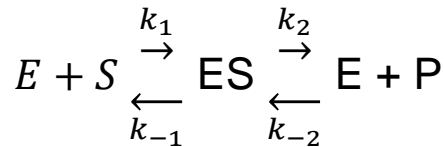
F6P

Das heißt, die Reaktion kommt zum Erliegen, obwohl $S \neq 0$
 Also Widerspruch zu Michaelis Menten

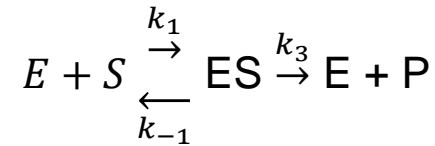


Die Lösung: Reversible Michaelis Menten Kinetik

reversibel



konventionell; irreversibel



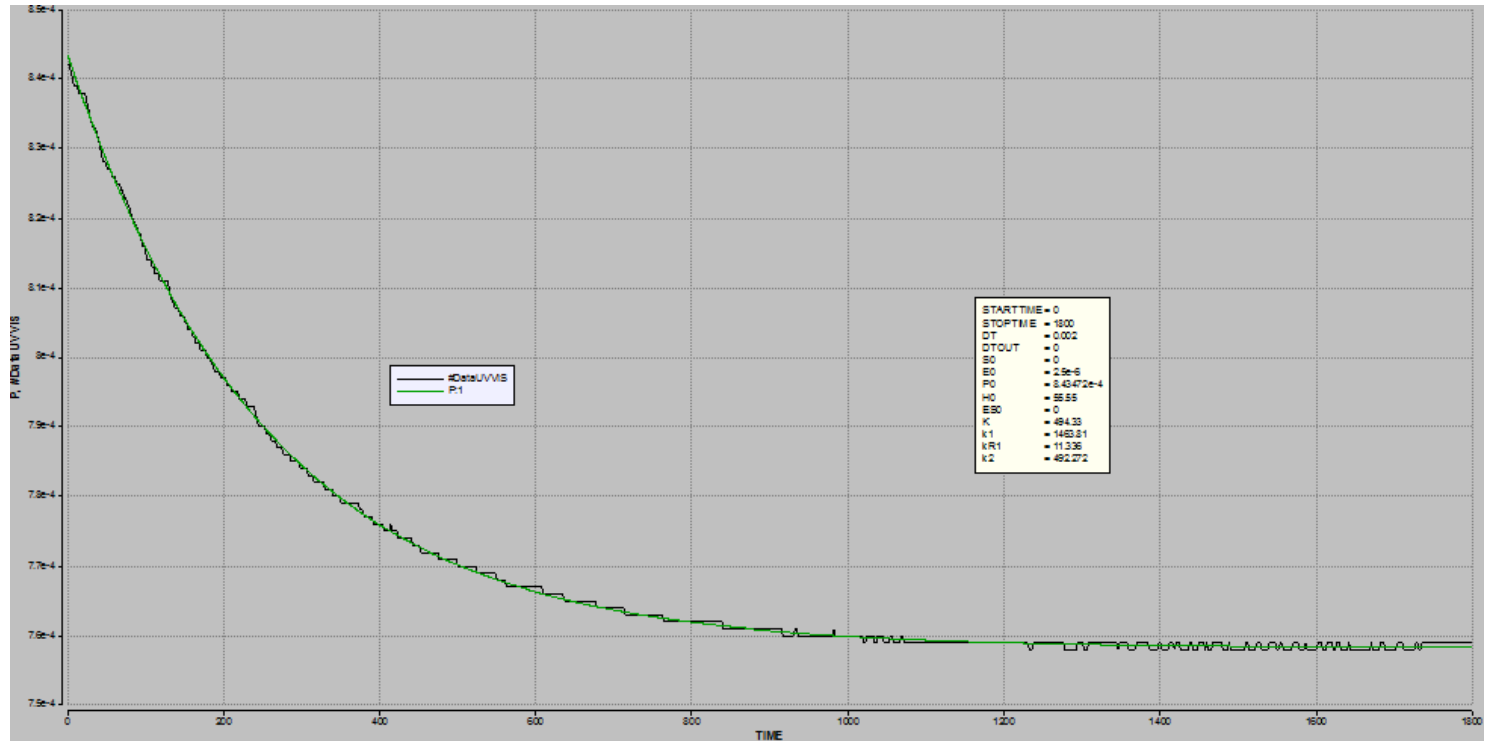
$$r = \frac{\frac{k_1 \cdot k_2 \cdot S \cdot E_0}{k_{-1} + k_2} - \frac{k_{-1} \cdot k_{-2} \cdot P \cdot E_0}{k_{-1} + k_2}}{1 + \frac{k_1 \cdot S}{k_{-1} + k_2} + \frac{k_{-2} \cdot P}{k_{-1} + k_2}}$$

4 Parameter, aber Geschwindigkeitskonstanten nicht unabhängig, es gelten die Gleichgewichtsbedingungen

$$K_1 = \frac{[ES]}{[S] \cdot [E]} = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad K_2 = \frac{[E] \cdot [P]}{[ES]} = \frac{k_2}{k_{-2}} \quad K = K_1 \cdot K_2 = \frac{[P]}{[S]} = \frac{k_1 \cdot k_2}{k_{-1} \cdot k_{-2}}$$

Tolle Gleichung ??? Leicht zu verstehen???

Interpoliert super, aber die Parameter sind „beliebig“ oder auch „sch...e“



Ok, dann vereinfachen wir: die Hoh - Gleichung

$$r = r_{Max} \frac{(S - P/K)}{(k_m + (S + P/K))}$$

Super, nur noch 3 Parameter

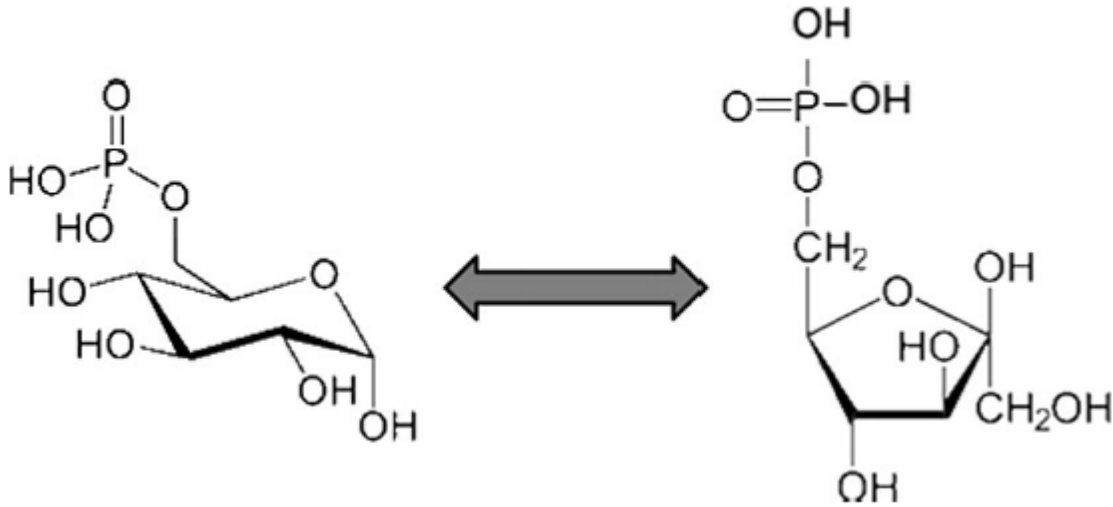
Massenbilanz

$$P = S^0 - S$$

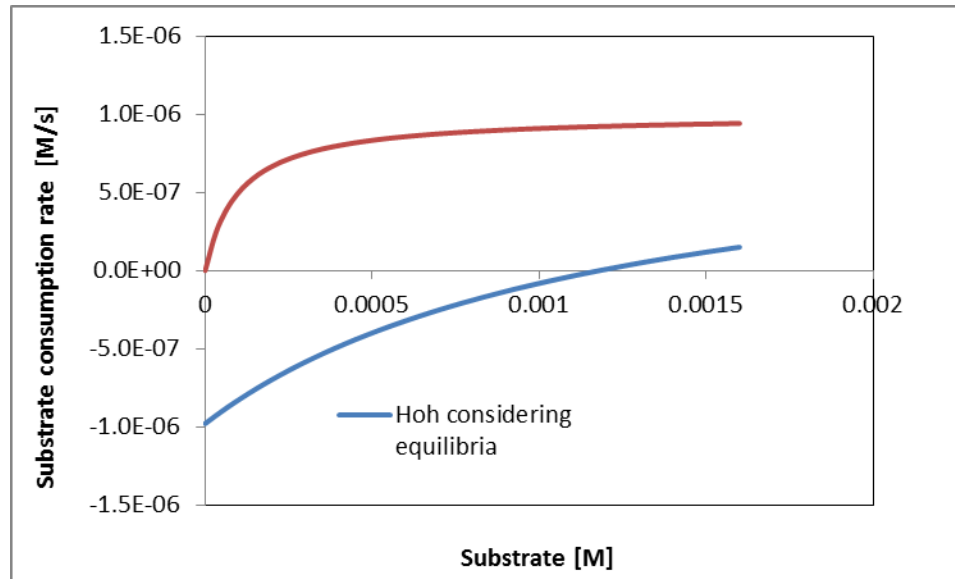
$$r = r_{Max} \frac{(S - (S^0 - S)/K)}{(k_m + (S + (S^0 - S)/K))}$$

für $S=S^0$

$$r = r_{Max} \frac{(S)}{(k_m + S)}$$



$$r = r_{Max} \frac{(S)}{(k_m + S)}$$



$$r = r_{Max} \frac{(S - (S^0 - S)/K)}{(k_m + (S + (S^0 - S)/K))}$$

Ein Geschwindigkeitsgesetz mit separaten Faktoren (Noor, 2014)

Halbthermodynamisches Modell

$$r = V^+ \cdot \kappa \cdot \gamma$$

V^+ = Kapazitätsterm

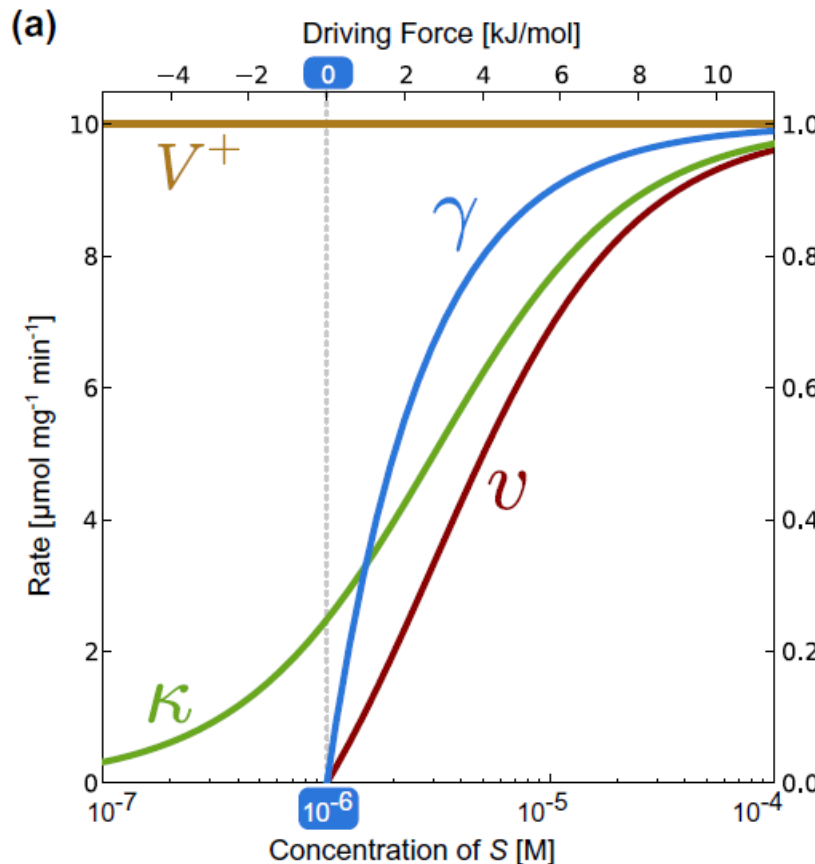
κ = Sättigungsterm

γ = Thermodynamischer Term

$$V^+ = E_0 \cdot k_{cat}^+$$

$$\kappa = \frac{S/K_S}{1+S/K_S+P/K_P}$$

$$\gamma = 1 - e^{\Delta_r G/R \cdot T}$$



$$\Delta_r G = \Delta_r G^0 + R \cdot T \cdot \ln \prod_{i=1}^n a_i^{\nu_i}$$

$$\Delta_r G^0 = 0$$

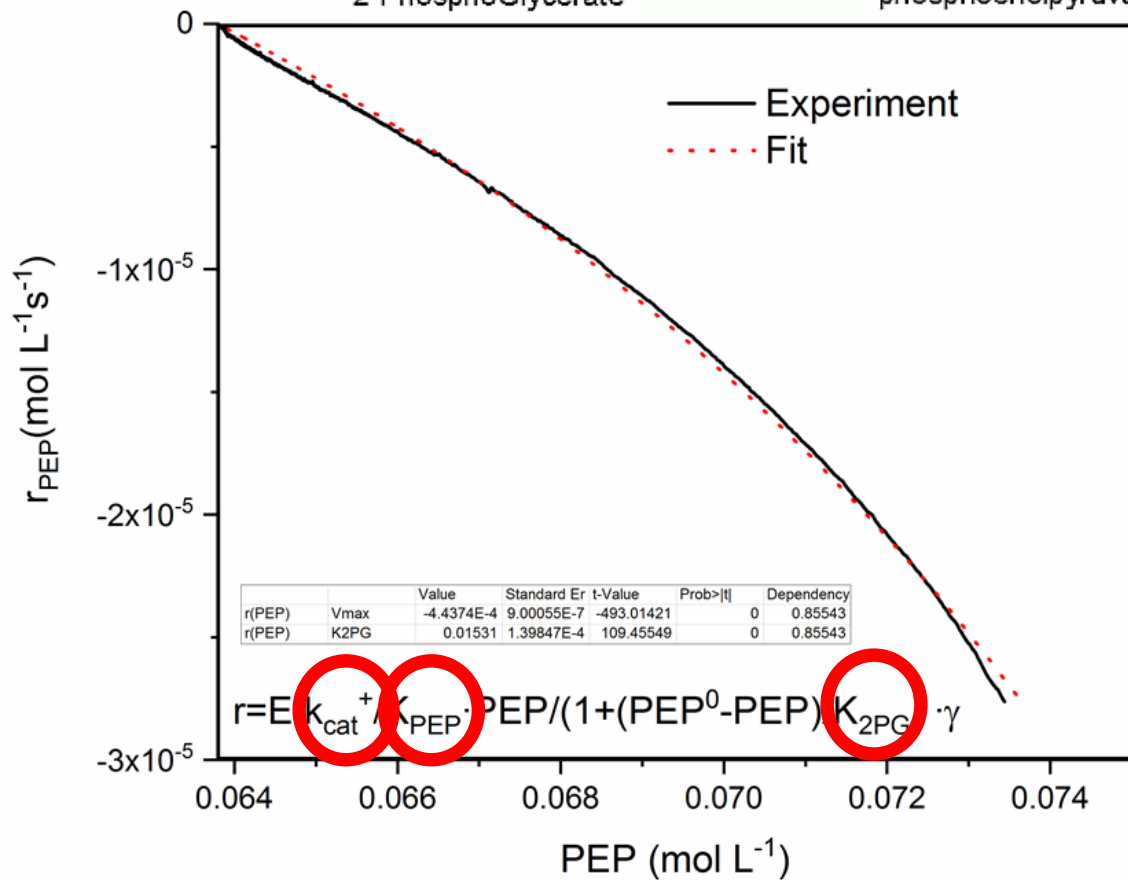
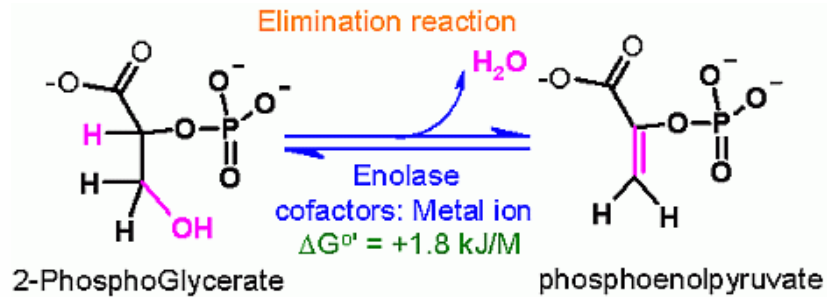
für

$$S = 1 \mu\text{M}$$

**Im schlimmsten Fall
3 Parameter**

E. Noor, A. Flamholz, W. Liebermeister, A. Bar-Even, R. Milo (2013) A note on the kinetics of enzyme action: A decomposition that highlights thermodynamic effects. FEBS Letters 587: 2772-2777

Anwendungsbeispiel



Klappt prima
mit 3
Parameter

Flux-Force-Relationships

Triebkraftkonzepte

$$\frac{r^+}{r^-} = e^{-\Delta_r G / R \cdot T}$$

$$r = r^+ - r^-$$

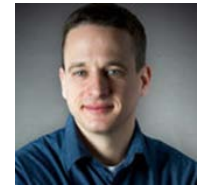
$$\frac{r}{r^+} = \frac{r^+ - r^-}{r^+} = 1 - \frac{r^-}{r^+} = 1 - e^{-\Delta_r G / R \cdot T} = \gamma$$



Westerhoff

Annahme das die Summe der Raten von Hin- und Rückreaktion
Der Triebkraft proportional ist:

$$r^+ + r^- = k \cdot E'$$



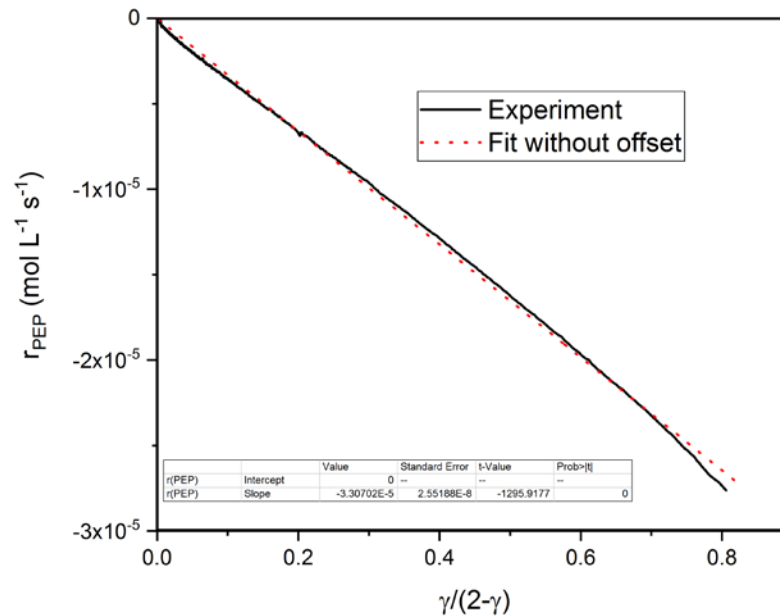
Beard

$$\frac{r}{r^+ + r^-} = \frac{1 - \frac{r^-}{r^+}}{1 + \frac{r^-}{r^+}} = \frac{1 - e^{-\Delta_r G / R \cdot T}}{1 + e^{-\Delta_r G / R \cdot T}} = \frac{\gamma}{2 - \gamma}$$

Folgt: $r = k \cdot E \cdot \frac{\gamma}{2 - \gamma}$

Super: nur ein Parameter

Wie gut funktioniert es?



Yippee: nur noch ein Parameter und trotzdem guter Fit