

**EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN**  
Wilhelm-Schickard-Institut für Informatik  
Lehrstuhl Rechnerarchitektur

**Diplomarbeit**

**Automatische Generierung  
kinetischer Gleichungen aus  
Stöchiometrien**

Nadine Hassis

**Betreuer:** Prof. Dr. rer. nat. habil. Andreas Zell  
Wilhelm-Schickard-Institut für Informatik

Prof. Dr. -Ing. Oliver Kohlbacher  
Wilhelm-Schickard-Institut für Informatik

**Begonnen am:** 01. Februar 2007

**Beendet am:** 6. August 2007

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, diese Arbeit selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen benutzt zu haben.

Tübingen am 6. August 2007

---

Nadine Hassis

**Kurzfassung.** Durch die Fülle an neu gewonnenen Informationen auf dem Gebiet der Systembiologie, wird der Bedarf zur Modellierung dieser komplexer Daten immer größer. Um biochemische, genregulatorische und metabolische Netzwerke modellieren zu können, eignen sich eine Vielzahl von bekannten und erprobten mathematischen Modellen. So einfach die Handhabung der mathematischen Modelle im einzelfall ist, so komplex wird diese Aufgabe mit steigender Größe und Komplexität der Netzwerke. Sollen die mathematischen Funktionen für jede einzelne Reaktion manuell von Hand erstellt werden, bedarf dies viel Zeit und Ressourcen. Um Fehler bei der Erzeugung zu vermeiden, ist eine automatische Generierung der mathematischen Modelle zu den gegebenen Netzwerken von Vorteil. An diesem Problem setzt diese Arbeit an. Signaltransduktions-, Genregulations- und metabolische Netzwerke lassen sich mit Hilfe von kinetischen Gleichungen in zeitdynamische Modelle überführen. Diese kinetischen Gleichungen beruhen auf der zeitlichen Änderung der Reaktionspartner einer Reaktion und den sich daraus ergebenden Differentialgleichungen, den Stöchiometrien und dem zu Grunde liegenden Reaktionsmechanismus der entsprechenden Reaktion. Das mathematische Modell basiert auf dem Massenwirkungsgesetz (MWG), sowie enzymkinetischen Reaktionsgesetzen. Das Ziel dieser Arbeit ist die Implementation eines Softwaretools, dass zur Erstellung von automatisierten Reaktionskinetiken für biochemische Netzwerke das weit verbreitete SBML-Format benutzt. Das entwickelte Softwaretool SBMLsqueezer wurde als Plugin für den CellDesigner 4.0  $\alpha$  entwickelt, um die Vorteile der graphischen Darstellung von Netzwerken und die Speicherung der Daten im SBML-Format nutzen zu können. Zur mathematischen Darstellung der Kinetiken wurden verschiedene Modelle implementiert und getestet.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die durch Ihre fachliche und persönliche Unterstützung zu dieser Diplomarbeit geführt haben, insbesondere:

- **Prof. Dr. Andreas Zell** für die Betreuung sowie die Bereitstellung der notwendigen Ressourcen und Räumlichkeiten für diese Arbeit.
- **Prof. Dr. Oliver Kohlbacher** für seine hilfreichen Tipps sowie die Bereitschaft, die Arbeit als Zweitgutachter zu betreuen.
- **Dipl.-Bioinform. Andreas Dräger** für die fachliche Hilfe und technische Unterstützung in allen Bereichen dieser Diplomarbeit.
- **Dipl.-Inform. Jochen Supper und Dipl.-Inform. Adrian Schröder**, für die anregenden Diskussionen und Bereitstellung der biochemischen Testdaten.
- **für das Korrekturlesen:** René, Simon und Andreas.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium durch ihre Unterstützung ermöglicht haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Grundlagen der biochemischen Modellierung</b>	<b>3</b>
2.1. Systembiologie . . . . .	3
2.1.1. Modellentwicklung und Wissensbildung in der Systembiologie . . . . .	3
2.2. Einführung in die Enzymkinetik . . . . .	6
2.2.1. Enzyme . . . . .	6
2.2.2. Enzymkinetik . . . . .	7
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>9</b>
3.1. Darstellung von Modellen durch mathematische Gleichungen . . . . .	9
3.1.1. Erstellung eines Differentialgleichungs-Systems für ein biochemisches Modell . . . . .	9
3.2. Reaktionsordnungen . . . . .	11
3.2.1. Reaktionen nullter Ordnung . . . . .	11
3.2.2. Reaktionen erster Ordnung . . . . .	11
3.2.3. Reaktionen zweiter Ordnung . . . . .	13
3.2.4. Reaktionen dritter Ordnung . . . . .	13
3.3. Mathematische Modelle . . . . .	14
3.3.1. Massenwirkungskinetik (MAK) . . . . .	14
3.3.2. Generalisierte Massenwirkungskinetik (gMAK) . . . . .	15
3.3.3. Michaelis-Menten-Gleichung . . . . .	15
3.3.4. Bi-Bi-Reaktionsmechanismen . . . . .	19
3.3.5. Herleitung der Bi-Uni-Reaktionsmechanismen mit der King-Altman-Methode . . . . .	22
3.3.6. Convenience Kinetik . . . . .	30
3.3.7. Aktivierung und Inhibition von Enzymreaktionen . . . . .	31
3.3.8. Zusammenfassung . . . . .	31
3.4. CellDesigner 4.0 $\alpha$ . . . . .	34
3.5. Cellerator . . . . .	37
3.6. Die Systems Biology Markup Language (SBML) . . . . .	38
3.6.1. Versionen von SBML . . . . .	38
3.6.2. Aufbau eines SBML-Modells . . . . .	40
3.7. LibSBML . . . . .	44
3.7.1. SBML-Klassen in LibSBML . . . . .	44
3.7.2. Zugriff und Manipulation auf Datenstrukturen . . . . .	44
3.7.3. Einfaches Beispiel in Java . . . . .	47
3.8. PluginLibSBML . . . . .	47
3.8.1. Integration des SBMLsqueezers in den CellDesigner . . . . .	48
3.9. Experimentelle Testnetzwerke . . . . .	52
3.9.1. Grundlegende Reaktionskomponenten . . . . .	52

3.9.2.	Modell 2: T-Zell-Signaltransduktionsnetzwerk . . . . .	53
3.9.3.	Modell 3: Glykolysenetzwerk <i>Escherichia coli</i> . . . . .	55
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
4.1.	SBMLsqueezer . . . . .	57
4.1.1.	Aufbau und Funktionalität . . . . .	57
4.1.2.	Graphisches Benutzerinterface . . . . .	57
4.2.	Automatisches Erzeugung von Kinetiken . . . . .	64
4.2.1.	Modell 1: Grundlegende Reaktionskomponenten . . . . .	64
4.2.2.	Modell 2: T-Zell-Signaltransduktionsnetzwerk . . . . .	66
4.2.3.	Modell 3: Glykolysenetzwerk . . . . .	66
4.2.4.	Vergleich des SBMLsqueezers mit dem Cellerator . . . . .	69
4.3.	Beschränkungen und Probleme bei der Verwendung des SBMLsqueezers . . . . .	70
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>71</b>
5.1.	Zusammenfassung . . . . .	71
5.2.	Ausblick . . . . .	71
<b>A.</b>	<b>Ergebnistabellen zu Modell 2</b>	<b>73</b>
<b>B.</b>	<b>Ergebnistabellen zu Modell 3</b>	<b>78</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>

# 1. Einleitung

Die Systembiologie ist eine interdisziplinäre Wissenschaft, welche erst in den letzten Jahren durch verbesserte Rechenleistungen und Speichermöglichkeiten auf Seiten der Computertechnologie bei gleichzeitig steigender biologischer Datenmenge zunehmend an Bedeutung gewann. Sie befasst sich mit dem Verständnis und der Erforschung von Zusammenhängen komplexer biologischer Netzwerke. Zu den beobachteten Netzwerken gehören Signaltransduktions-, Genregulations- und metabolische Netzwerke. Ziel der Systembiologie ist es, mit Hilfe eines computerbasierten mathematischen Modells biologische Mechanismen und Vorgänge möglichst genau wiederzugeben, und somit *in silico* zu simulieren.

Metabolische Netzwerke werden erstellt, um das Zusammenspiel der biochemischen Reaktionen einzelner Zellen bis hin zu ganzen Organismen als Fernziel darzustellen. Die zeitlichen Verläufe und Änderungen der Konzentrationen der einzelnen Reaktanden in Reaktionen werden durch kinetische Gleichungen dargestellt. Diese kinetischen Gleichungen beruhen auf den nichtlinearen gewöhnlichen Differentialgleichungen (*ODE=ordinary differential equation*) der einzelnen Reaktanden jeder Reaktion. Gewöhnliche Differentialgleichungen basieren auf den zu Grunde liegenden Konzentrationen der Reaktanden und somit auch auf deren Stöchiometrien, also der Menge der Reaktionspartner. Grundlage für die Erzeugung der entsprechenden Kinetiken ist das Massenwirkungsgesetz, aus dem die Massenwirkungskinetik hergeleitet werden kann. Die Massenwirkungskinetik lässt sich auch auf enzymkatalysierte Reaktionen erweitern.

Der CellDesigner ist ein mächtiges, weitverbreitetes und nach der Klipp'schen Umfrage [EK] auch das mit Abstand wichtigste Werkzeug, das dem Benutzer ermöglicht, ein biochemisches Netzwerk zu erzeugen, indem eine Auswahlmöglichkeit an verschiedenen Reaktanden und Reaktionen zur Verfügung gestellt wird. Neben der graphischen Modellierung des Netzwerkes lassen sich den einzelnen Reaktionen auch Kinetiken anfügen. Das manuelle Erzeugen von Kinetiken und den dazugehörigen Reaktionsparametern ist jedoch insbesondere bei großen Netzwerken sehr zeitaufwändig und komplex, sodass eine Automatisierung sinnvoll und notwendig erscheint. Der CellDesigner bietet diese Funktion jedoch nicht. Der Cellerator hingegen ist ein Softwarepaket, das auf Mathematica basiert und eine automatische Generierung in beschränktem Maße zulässt. Da jedoch weder CellDesigner noch Cellerator die gewünschte Funktionalität in vollem Umfang bereitstellen, ist das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung eines Plugins für den CellDesigner 4.0 $\alpha$ .

Nach einer Einführung in die biochemischen und mathematischen Grundlagen und Methoden werden Darstellung, Funktionalität und Vorgehensweise zur Entwicklung des Programms SBMLsqueezers als Plugin für den CellDesigner 4.0 $\alpha$  beschrieben. Anschließend wird das Plugin mit dem Cellerator, einer Software die ebenfalls Kinetiken automatisch erzeugt, verglichen.

## Kapitelübersicht

### Kapitel 2 Grundlagen

In diesem Kapitel werden die notwendigen Grundlagen, die zum Verständnis dieser Diplomarbeit notwendig sind vermittelt. Nach einem Überblick über systembiologische Netzwerke im Allgemei-

nen wird in Kapitel 2.1.1 der Prozess der Wissensgenerierung und Prinzipien und Zielsetzungen des systembiologischen Modellierungsansatzes verdeutlicht. Anschließend wird in Abschnitt 2.2.2 auf die Enzymkinetik eingegangen.

### **Kapitel 3 Material und Methoden**

Kapitel 3 dieser Diplomarbeit widmet sich zunächst den theoretischen Grundlagen der dynamischen Modellierung. Nach einem Überblick über die Reaktionsordnungen in Abschnitt 3.2 werden die mathematischen Grundlagen der einzelnen implementierten Modelle für Enzymreaktionen besprochen. Beginnend mit der Herleitung der Michaelis-Menten-Kinetik wird die *Bi-Bi*-Kinetik eingeführt. Anschließend wird die *Bi-Uni*-Kinetik mit Hilfe der *King-Altman*-Methode entwickelt. Abschließend wird noch die *Convenience*-Kinetik betrachtet.

Im Anschluss werden ab Abschnitt 3.4 die Programme und Hilfsmittel vorgestellt, die im Rahmen der Entwicklung des SBMLsqueezer-Plugins verwendet wurden. Neben der Java-basierenden Modellierungssoftware CellDesigner 4.0 $\alpha$  und dem Cellerator wird auf das Systembiologie-Datenformat SBML eingegangen. Weiterhin werden programmiertechnische Methoden für die Verwendung von libSBML und des pluginLibSBML-Interfaces erläutert.

Außerdem enthält das Kapitel eine Beschreibung der biochemischen Beispielmodelle, mit denen das entwickelte Plugin getestet wurde.

### **Kapitel 4 Ergebnisse**

Dieses Kapitel beschreibt den Aufbau und die Funktionalität des entwickelten SBMLsqueezer-Plugins. Anschließend werden die in Kapitel 4 vorgestellten biochemischen Modelle getestet und die Ergebnisse vorgestellt.

### **Kapitel 5 Diskussion**

Hier werden die Ergebnisse aus Kapitel 4 besprochen, und etwaige Unterschiede zu manuell bzw. von anderer Software generierten Kinetiken diskutiert.

### **Kapitel 6 Zusammenfassung und Ausblick**

Im letzten Kapitel wird ein kurzer Ausblick über mögliche und sinnvolle Erweiterungen des entwickelten Programms gegeben.



## 2. Grundlagen der biochemischen Modellierung

### 2.1. Systembiologie

Durch aktuelle Forschungen und neuer, erfolgreicher Methoden bei der Analyse von Genexpression und Proteinfunktion durch moderne Hochdurchsatzverfahren, die bis zu 2000 Basen pro Sekunde sequenzieren können, kam es in den letzten Jahren zu einer Fülle von Informationen im Bereich der biologischen Systeme [Rei02]. Die damit befüllten Datenbanken enthalten eine umfangreiche Datenmenge über Sequenzdaten, Stoffwechsel- und Regulationswege unterschiedlicher Organismen. Tabelle 2.1 gibt einen Eindruck über die Komplexität und Menge an Informationen eines einzelnen Bakteriums.

Art	Anzahl Moleküle	Anzahl Molekültypen
Proteine	2 360 000	1000 bis 2000
kleine Moleküle	mehrere Millionen	50
RNA	270 000	5
Ionen	mehrere Millionen	20 bis 30

Tabelle 2.1.: Komplexität einer *Escherchia Coli* Zelle [Sau05].

Um diese Vielzahl von Daten in nutzbar zu machen, sodass neue Informationen erhalten werden können, ist ein Zusammenspiel unterschiedlicher Forschungsdisziplinen aus der Biologie, Informatik und den Systemwissenschaften notwendig, das letztendlich zur neuen Wissenschaftsdisziplin Systembiologie führt (Abbildung 2.1).

Mit Hilfe systembiologischer Modelle und Simulationen werden die ermittelten Daten in einen Zusammenhang zueinander gebracht, um weitere detaillierter Informationen über die Funktionsweise zellulärer Systeme zu erhalten. Die Systembiologie untersucht also das Verhalten und die Wechselwirkung aller Elemente in einem funktionierenden biologischen System [TI01]. Die Größe und der Detailgrad der Modelle kann sich dabei sehr unterscheiden. So gibt es relativ kleine Modelle, die sich nur auf zelluläre Netzwerke beschränken, bis hin zu Netzwerken, die ganze Organe, Gewebe und Organismen modellieren. Die aus diesen Modellen gewonnenen Informationen können nicht nur großen Nutzen in der Erforschung von Funktionsweisen der einzelnen Organismen liefern, sie ermöglichen auch Fortschritte in Medizin und Pharmakologie.

#### 2.1.1. Modellentwicklung und Wissensbildung in der Systembiologie

Nach [Rei02] lässt sich der Prozess der Wissensgenerierung iterativ darstellen (Abbildung 2.2). Im Vordergrund der Modellentwicklung steht immer die biologische Fragestellung bzw. das biologische Phänomen, das untersucht wird. Ist anschließend festgelegt worden, welches System untersucht wird (Organismus, Zelltyp, Funktionseinheit), sowie welche experimentellen Daten zur Modellierung des Systems verwendet werden, müssen Informationen über Strukturen, Interaktionen und Funktionen zusammengetragen werden, ehe im iterativen Prozess vorangeschritten werden kann.

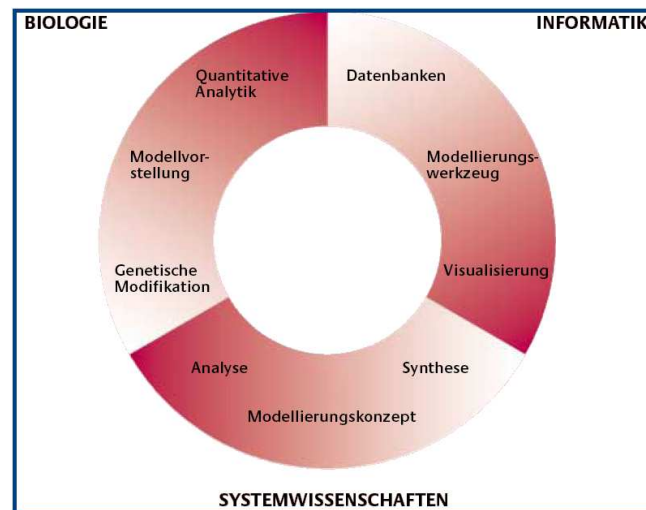


Abbildung 2.1.: Einzeldisziplinen, welche die Systembiologie prägen [Rei02].

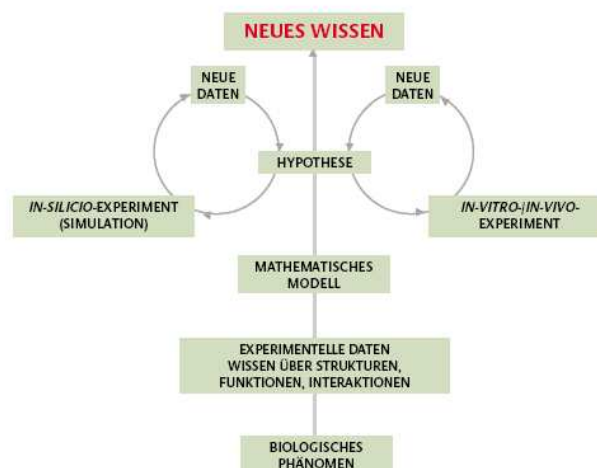


Abbildung 2.2.: Ablaufdiagramm der Wissensbildung [Rei02].

Nach [Kit00] sind es vier Schlüsselcharakteristika, die näher untersucht werden müssen:

- **Systemstrukturen**, also die einzelnen Elemente des biologischen Systems sowie die interstrukturellen Beziehungen zueinander.
- **Systemdynamik**, das Verhalten des Systems im zeitlichen Verlauf unter verschiedenen internen und externen Umweltbedingungen.
- **Systemkontrolle**, d.h. die Elemente die das System kontrollieren und deren Wirkungsmechanismus muss verstanden bzw. untersucht werden.
- **Konstruktionsprinzipien** des vorliegenden biologischen Systems sollte erkannt und zur Systemanalyse benutzt werden.

Der nächste Schritt ist die Bildung eines geeigneten mathematischen Modells bzw. Formalismus. Auch muss der Detaillgrad des Modells festgelegt werden. Je höher der Detailgrad, desto spezieller ist das Modell; je niedriger, desto höher der Abstraktionsgrad. Systembiologische Modellierungsansätze lassen sich grundsätzlich in zwei Klassen einteilen: Stochastische und deterministische Ansätze [MUW06]. Statistische Modellierungsansätze gehen von einem zeitdiskreten Zustandsraum aus, weswegen Reaktionen in Form von Übergängen zwischen Zuständen modelliert werden und besitzen eine Übergangswahrscheinlichkeit. Mit Hilfe des *Gillespie*-Algorithmus oder der *Bayes*-Netze können stochastische Modelle simuliert werden. Stochastische Ansätze gehen von einem endlichen Reaktionsvolumen und einer heterogenen Verteilung der Moleküle aus. Im Gegensatz dazu werden im deterministischen Modellierungsansatz Reaktionen als kontinuierliche Materialübergänge angesehen. Hier kann zwischen verschiedenen auf Differentialgleichungen basierenden Ansätzen wie speziellen, gewöhnlichen oder partiellen Differentialgleichungen zur Modellierung zurückgegriffen werden. Ausgehend von den Anfangskonzentrationen sowie den kinetischen Parametern kann folglich der dynamische Verlauf der Konzentrationen der einzelnen Reaktionspartner über die Zeit verfolgt werden. Der deterministische Ansatz geht von drei Annahmen aus, einem großen Reaktionsvolumen, einer homogenen Verteilung der Moleküle sowie von einem Gleichgewichtszustand der Reaktionen [Cen02]. Weiterhin wird vereinfachend davon ausgegangen, dass sich die Reaktanden in einem Fließgleichgewicht (*steady state*) befinden. Auf das Fließgleichgewicht wird in Kapitel 3.3 bei der Michaelis-Menten-Kinetik eingegangen.

Wurde ein geeignetes Modell gefunden, das die Frage-, bzw. Problemstellung hinreichend zu beantworten vermag, so können aus diesem Modell Hypothesen zur Systemeigenschaft abgeleitet und damit neues Wissen erlangt werden. Die Hypothesen müssen allerdings vorher *in silico* und *in vivo* validiert werden. Es bietet sich an, die *in silico* und *in vivo* Kreisläufe nicht parallel, sondern sequentiell durchzulaufen, da sich mit Hilfe von *in silico*-Simulationen verschiedene experimentelle Parameter in der Regel sowohl kosten- als auch zeitgünstiger testen lassen. Weiterhin sind mit Hilfe eines Modells ‚Worst-Case‘-Szenarien unter verschiedenen Bedingungen bestimmbar, die in der Natur nicht oder mit selten Parametern vorkommen. Wurde eine sinnvolle Einschränkung der Parameter durch die computerbasierte Simulation getroffen bzw. das experimentelle Design optimiert, so sind im nächsten Schritt lediglich die tatsächlichen biologischen Experimente durchzuführen (Abbildung 2.2) [Bos94].

Diese Diplomarbeit setzt beim dritten Schritt des iterativen Wissensgenerierungsprozesses nach [Rei02] ein, der Modellbildung. Ausgehend von biochemischen Reaktionen in Form eines Reaktionsnetzwerkes müssen zunächst geeignete mathematische Modelle gefunden bzw. erzeugt werden. Dies erfolgt in Kapitel 3.3. Das nachfolgende Kapitel 2.2 ist eine kurze Einführung in die hierbei relevanten biochemischen Reaktionen, die Enzymreaktionen.

## 2.2. Einführung in die Enzymkinetik

Die folgenden Abschnitte beschreiben die biochemischen Grundlagen von Enzymreaktionen und Enzymkinetiken.

### 2.2.1. Enzyme

Unter den in Biosystemen herrschenden Bedingungen bezüglich Druck und Temperatur würden Stoffumsätze nur sehr langsam ablaufen, wenn die entsprechenden Reaktionen nicht katalysiert werden würden. In biologischen Systemen übernehmen bis auf wenige Ausnahmen Enzyme diese Aufgabe. Enzyme sind Proteine oder Ribozyme, die die Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor  $10^8$  bis  $10^{20}$  im Vergleich zur nichtkatalysierten Reaktion beschleunigen können und dabei nicht die Gleichgewichtslage der Reaktion verändern [GL03].

Theoretisch ist eine enzymatische Umsetzung reversibel. Sämtliche Produkte können wieder in die Ausgangsstoffe umgewandelt werden. Die Ausgangsstoffe (Substrat S) einer Enzymreaktion werden im so genannten aktiven Zentrum, meist einer Vertiefung an der Enzymoberfläche, des Enzyms (E) gebunden. Eine bestimmte Raumstruktur des aktiven Zentrums kann bewirken, dass nur ein strukturell passendes Substrat in Kontakt treten kann. Veranschaulicht passt ein bestimmtes Substrat zum entsprechenden Enzym wie ein Schlüssel in das zugehörige Schloss (*Schlüssel-Schloss-Prinzip*). Dies ist eine Ursache für die hohe Substratspezifität der Enzyme. Neben dem *Schlüssel-Schloss-Modell* existiert das flexible *Induced-fit-model*: Da Enzyme flexible Strukturen sind, kann das aktive Zentrum durch Interaktion mit dem Substrat neu geformt werden. Ist das Substrat nun im aktiven Zentrum gebunden, bildet sich ein Enzym-Substrat-Komplex (ES, siehe Formel 2.1).



Das Enzym ermöglicht nun die Umwandlung der Substrate in das Enzymproduktkomplex (EP). Das Produkt (P) wird anschließend aus dem Komplex freigesetzt (E+P). Nach der Reaktion liegt das Enzym wieder in der Ausgangsform vor. Die erwähnte starke Beschleunigung der Reaktion erfolgt, da die Aktivierungsenergie  $\Delta G^\ddagger$  (freie Aktivierungsenthalpie) im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion heabgesetzt wird. Dies geschieht durch eine Stabilisierung des Übergangszustandes (siehe Abbildung 2.3). Die freie Reaktionsenthalpie unter biologischen Standartbedingungen  $\Delta G^{o'}$  dagegen bleibt unverändert.

Die der katalytischen Reaktion zu Grunde liegenden Mechanismen sind vielfältig, dennoch nutzen Enzyme meist eine oder mehrere der folgenden Strategien:

- **Säure-Base-Katalyse:** Aminosäurereste reagieren als Säure oder Base. Sie nehmen Protonen ( $H^+$ -Ionen) auf oder geben sie ab.
- **Kovalente Katalyse:** Aminosäurereste oder Koenzyme gehen Kovalente Bindungen mit einem Substrat ein und bilden ein Intermediat. Oft sind Koenzyme wie Pyridoxalphosphat beteiligt.
- **Metallionen Katalyse:** Metallionen wie Kupfer-, Eisenionen oder Lewis-Säuren (Zinkionen) unterstützen die Katalyse als strukturerhaltende bzw. stabilisierende Koordinationszentren oder schirmen vor negativen Ladungen ab.
- **Orientierung / Annäherung:** Durch Bindung beispielsweise zweier Substrate können diese in einer günstigeren Orientierung in Kontakt treten.

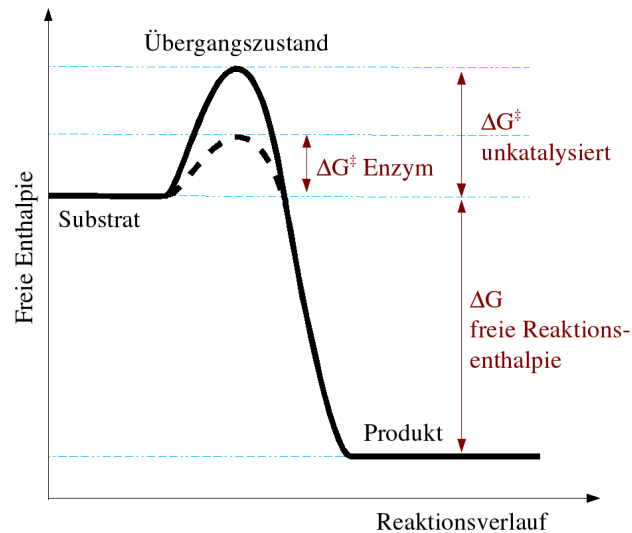


Abbildung 2.3.: Energiediagramm einer enzymatisch katalysierten Reaktion.

### 2.2.2. Enzymkinetik

Für das Verständnis der katalytischen Wirkung von Enzymen ist die Kenntnis über die Faktoren wichtig, welche die Reaktionsgeschwindigkeit chemischer Reaktionen steuern. Die Reaktionsgeschwindigkeit einer chemischen Reaktion zeigt an, wieviele Teilchen pro Zeiteinheit umgesetzt werden. Primär hängt die Reaktionsgeschwindigkeit von der Stoffkonzentration der Reaktionsteilnehmer ab. Dies ergibt sich bereits aus der Überlegung, dass Enzym und Substrat einen Komplex bilden.



Bei hohen Substratkonzentrationen ist die Anfangsgeschwindigkeit proportional zur Enzymkonzentration  $E$  (Gleichung 2.2). Neben den Reaktionsbedingungen wie Temperatur, Salzkonzentration und pH-Wert der Lösung, hängt sie von den Konzentrationen des Enzyms, der Substrate und Produkte sowie von Effektoren (Aktivatoren oder Inhibitoren) ab. Im Zusammenhang mit der Reaktionsgeschwindigkeit steht die Enzymaktivität. Sie gibt an, wieviel aktives Enzym sich in einer Enzympräparation befindet.

Die gemessene Enzymaktivität ist proportional zur Reaktionsgeschwindigkeit und damit stark von den Reaktionsbedingungen abhängig. Sie steigt mit der Temperatur entsprechend der RGT-Regel an: eine Erhöhung der Temperatur um ca. 5-10 °C führt zu einer Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit und damit auch der Enzymaktivität. Dies gilt jedoch nur für einen begrenzten Temperaturbereich. Bei Überschreiten einer optimalen Temperatur kommt es zu einem steilen Abfallen der Aktivität durch Denaturierung des Enzyms [GL03].

Änderungen im pH-Wert der Lösung haben meist einen starken Effekt auf die Enzymaktivität:

- Bei zu hohem oder extrem niedrigen pH-Wert wird das Enzymprotein denaturiert.
- Der Dissoziationsgrad der funktionellen Gruppen des Enzyms und des Substrates ändert sich mit dem pH-Wert

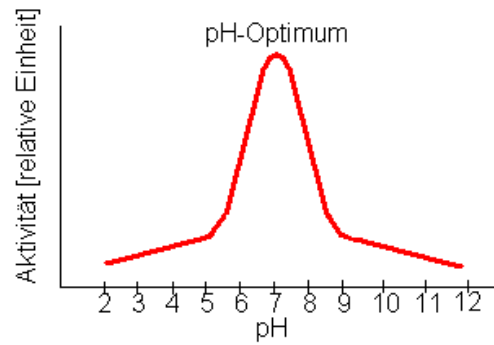


Abbildung 2.4.: Einfluss des pH-Wertes auf die Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms

Jenseits des pH-Optimums vermindert sich die Enzymaktivität und kommt irgendwann zum Erliegen (Abbildung 2.4). Diese Betrachtung kann in ähnlicher Weise ebenfalls für die Salzkonzentration und die Ionenstärke in der Umgebung angewandt werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Darstellung von Modellen durch mathematische Gleichungen

Zur Darstellung von Modellen durch mathematische Gleichungen werden Kinetiken benutzt, deren grundlegende Größe die Reaktionsgeschwindigkeit ist. Die Reaktionsgeschwindigkeit einer chemischen Reaktion zeigt an, wieviele Teilchen pro Zeiteinheit umgesetzt werden. Der wichtigste Faktor bei der Erstellung gewöhnlicher Differentialgleichungen, die diesen Teilchenverlauf darstellen, ist die Konzentration der vorliegenden Stoffe. Denn je mehr Teilchen in einem Volumen vorkommen, um so mehr Kollisionen pro Zeiteinheit für den Stoff kommen zustande. Da es auch nur zur Reaktionen kommen kann, wenn zwei Teilchen miteinander kollidieren, ist die Reaktionsgeschwindigkeit abhängig von den Konzentrationen der beteiligten Stoffe.

#### 3.1.1. Erstellung eines Differentialgleichungs-Systems für ein biochemisches Modell

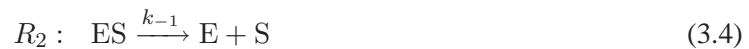
Um ein biochemisches Netzwerk in Form von gewöhnlichen Differentialgleichungen abbilden zu können, müssen einige Schritte durchlaufen werden. Diese Vorgehensweise wird an einem einfachen Beispiel, einer Enzymreaktion, dargestellt [HS96].



Dieses einfache Modell lässt sich mit:

$$R_j : \sum_{i=1}^D l_{ij} X_i - \sum_{i=1}^D r_{ij} X_i \quad j = 1, \dots, M \quad (3.2)$$

in Elementargleichungen zerlegen



Wobei:  $D$ : Anzahl aller Reaktanden  $M$ : Anzahl aller Reaktionen  $X_i$ :  $i$ -ter Reaktand  $R_j$ :  $j$ -te Elementarreaktion  $l_{ij}$ ,  $r_{ij}$ : Stöchiometrische Koeffizienten  $k_j$ : Geschwindigkeitskonstante der Reaktion  $R_j$ .

Die stöchiometrischen Koeffizienten sind positive ganze Zahlen. Nimmt ein Reaktand an einer Reaktion nicht teil, ist der stöchiometrische Koeffizient für diese Elementarreaktion null. Die stöchiometrischen Koeffizienten  $l_{ij}$  und  $r_{ij}$  lassen sich zu

$$n_{ij} = \begin{cases} -l_{ij} & \text{wenn } X_i \text{ Edukt in } R_j \text{ ist} \\ +r_{ij} & \text{wenn } X_i \text{ Produkt in } R_j \text{ ist} \\ 0 & \text{ansonsten} \end{cases} \quad (3.6)$$

zusammenfassen. Die Konzentrationsverläufe der einzelnen Reaktanden lassen sich so ausdrücken:

$$\frac{dx_i}{dt} = \sum_{j=1}^M n_{ij} v_j. \quad (3.7)$$

$v_j$  steht für die dem Reaktionsmechanismus von  $R_j$  entsprechende Reaktionsgeschwindigkeit und  $x_i$  steht für die molare Konzentration des entsprechenden Reaktanden. Nach dem Gesetz der Massenerhaltung lassen sich die Beiträge der einzelnen Reaktionen summieren. Somit kann Gleichung 3.7 in Matrixnotation geschrieben werden:

$$\frac{dX}{dt} = \mathbf{N}\mathbf{v}, \quad (3.8)$$

wobei  $\mathbf{N} = n_{ij}]_{D \times M}$  die stöchiometrische Matrix darstellt. In diesem Beispiel lautet die stöchiometrische Matrix wie folgt:

$$N = \begin{bmatrix} -1 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & 0 \\ 1 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.9)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeiten für die Elementarreaktionen sehen so aus:

$$v_1 = k_1[E][S] \quad (3.10)$$

$$v_2 = k_{-1}[ES] \quad (3.11)$$

$$v_3 = k_2[ES]. \quad (3.12)$$

Durch Einsetzen in Gleichung 3.8 ergibt sich folgendes System von gewöhnlichen Differentialgleichungen:

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (3.13)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] \quad (3.14)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = +k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (3.15)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]. \quad (3.16)$$

Die vorgestellte Vorgehnsweise lässt sich nicht nur mit Elementarreaktionen vollziehen, es können auch die komplexeren Kinetiken für bestimmte Reaktionsmechanismen benutzt werden.



## 3.2. Reaktionsordnungen

Als Voraussetzung zum Verständnis kinetischer bzw. enzymkinetischer Gesetze wird zuerst auf die Reaktionsordnung chemischer Gleichungen eingegangen und diese erläutert.

Die chemische Reaktionsordnung setzt sich aus den Potenzen der Konzentrationen der einzelnen Komponenten der Reaktionsgleichung zusammen. So ist eine Reaktion:



insgesamt dritter Ordnung bezüglich der Hinreaktion, jedoch nur erster Ordnung bezüglich der Rückreaktion. In Bezug auf Stoff A besteht zweite Ordnung und bei Stoff B und P jeweils erste Ordnung.

### 3.2.1. Reaktionen nullter Ordnung

Reaktionen, die unter die nullte Ordnung fallen, sind unabhängig von der Konzentration ihrer Reaktanden:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k. \quad (3.18)$$

Durch Integration dieser Gleichung nach der Zeit ergibt sich eine lineare Abhängigkeit:

$$[A]_t = [A]_0 - k_1 t. \quad (3.19)$$

Das Merkmal dieser Reaktionen ist, dass die Abnahme des Ausgangsstoffes bzw. die Zunahme des Produktes linear mit der Zeit erfolgt (Zeit-Umsatz-Kurve in Abbildung 3.1).

Ob Reaktionen nullter Ordnung sind, ist daher nicht durch die Anzahl der Reaktanden bestimmt, sondern ob an dieser Reaktion ein Katalysator beteiligt ist, der im Gegensatz zu den anderen Reaktionspartnern in so geringer Konzentration vorliegt und deshalb allein diese Konzentration die Umsatzgeschwindigkeit der Reaktion bestimmt.

### 3.2.2. Reaktionen erster Ordnung

Unter Reaktionen der ersten Ordnung fallen die einfachsten chemischen Reaktionen, wobei es zu einer spontanen Umwandlung eines Stoffes A in einen oder mehreren Stoffe P kommt. Dies ist häufig bei Reaktionen des radioaktiven Zerfalls zu beobachten:



Die Geschwindigkeit  $v$  der Reaktion ist direkt messbar und zwar durch die zeitliche Abnahme des

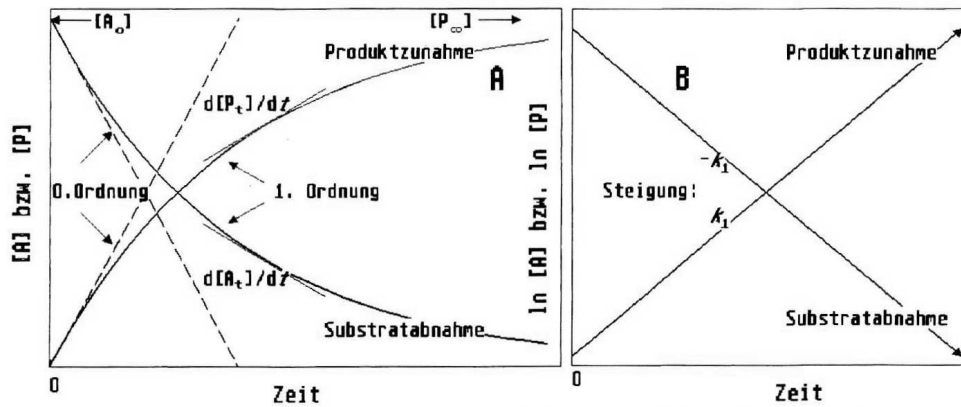


Abbildung 3.1.: Zeit-Umsatz-Kurven nullter und erster Ordnung für Produktbildung und Substratverbrauch in der direkten (links) und halblogarithmischen (rechts) Darstellung [Bis00].

Stoffes A bzw. der Zunahme des Stoffes P. Somit ist die Geschwindigkeit  $v$  direkt von der Konzentration von A abhängig:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_1[A], \quad (3.21)$$

dabei ist  $k_1$  der Geschwindigkeitskoeffizient erster Ordnung, dieser ist konzentrationsunabhängig und hat die Einheit  $s^{-1}$ .

Durch Integration dieser Differentialgleichung ergibt sich folgende Gleichung:

$$-\int_{A_0}^{A_1} \frac{d[A]}{[A]} = \int_{t_0}^t k_1 dt. \quad (3.22)$$

Zwei praktische Formen dieser Gleichung:

$$[A]_t = [A]_0 e^{-k_1 t} \quad (3.23)$$

und

$$\ln[A]_t = \ln[A]_0 - k_1 t. \quad (3.24)$$

Die erste Formel zeigt an, dass die Konzentration des Eduktes bei Reaktionen erster Ordnung exponentiell mit der Zeit abnimmt und umgekehrt die Konzentration des Produktes mit der Zeit exponentiell zunimmt. Die zweite Gleichung lässt erkennen, dass sich solche Kurven durch halblogarithmische Auftragung der Edukt- und Produktkonzentration nach der Zeit linearisieren lassen. Der Geschwindigkeitskoeffizient lässt sich aus der Steigung der Gerade und der Halbwertszeit  $t_{\frac{1}{2}}$ , bei der das Edukt zur Hälfte umgesetzt ist, ermitteln.

### 3.2.3. Reaktionen zweiter Ordnung

Bei Reaktionen der zweiten Ordnung reagieren zwei Stoffe A und B zu einem oder mehreren Stoffe(n) P



Die Umsatzgeschwindigkeit ist proportional zur Abnahme von A und B sowie zur Zunahme von P:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_1[A][B], \quad (3.26)$$

dabei ist  $k_1$  der Geschwindigkeitskoeffizient zweiter Ordnung, dieser ist konzentrationsabhängig und hat die Einheit  $s^{-1}M^{-1}$ .

Integration und Umformung der Gleichung führt zu[?]:

$$k_1 t = \frac{1}{[A]_0 - [B]_0} \ln \left( \frac{[B]_0[A]_t}{[A]_0[B]_t} \right). \quad (3.27)$$

Nun ist  $t$  aber abhängig von zwei Variablen A und B, dadurch lässt sich diese Gleichung nicht mehr in halblogarithmischer Darstellung linearisieren. Diese Gleichung ist nur noch lösbar, wenn die Konzentration einer der Variablen als konstant angesehen werden kann. Dies ist der Fall, wenn der eine Reaktionspartner gegenüber dem anderen in sehr großem Überschuss vorliegt, sodass sich diese Konzentration im Laufe der Reaktion nur marginal ändert. Durch diesen Sachverhalt wird diese Reaktion zu einer Reaktion pseudoerster Ordnung mit folgender Umsatzgeschwindigkeit:

$$v = k_1[A][B]_0 = k'_1[A]. \quad (3.28)$$

Die als konstant betrachtete Konzentration  $[B]_0$  wird in den Geschwindigkeitskoeffizienten pseudoerster Ordnung mit einbezogen:

$$k'_1 = k_1[B]_0. \quad (3.29)$$

dadurch lässt sich diese Gleichung wie eine Gleichung erster Ordnung behandeln und in einem halb-logarithmischen Diagramm linearisieren.

### 3.2.4. Reaktionen dritter Ordnung

Bei Reaktionen dritter Ordnung handelt es sich um Reaktionen mit drei Reaktanden, die zu einem oder mehreren Produkte(n) reagieren. Allein aus statistischen Gründen ist die Möglichkeit, dass sich die benötigten drei Reaktanden an einem Ort und zur selben Zeit treffen, sehr gering, womit solche Reaktionen sehr selten sind [Atk06]. In der Regel lassen sich solche Reaktionen in Elementarreaktionen zerlegen.

### 3.3. Mathematische Modelle

In diesem Abschnitt werden die mathematischen Modelle, die zur Darstellung der einzelnen Reaktionsmechanismen in dieser Arbeit herangezogen werden, nähergebracht und erläutert. Es versteht sich von selbst, dass es zur Darstellung verschiedener Reaktionsmechanismen nicht nur diese begrenzte Zahl an mathematischen Modellen gibt. Doch da jeder Reaktionsmechanismus seine Eigenheiten besitzt, wäre es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich gewesen, auf diese im Einzelnen einzugehen. Deshalb wurde sich auf die elementaren und weitverbreitesten Reaktionsmechanismen und deren Kinetiken beschränkt.

#### 3.3.1. Massenwirkungskinetik (MAK)

Eine weitverbreitete und fundamentale kinetische Funktion zur Darstellung chemischer Gleichungen und Modelle ist die Massenwirkungskinetik (*mass action kinetic function*)  $v_j(\mathbf{S}, \mathbf{p})$ .  $\mathbf{S}$  stellt dabei den Vektor aller vorhandenen Reaktanden dar und  $\mathbf{p}$  ist ein Vektor mit allen nötigen Parametern. Diese kinetische Funktion beruht auf dem Massewirkungsgesetz von Guldberg und Waage von 1867. Das Massewirkungsgesetz gründet auf der Annahme, dass die Lage des Reaktionsgleichgewichts proportional zur Kollision der Reaktanden ist. Dies wiederum ist proportional zur Konzentration der vorliegenden Reaktanden. Stimmiger Weise müßten anstatt der Konzentrationen die Aktivitäten der einzelnen Stoffe proportional zur Kollision der Reaktanden sein. Die Konzentrationen werden als Näherungswerte betrachtet, da die Aktivitäten der Stoffe meist schwer zu bestimmen sind. In Betrachtung der Umsatzgeschwindigkeiten der Reaktionsordnungen wird für eine reversible Reaktion folgende Gleichung erzeugt:

$$v_j(\mathbf{S}, \mathbf{p}) = k_{+j} \prod_i S_i^{n_{ij}^-} - k_{-j} \prod_i S_i^{n_{ij}^+}. \quad (3.30)$$

Hierbei ist  $k_{+j}$  die Vorwärtsratenkonstante und  $k_{-j}$  die Rückwärtsratenkonstante der Reaktion  $j$ .  $n_{ij}^+$  und  $n_{ij}^-$  stehen für die stöchiometrischen Koeffizienten der Edukte und Produkte, wobei:

$$n_{ij}^- = \begin{cases} -n_{ij} & \text{wenn } n_{ij} < 0 \\ 0 & \text{ansonsten} \end{cases} \quad (3.31)$$

und

$$n_{ij}^+ = \begin{cases} n_{ij} & \text{wenn } n_{ij} > 0 \\ 0 & \text{ansonsten} \end{cases}. \quad (3.32)$$

Herrscht ein Reaktionsgleichgewicht, so entstehen pro Zeiteinheit gleichviele Edukte wie Produkte, so ist  $v_j = 0$  und

$$\frac{\prod_i S_i^{n_{ij}^+}}{\prod_i S_i^{n_{ij}^-}} = \prod_i S_i^{n_{ij}} = \frac{k_{+j}}{k_{-j}} = q_j. \quad (3.33)$$

Diese Gleichung stellt das bekannte Massenwirkungsgesetz dar, das  $q_j = k_{+j}/k_{-j}$  als Gleichgewichtskonstante für Reaktion  $j$  erhält.

### 3.3.2. Generalisierte Massenwirkungskinetik (gMAK)

Die Massenwirkungskinetik kann auch Enzymreaktionen darstellen, wenn alle elementaren Einzelschritte einer Enzymreaktion wie die Enzym-Substrat-Bindung, Isomerisierung und die Dissoziation der Enzymzwischenprodukte mit einbezogen werden. Ist das Ziel jedoch eine Differentialgleichung mit niedriger Ordnung und einer geringen Anzahl von Parametern für eine Enzymkinetik, so reicht die Massenwirkungskinetik dafür nicht mehr aus. Wenn für alle Enzymreaktionen die elementaren Einzelschritte als grundlegende Einheiten betrachtet werden, können kinetische Funktionen gebildet werden. In diesen Kinetiken tauchen nur die Konzentrationen der Nichtenzym-Substrate und Produkte, aber nicht die Konzentrationen der Enzymzwischenprodukte auf.

Die Enzymkinetiken bieten daneben noch andere Funktionen, die die Massenwirkungskinetik nicht beschreiben kann, wie das Ereignis der Sättigung, der Aktivierung oder der Inhibition. Sättigung beschreibt einen Effekt, der eintritt, wenn eine so hohe Substratkonzentration vorherrscht, dass alle Enzymmoleküle vom Substrat gebunden sind, sodass eine Erhöhung der Substratkonzentration keine Auswirkung auf die Umsatzgeschwindigkeit mehr hat. In diesem Sinne schlugen Schauer und Heinrich 1983) die generalisierte Massenwirkungskinetik vor [HS96]:

$$v_j(\mathbf{S}, \mathbf{p}) = F_j(\mathbf{S}, \mathbf{p}) \left[ k_{+j} \prod_i S_i^{n_{ij}^-} - k_{-j} \prod_i S_i^{n_{ij}^+} \right]. \quad (3.34)$$

Die Funktion  $F_j(\mathbf{S}, \mathbf{p})$  entspricht einer positiven linearen Funktion. Der Vektor  $\mathbf{p}$  enthält auch hier alle nötigen Parameter ausgenommen der stöchiometrischen Koeffizienten  $n_{ij}^-$  und  $n_{ij}^+$ . Auch diese Kinetik ist konsistent mit dem Massenwirkungsgesetz, wenn ein Gleichgewicht vorherrscht und  $v_j = 0$ . Die Massenwirkungskinetik ist auch ein spezieller Fall der generalisierten Massenwirkungskinetik, und zwar wenn die Funktion  $F_j(\mathbf{S}, \mathbf{p}) = 1$ .

### 3.3.3. Michaelis-Menten-Gleichung

Die einfachste Enzymreaktion ist die Umsetzung genau eines Substrates durch ein Enzym. Solche Enzymreaktionen sind meist Isomerisierungen oder Spaltungsreaktionen (Peptidasen, Proteasen, Nucleasen etc.). Es wird auch von einem irreversiblen Reaktionsverlauf ausgegangen, sodass es unwichtig ist, ob ein oder mehrere Produkte bei dieser katalytischen Reaktion entstehen:



Für die einzelnen beteiligten Stoffe ergeben sich folgende zeitliche Änderungen:

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \quad (3.36)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[S][E] + (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3.37)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3.38)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = v \quad (3.39)$$

Die Umsatzgeschwindigkeit  $v$  wird über die Gleichung der Produktzunahme (Gleichung 3.39) definiert. Aus dieser Gleichung ist auch ersichtlich, dass die Umsatzgeschwindigkeit  $v$  direkt proportional zur Enzym-Substrat-Konzentration  $[ES]$  ist, wobei diese wiederum von der Menge der Reaktionspartner abhängig ist. Zur Lösung dieser Differentialgleichungen wären allerdings die zeitlichen Konzentrationsänderungen der Reaktionspartner von Nöten, die jedoch schwer experimentell zu bestimmen sind.

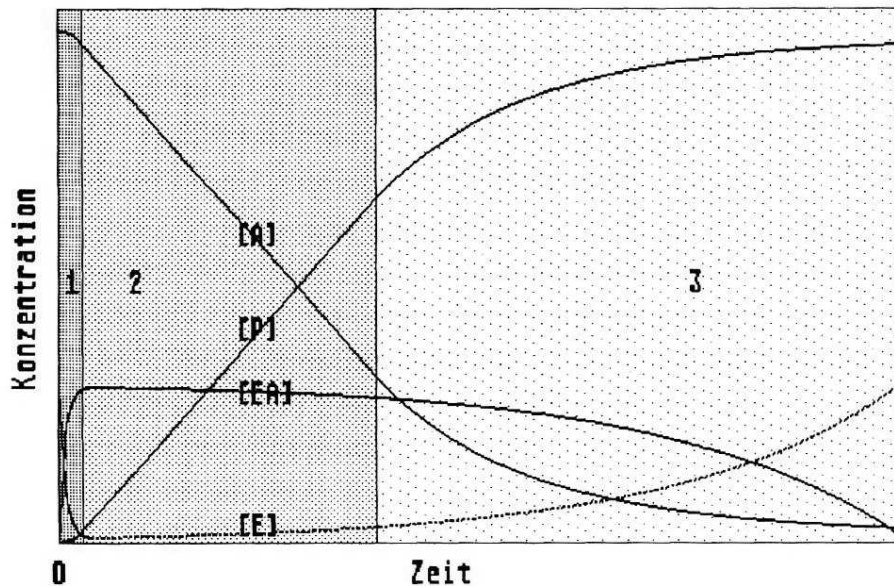


Abbildung 3.2.: Zeitliche Veränderung der Konzentrationen der Reaktionspartner einer enzymkatalysierten Reaktion in drei Phasen [Bis00].

Allgemein lassen sich jedoch die Konzentrationsverläufe in drei Phasen einteilen (Abbildung 3.2):

**Pre-Steady-State-Phase** In der kurzen Anfangsphase bilden sich Enzym-Substrat-Komplexe bei gleichzeitiger Abnahme des freien Enzyms. In dieser Phase ist die Umsatzgeschwindigkeit  $v$  noch äußerst gering.

**Steady-State-Phase** In der mittlere Phase ändert sich die Konzentration des Enzym-Substart-Komplexes nur wenig und die Umsatzgeschwindigkeit  $v$  erreicht ihren Maximalwert.

**Substarterschöpfung** In der Endphase nimmt die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes auf Grund der Erschöpfung des Substratüberschusses ab. Die Umsatzgeschwindigkeit  $v$  beginnt wieder zu fallen.

Durch Variation der Geschwindigkeitskonstanten werden die Bereiche der einzelnen drei Phasen relativ zueinander verändert. Sind die Größen der Geschwindigkeitskonstanten zueinander vergleichbar groß, wird die Steady-State-Phase stark verkürzt, wodurch die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes niemals einen konstanten Wert erreicht. Stellt sich dagegen die Pre-Steady-State-Phase im Vergleich zur Enzymkatalyse sehr schnell ein, sodass  $k_1 \approx k_{-1} > k_2$ , verlängert sich die mittlere Phase drastisch. Damit bleibt die Konzentration des Enzym-Substart-Komplexes über längere Zeit konstant. Das kommt dadurch zu Stande, dass sich Bildung und Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes die Waage halten. Somit herrscht ein zeitlich begrenzter Gleichgewichtszustand. Da hier kein echtes Gleichgewicht (engl. Equilibrium) vorherrscht, wird von einem Fließgleichgewicht (engl. Steady-State) gesprochen. In diesem Steady-State-Bereich herrscht durch die konstante Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes eine lineare Substratabnahme- bzw. Produktzunahme. Die Reaktion wird hinsichtlich des Substrates nullter Ordnung. Da dadurch die zeitlichen Änderungen des Enzym-Substrat-Komplexes und des freien Enzyms  $d[EA]dt = d[E]dt = 0$  werden, können Gleichung 3.37 und Gleichung 3.38 sich dadurch vereinfachen lassen:

$$k_1[S][E] = (k_{-1} + k_2)[ES]. \quad (3.40)$$

Durch Ersatz von  $[E]$  mit Berücksichtigung des Prinzips der Massenerhaltung  $[E]_0 = [E] + [ES]$  ergibt sich:

$$[ES] = \frac{k_1[S][E]_0}{k_1[S] + k_{-1} + k_2}. \quad (3.41)$$

Gleichung 3.41 lässt sich nun in Gleichung 3.39 einbringen, um einen Bezug zwischen Umsatzgeschwindigkeit  $v$  und Substratmenge zu erhalten:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_0[S]}{\frac{k_{-1}+k_2}{k_1} + [S]}. \quad (3.42)$$

$(k_{-1} + k_2)/k_1$  wird zur Michaelis-Menten-Konstante zusammengefasst und  $k_2$  wird zu  $k_{cat}$ :

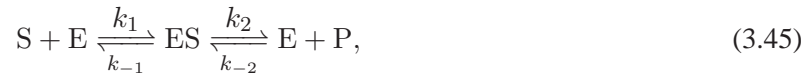
$$v = \frac{k_{cat}[E]_0[S]}{k_m + [S]}. \quad (3.43)$$



Nach Cornish-Bowden wird  $k_2$  durch  $k_{\text{cat}}$  ersetzt, um die Gleichung allgemeiner zu formen [CB04]. Dadurch kann allerdings nicht davon ausgegangen werden, dass  $k_{\text{cat}}$  äquivalent mit der Ratenkonstanten des zweiten Schrittes oder dass  $k_m$  äquivalent zu  $(k_{-1} + k_2)/k_1$  ist.  $k_{\text{cat}}$  bezieht sich auch nicht auf einen bestimmten Schritt im Mechanismus, sondern erfüllt eher die Aufgabe einer Ratenkonstante erster Ordnung.  $k_{\text{cat}}$  wird oft als katalytische Konstante oder als Umsatzrate (engl. turnover-rate) bezeichnet. In der Praxis ist zudem die wahre Enzymkonzentration  $[E]_0$  oft nicht bekannt, weshalb eine weitere Konstante  $V$  eingefügt wird:  $V = k_{\text{cat}}[E]_0$ . Die Limitierungsrate wird mit  $V$  oder auch  $V_{\text{max}}$  oder  $V_m$  bezeichnet, was noch von der alten Bezeichnung „Maximalgeschwindigkeit“ stammt. Diese Bezeichnung wurde allerdings verworfen, da es nicht um ein Maximum im mathematischen Sinne handelt, sondern eher um ein Limit des oberen Grenzwertes. Aus diesem Gesichtspunkt ergibt sich folgende Gleichung:

$$v = \frac{V[S]}{K_m + [S]}. \quad (3.44)$$

Die bisherige Form der Michaelis-Menten-Gleichung repräsentiert eine irreversible Uni-Uni-Reaktion, lässt sich aber auch für ein reversibles Schema erweitern:



mit der zugehörigen Reaktionsgeschwindigkeit

$$v = \frac{\frac{k_{\text{cat}}^+[E]_0[S]}{k_{m1}} - \frac{k_{\text{cat}}^-[E]_0[P]}{k_{m2}}}{1 + \frac{[S]}{k_{m1}} + \frac{[P]}{k_{m2}}}. \quad (3.46)$$

Wobei:

$$k_{m1} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (3.47)$$

und

$$k_{m2} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}}. \quad (3.48)$$

Diese reversible Michaelis-Menten Kinetik lässt sich wie folgt in die generalisierte Massenwirkungskinetik einfügen:

$$F(S, P) = \frac{1}{1 + \frac{[S]}{k_{m1}} + \frac{[P]}{k_{m2}}}. \quad (3.49)$$

Ein wichtiger Aspekt bei Enzymreaktionen, der nicht vernachlässigt werden darf, ist die Modifikation der Enzymreaktion durch Aktivatoren und Inhibitoren.



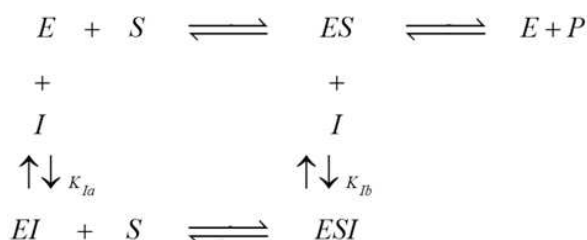


Abbildung 3.3.: Michaelis-Menten-Mechanismus mit gemischter Inhibition.

Für eine gemischte Inhibition (Abbildung 3.3), bei der weder EI noch ESI in das Produkt überführbar sind, werden Inhibitionskonstanten:

$$k_{Ia} = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (3.50)$$

und

$$k_{Ib} = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (3.51)$$

in die Michaelis-Menten-Gleichung mit eingefügt:

$$v = \frac{\frac{k_{cat}^+[E]_0[S]}{k_{m1}} - \frac{k_{cat}^-[E]_0[P]}{k_{m2}}}{1 + \frac{[I]}{k_{Ia}} + \left( \frac{[S]}{k_{m1}} + \frac{[P]}{k_{m2}} \right) \left( 1 + \frac{[I]}{k_{Ib}} \right)}. \quad (3.52)$$

Zur Darstellung einer Aktivierung wird zur Einfachhaltung der Gleichung ein Aktivierungsterm der Convenience Kinetik herangezogen, der später im Zusammenhang mit der Convenience Kinetik eingeführt wird:

$$h_A(d, k^A) = \frac{d}{k^A + d} \quad (3.53)$$

und dann multiplikativ mit entsprechenden Michaelis-Menten-Gleichung verknüpft wird. Hier entspricht die Variable  $d$  der Konzentration des Aktivators und  $k^A$  der Aktivierungskonstanten [WL06].

### 3.3.4. Bi-Bi-Reaktionsmechanismen

Neben der eben besprochenen Einsubstrat-Reaktionen kommen in der Natur für gewöhnlich sehr häufig auch Zweisubstrat-Reaktionen vor. Die Michaelis-Menten-Beziehung erweist sich prinzipiell auch bei diesen Reaktionen als gültig, solange nur die Abhängigkeit eines Substrates untersucht wird und die anderen Substrate und Cofaktoren im Überschuss vorliegen. Diese Reaktionen wurden von vielen Wissenschaftlern wie Segal, Kachmar und Boyer (1952), Alberty (1953, 1958) und Cleland (1963) eingehend beschrieben. Im Folgenden werden die Reaktionen nach der Nomenklatur und Klassifikation von Cleland beschrieben. Die Konstanten werden in Limitierungsraten, Michaelis-Konstanten und Inhibitionskonstanten untergliedert. Nach Cornish-Bowden sind Zweisubstrat und

Zweiprodukt Reaktionen häufig Gruppentransferreaktionen (z.B. Hydrolase), bei denen chemische Gruppen auf ein anderes Molekül übertragen werden [CB04]. Je nach Anzahl der Substrate bzw. Produkte, die an der Reaktion beteiligt sind, wird von einem Uni-Uni- (Michaelis-Menten), Bi-Uni- oder Bi-Bi-Mechanismen gesprochen.

Bei sequentiellen Mechanismen müssen erst alle Substrate an das Enzym gebunden haben, ehe ein Produkt freigesetzt werden kann. Je nachdem, ob die Substratbindung wahllos oder gerichtet erfolgt, handelt es sich um einen ungeordneten oder geordneten (engl. Random bzw. Ordered) Mechanismus. Der Ping-Pong-Mechanismus erlaubt im Gegensatz zum sequentiellen Mechanismus, dass bereits Produkt freigesetzt wird, bevor überhaupt alle Substrate gebunden haben. Das Ganze erfolgt durch Modifizierung des Enzyms durch die verschiedenen Substrate.

### Ungeordneter Bi-Bi-Mechanismus

Bei diesem allgemeinsten Mehrsubstrat-Mechanismus, der vor allem bei Kinasen auftritt, binden Substrate und Produkte in wahlloser Reihenfolge (Abbildung 3.4). Es gibt nun zwei Limitierungsraten bzw. zwei  $k_{cat}$ , vier Michaelis-Konstanten, für jedes Substrat und Produkt zur Darstellung der Wechselwirkung mit dem zentralen Komplex, und vier sogenannte Hemmkonstanten für jeden Liganden. Diese Konstanten werden so bezeichnet, da sie mit den Konstanten für die Produkthemmung übereinstimmen [Bis00]. Bei diesen Konstanten handelt es sich um Bindungskonstanten; sie stehen für die Bindung des Liganden an das freie Enzym unter Bildung eines nicht katalytisch aktiven Übergangskomplexes.

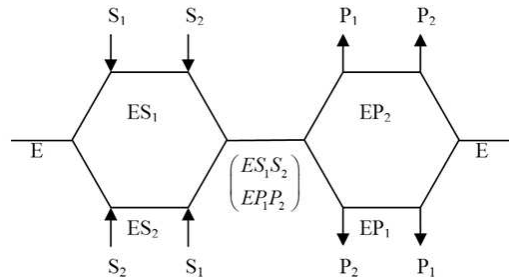


Abbildung 3.4.: Reaktionsschema für einen ungeordneten Bi-Bi-Mechanismus mit Beteiligung je zweier Substrate und zweier Produkte

Da die Hemm- und Michaelis-Konstanten in diesem Mechanismus miteinander in Beziehung stehen:  $k_{mA}k_{IB} = k_{IA}k_{mB}$  und  $k_{mP}k_{IQ} = k_{IP}k_{mQ}$  tauchen in dieser Reaktion  $k_{mA}$  und  $k_{mQ}$  nicht auf:

$$v = \frac{\frac{k_{cat}^+[E]_0[A][B]}{k_{IA}k_{mB}} - \frac{k_{cat}^-[E]_0[P][Q]}{k_{mP}k_{IQ}}}{1 + \frac{[A]}{k_{IA}} + \frac{[B]}{k_{IB}} + \frac{[A][B]}{k_{mB}k_{IA}} + \frac{[P]}{k_{IP}} + \frac{[Q]}{k_{IQ}} + \frac{[P][Q]}{k_{IQ}k_{mP}}}. \quad (3.54)$$

Für einen irreversiblen ungeordneten Bi-Bi-Mechanismus sieht die Gleichung folgendermaßen aus [CB04]:

$$v = \frac{k_{cat}^+[E]_0[A][B]}{k_{IA}k_{mB} + k_{mB}[A] + k_{mA}[B] + [A][B]}. \quad (3.55)$$

### Geordneter Bi-Bi-Mechanismus

Bei dieser Sonderform des ungeordneten Bi-Bi-Mechanismus ist eine strikte Reihelfolge bei der Bindung der Substrate an das Enzym gegeben (Abbildung 3.5).

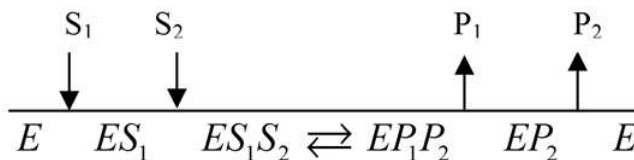


Abbildung 3.5.: Reaktionsschema für einen geordneten Bi-Bi-Mechanismus mit Beteiligung je zweier Substrate und zweier Produkte

Auch hier gibt es die oben erwähnten zehn Konstanten, mit denen der reversible geordnete Bi-Bi-Mechanismus folgendes Aussehen erhält:

$$v = \frac{\frac{k_{cat}^+[E]_0[A][B]}{k_{IA}k_{mB}} - \frac{k_{cat}^-[E]_0[P][Q]}{k_{mP}k_{IQ}}}{1 + \frac{[A]}{k_{IA}} + \frac{k_{mA}[B]}{k_{IA}k_{mB}} + \frac{[A][B]}{k_{mB}k_{IA}} + \frac{k_{mA}[B][P]}{k_{IA}k_{mB}k_{IP}} + \frac{[Q]}{k_{IQ}} + \frac{k_{mQ}[P]}{k_{IQ}k_{mP}} + \frac{k_{mQ}[A][P]}{k_{IA}k_{mP}k_{IQ}} + \frac{[P][Q]}{k_{IQ}k_{mP}} + \frac{[A][B][P]}{k_{IA}k_{mB}k_{IP}} + \frac{[B][P][Q]}{k_{IB}k_{mP}k_{IQ}}}. \quad (3.56)$$

Auch hier gibt es eine irreversible Form die ohne die Produktterme auskommt:

$$v = \frac{k_{cat}^+[E]_0[A][B]}{k_{IA}k_{mB} + k_{mB}[A] + k_{mA}[B] + [A][B]}. \quad (3.57)$$

### Ping-Pong Bi-Bi-Mechanismus

Der etwas andere Ping-Pong-Mechanismus beschreibt ein alternierendes Binden von Substrate und Freisetzen von Produkten (Abbildung 3.6):

Die darausfolgende Formel setzt neun der zehn Konstanten ein und  $k_{IB}$  wird nicht benötigt:

$$v = \frac{\frac{k_{cat}^+[E]_0[A][B]}{k_{IA}k_{mB}} - \frac{k_{cat}^-[E]_0[P][Q]}{k_{mQ}k_{IP}}}{\frac{[A]}{k_{IA}} + \frac{k_{mA}[B]}{k_{IA}k_{mB}} + \frac{[A][B]}{k_{mB}k_{IA}} + \frac{k_{mA}[B][Q]}{k_{IA}k_{mB}k_{IQ}} + \frac{[P]}{k_{IP}} + \frac{k_{mP}[Q]}{k_{IP}k_{mQ}} + \frac{[A][P]}{k_{IA}k_{IP}} + \frac{[P][Q]}{k_{IP}k_{mQ}}}. \quad (3.58)$$

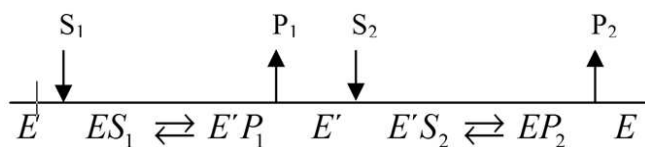


Abbildung 3.6.: Reaktionsschema für einen Ping-Pong Bi-Bi-Mechanismus mit Beteiligung je zweier Substrate und zweier Produkte.

Auch hier gibt es für die reversible Form eine vereinfachte Gleichung:

$$v = \frac{k_{cat}^+[E]_0[A][B]}{k_{mB}[A] + k_{mA}[B] + [A][B]}. \quad (3.59)$$

### 3.3.5. Herleitung der Bi-Uni-Reaktionsmechanismen mit der King-Altman-Methode

In diesem Abschnitt sollen zwei Kinetiken für den Bi-Uni-Reaktionsmechanismus aufgezeigt werden. Neben der Darstellung der Kinetiken werden diese mit Hilfe eines Verfahrens, der King-Altman-Methode, hergeleitet. Eine eigenständige Herleitung dieser Gleichungen war von Nöten, da diese in der einschlägigen Literatur nicht bzw. nicht in der gewünschten Form vorzufinden sind. Die King-Altman-Methode ermöglicht ohne großen mathematischen Aufwand die Erstellung von Geschwindigkeitsgleichungen nach den Regeln der Steady-State-Kinetik über Differentialgleichungen für komplexere Enzymmechanismen.

#### Geordneter Bi-Uni-Mechanismus

In diesem Abschnitt soll eine Kinetik für einen geordneten Bi-Uni-Mechanismus mit Hilfe der King-Altman-Methode hergeleitet werden. Hierbei ist zu beachten, dass für dieses Reaktionsschemata die Reihenfolge der Bindung der Substrate strikt festgelegt ist (Abbildung 3.7).

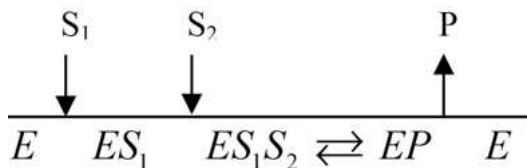


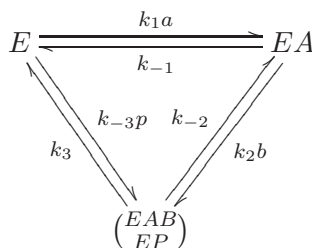
Abbildung 3.7.: Reaktionsschema für einen geordneten Bi-Uni-Mechanismus mit Beteiligung zweier Substrate und eines Produktes.

Die King-Altman-Methode ist grob in fünf Schritte unterteilt, die bei der folgenden Herleitung der Kinetik ausführlich besprochen werden [CB04],[Bis00].

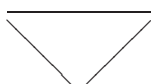
- 1. Schritt:** In diesem Schritt wird zuerst ein Polygon skizziert, dessen Ecken und Kanten den Mechanismus der Enzymreaktion widerspiegeln. Die Ecken stehen dabei für die verschiedenen auftretenden Enzymformen. Alle dargestellten Reaktionen müssen erster bzw. pseudoerster

Ordnung sein, also Elementarreaktionen entsprechen. Die Doppelpfeile, die die Kanten des Diagramms bilden, können mit den Geschwindigkeitskonstanten, welche gegebenenfalls mit eintretenden Liganden multipliziert sind, beschriftet werden.

Das zu Grunde liegende Reaktionsschema für einen geordneten Bi-Uni-Mechanismus:



Die Hauptstruktur soll das Reaktionsschema als grobes Gerüst skizzieren. In diesem Fall ein Dreieck:



**2. Schritt:** Es werden nun Substrukturen gebildet, die

- 1.) nur Linien der Hauptstruktur enthalten,
- 2.) alle Enzymformen miteinander verbinden und
- 3.) keine geschlossenen Figuren entstehen lassen.

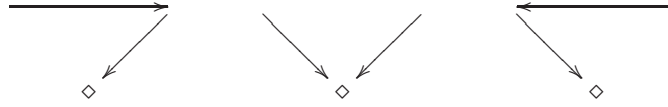


Jede dieser Strukturen enthält eine Linie weniger als die Hauptstruktur. So entstehen drei Strukturen mit je zwei kanten.

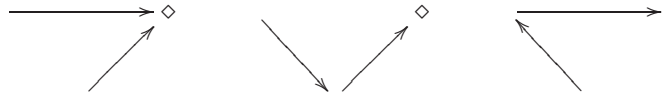
**3. Schritt:** In diesem dritten Schritt wird für jede einzelne Enzymform die Position in einer Struktur markiert und die Kanten werden zu entsprechenden Pfeilen, die zur entsprechenden Enzymform hinweisen. Für jede einzelne Enzymform wird dann anhand dieser Strukturen die Gleichung für ihre relative Menge bestimmt:



$$\frac{[E]}{e_0} = \frac{k_{-1}k_{-2} + k_2k_3[B] + k_{-1}k_3}{N} \quad (3.60)$$



$$\frac{[EAB]}{e_0} = \frac{k_1 k_2 [A][B] + k_{-2} k_{-3} [B][P] + k_{-1} k_{-3} [P]}{N} \quad (3.61)$$



$$\frac{[EB]}{e_0} = \frac{k_1 k_2 [A] + k_{-2} k_{-3} [P] + k_1 k_3 [A]}{N} \quad (3.62)$$

Der Nenner  $N$  besteht aus der Summe aller Zählerterme der Gleichungen 3.60 bis 3.62:  $N = k_{-1} k_{-2} + k_2 k_3 [B] + k_{-1} k_3 + k_1 k_2 [A][B] + k_{-2} k_{-3} [B][P] + k_{-1} k_{-3} [P] + k_1 k_2 [A] + k_{-2} k_{-3} [P] + k_1 k_3 [A]$ .

Diese Nennerform wird nun in eine Koeffizientenform umgeschrieben, sodass alle Konstanten nach ihren Konzentrationsgliedern geordnet sind:

$$N = N_0 + [A]N_1 + [B]N_2 + [A][B]N_3 + [B][P]N_4 + [P]N_5. \quad (3.62)$$

Hierbei stehen die verwendeten Terme für:

$$N_0 = k_{-1}(k_{-2} + k_3) \quad (3.63)$$

$$N_1 = k_1(k_{-2} + k_3) \quad (3.64)$$

$$N_2 = k_2 + k_3 \quad (3.65)$$

$$N_3 = k_1 + k_2 \quad (3.66)$$

$$N_4 = k_2 + k_{-3} \quad (3.67)$$

$$N_5 = k_{-3}(k_{-1} + k_{-2}) \quad (3.68)$$

Die Reaktionskinetik setzt sich dann aus den Summen der Raten zusammen, die ein bestimmtes Produkt generieren abzüglich der Raten für die Schritte, die das Produkt verringern. Da es in diesem

Reaktionsmechanismus nur einen Schritt gibt, in dem P produziert wird, und auch nur einen, bei dem P verzehrt wird, ergibt sich daraus:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_3[EAB] - k_{-3}[E][P] \quad (3.69)$$

$$= [E]_0 \frac{k_1 k_2 k_3 [A][B] + k_2 k_3 k_{-3} [B][P] + k_{-1} k_3 k_{-3} [P]}{N} + \frac{-k_{-1} k_{-2} k_{-3} [P] - k_2 k_3 k_{-3} [B][P] - k_{-1} k_3 k_{-3} [P]}{N} \quad (3.70)$$

$$= [E]_0 \frac{k_1 k_2 k_3 [A][B] - k_{-1} k_{-2} k_{-3} [P]}{N} \quad (3.71)$$

Mit Hilfe der Koeffizienten werden in diesem Schritt die kinetischen Konstanten definiert. Die Michaelis-Konstanten werden als die Verhältnisse der Koeffizienten aller Substrate bzw. Produkte abzüglich des variablen Substrates bzw. Produktes zu den Koeffizienten sämtlicher Substrate bzw. Produkte definiert:

$$k_{mA} = \frac{N_2}{N_3} = \frac{k_2 k_3}{k_1 k_2} = \frac{k_3}{k_1} \quad (3.72)$$

$$k_{mB} = \frac{N_1}{N_3} = \frac{k_1 (k_{-2} + k_3)}{k_1 k_2} = \frac{k_{-2} + k_3}{k_2} \quad (3.73)$$

$$k_{mP} = \frac{N_0}{N_5} = \frac{k_{-1} (k_{-2} + k_3)}{k_{-3} (k_{-1} + k_{-2})} \quad (3.74)$$

Die Limitierungsraten  $V_+$  und  $V_-$  werden aus dem Quotienten des jeweiligen Zählerkoeffizienten und dem Koeffizienten aller Substrate bzw. Produkte gebildet:

$$V^+ = \frac{\text{Zähler1}}{\text{Koeffizient aller Substrate}} = [E]_0 \frac{k_1 k_2 k_3}{k_1 k_2} \quad (3.75)$$

$$V^- = \frac{\text{Zähler2}}{\text{Koeffizient aller Produkte}} = [E]_0 \frac{k_{-1} k_{-2} k_{-3}}{k_{-3} (k_{-1} + k_{-2})} \quad (3.76)$$

Nach Umformung von Gleichung 3.75 und Gleichung 3.76 lassen sich diese in die Kinetikengleichung integrieren:

$$[E]_0 k_{-1} k_{-2} k_{-3} = V^+ k_1 k_2 \quad (3.77)$$

und

$$[E]_0 k_1 k_2 k_3 = V^- k_{-3} (k_{-1} + k_{-2}). \quad (3.78)$$

Durch weitere Umformungen und Zusammenfassungen wird folgende Umsatzgeschwindigkeit erzeugt:

$$v = \frac{V^+ k_1 k_2 [A][B] - V^- k_{-3} (k_{-1} + k_{-2}) [P]}{N} \quad (3.79)$$

$$v = \frac{\frac{V^+ k_1 k_2 [A][B] - V^- k_{-3} (k_{-1} + k_{-2}) [P]}{k_{-1} (k_{-2} + k_3)}}{\frac{N}{k_{-1} (k_{-2} + k_3)}} \quad (3.80)$$

$$v = \frac{\frac{V^+ [A][B]}{k_{IA} k_{mB}} - \frac{V^- [P]}{k_{mP}}}{1 + \frac{[A]}{k_{IA}} + \frac{k_{mA} [B]}{k_{IA} k_{mB}} + \frac{[A][B]}{k_{mB} k_{IA}} + \frac{k_{mA} [B][P]}{k_{IA} k_{mB} k_{IP}} + \frac{[P]}{k_{mP}}}, \quad (3.81)$$

wobei folgende Konstanten definiert werden:

$$k_{IP} = \frac{k_{-3}}{k_3} \quad (3.82)$$

$$k_{IA} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (3.83)$$

Um Gleichung 3.81 mit der Michaelis-Menten-Gleichung in Einklang zu bringen, wird  $V^+ = k_{cat}^+ [E]_0$  und  $V^- = k_{cat}^- [E]_0$  gesetzt. Es folgt letztendlich für einen reversiblen geordneten Bi-Uni-Mechanismus:

$$v = \frac{\frac{k_{cat}^+ [E]_0 [A][B]}{k_{IA} k_{mB}} - \frac{k_{cat}^- [E]_0 [P]}{k_{mP}}}{1 + \frac{[A]}{k_{IA}} + \frac{k_{mA} [B]}{k_{IA} k_{mB}} + \frac{[A][B]}{k_{mB} k_{IA}} + \frac{k_{mA} [B][P]}{k_{IA} k_{mB} k_{IP}} + \frac{[P]}{k_{mP}}} \quad (3.84)$$

Für einen irreversiblen geordneten Bi-Uni-Mechanismus sieht die Formel für die Umsatzgeschwindigkeit dann folgendermaßen aus:

$$v = \frac{\frac{k_{cat}^+ [E]_0 [A][B]}{k_{IA} k_{mB}}}{1 + \frac{[A]}{k_{IA}} + \frac{k_{mA} [B]}{k_{IA} k_{mB}} + \frac{[A][B]}{k_{mB} k_{IA}}} \quad (3.85)$$

bzw.

$$v = \frac{k_{cat}^+ [E]_0 [A][B]}{k_{IA} k_{mB} + k_{mB} [A] + k_{mA} [B] + [A][B]}. \quad (3.86)$$

### Ungeordneter Bi-Uni-Mechanismus

Bei der Erstellung einer Kinetik für einen ungeordneten Bi-Uni-Mechanismus mit der King-Altman-Methode ist zu beachten, dass für dieses Reaktionsschemata die Reihenfolge der Bindung der Substrate bzw. auch der Abspaltung der Produkte nicht festgelegt ist. Die Bindung der einzelnen Substrate erfolgt völlig unabhängig voneinander (Abbildung 3.8).

Auch hier werden die fünf Schritte der King-Altman-Methode durchschritten, um auf die gewünschte Gleichung zu kommen. Für diesen Mechanismus werden hier nur die grundlegenden Teilschritte kurz dargelegt:



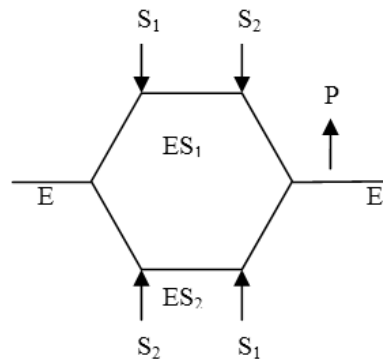
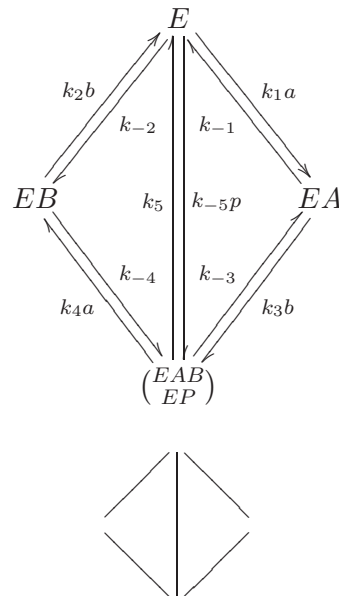
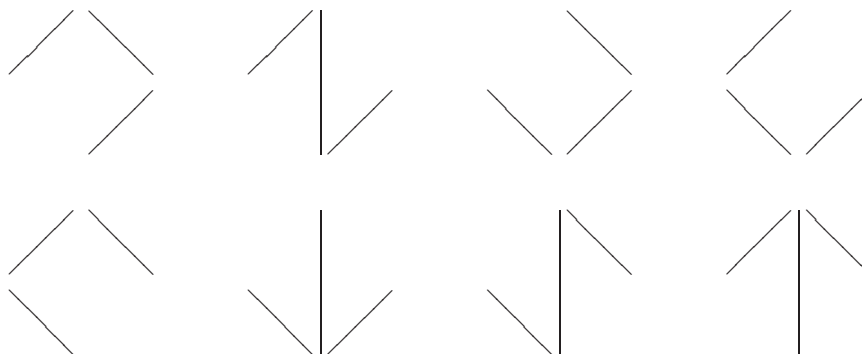


Abbildung 3.8.: Reaktionsschema für einen geordneten Bi-Uni-Mechanismus mit Beteiligung zweier Substrate und eines Produktes.

**1. Schritt** Reaktionsmechanismus als Polygon und Hauptstruktur:



**2. Schritt** Bildung der Substrukturen:



**3. Schritt** Bildung der Gleichungen der relativen Menge jeder Enzymform durch deren spezielle Strukturformen:

$$\frac{[E]}{e_0} = \frac{k_{-2}k_{-1}k_{-3} + k_{-1}k_{-3}k_4[A] + k_{-2}k_{-4}k_3[B] + k_{-4}k_{-2}k_{-1}}{N} + \frac{k_5k_4k_3[A][B] + k_{-1}k_{-2}k_5 + k_{-2}k_3k_5[B] + k_{-1}k_4k_5[A]}{N} \quad (3.87)$$

$$\frac{E[A][B]}{e_0} = \frac{k_1k_{-2}k_3[A][B] + k_1k_3k_4[A]^2[B] + k_2k_3k_4[A][B]^2 + k_{-1}k_2k_4[A][B]}{N} + \frac{k_3k_4k_{-5}[A][B][P] + k_{-1}k_{-2}k_{-5}[P] + k_{-2}k_3k_{-5}[B][P] + k_{-1}k_4k_{-5}[A][P]}{N} \quad (3.88)$$

$$\frac{E[B]}{e_0} = \frac{k_{-1}k_2k_{-3}[B] + k_1k_3k_{-4}[A][B] + k_2k_3k_{-4}[B]^2 + k_{-1}k_2k_{-4}[B]}{N} + \frac{k_3k_{-4}k_{-5}[P][B] + k_{-1}k_2k_5[B] + k_2k_3k_5[B]^2 + k_{-1}k_{-4}k_{-5}[P]}{N} \quad (3.89)$$

$$\frac{E[A]}{e_0} = \frac{k_1k_{-2}k_{-3}[A] + k_1k_{-3}k_4[A]^2 + k_2k_{-3}k_4[A][B] + k_1k_{-2}k_{-4}[A]}{N} + \frac{k_{-3}k_4k_{-5}[A][P] + k_1k_{-2}k_5[A] + k_{-2}k_{-3}k_{-5}[P] + k_1k_4k_5[A]^2}{N} \quad (3.90)$$

**4. Schritt** Bildung des Nenners in Koeffizientenform und Bildung der vorläufigen Reaktionskinetik:

$$\begin{aligned} N = & (k_{-1}k_{-2}k_{-3} + k_{-1}k_{-2}k_{-4} + k_{-1}k_{-2}k_5) + \\ & [A](k_{-1}k_4k_5 + k_1k_{-2}k_{-3} + k_1k_{-2}k_{-4} + k_1k_{-2}k_5 + k_{-1}k_{-3}k_4) + \\ & [A]^2(k_1k_{-3}k_4 + k_1k_4k_5) + \\ & [A][B](k_3k_4k_5 + k_1k_{-2}k_3 + k_1k_3k_{-4} + k_2k_{-3}k_4 + k_{-1}k_2k_4) + \\ & [A]^2[B](k_1k_3k_4) + \\ & [B](k_{-2}k_3k_{-4} + k_{-2}k_3k_5 + k_{-1}k_2k_{-3} + k_{-1}k_2k_{-4} + k_{-1}k_2k_5) + \\ & [B]^2(k_2k_3k_{-4} + k_2k_3k_5) + \\ & [A][B]^2(k_2k_3k_4) + \\ & [P](k_{-1}k_{-2}k_{-5} + k_{-1}k_{-4}k_{-5} + k_{-2}k_{-3}k_{-5}) + \\ & [A][P](k_{-3}k_4k_{-5} + k_{-1}k_4k_{-5}) + \\ & [A][B][P](k_3k_4k_{-5}) + \\ & [B][P](k_3k_{-4}k_{-5} + k_{-2}k_3k_{-5}) \end{aligned} \quad (3.91)$$

$$N = N_0 + [A]N_1 + [A]^2N_2 + [A][B]N_3 + [A]^2[B]N_4 + [B]N_5 + [B]^2N_6 + [A][B]^2N_7 + [P]N_8 + [A][P]N_9 + [A][B][P]N_{10} + [B][P]N_{11} \quad (3.92)$$

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_5[EAB] - k_{-5}[E][P]$$

$$= [E]_0 \frac{(k_1 k_{-2} k_3 + k_{-1} k_2 k_4) k_5 [A][B] + k_1 k_3 k_4 k_5 [A]^2 [B] + k_2 k_3 k_4 k_5 [A][B]^2}{N} +$$

$$\frac{-(k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_{-2} k_{-3}) k_{-5} [P] - k_{-1} k_{-3} k_4 k_{-3} [A][P] - k_{-2} k_3 k_{-4} k_{-5} [B][P]}{N} \quad (3.93)$$

**5. Schritt** Bildung der benötigten Michaelis-Konstanten und Erstellung der Reaktionskinetik in gewünschter Form. Da nach Segel der ungeordnete Bi-Uni-Mechanismus keine Gleichung liefert, die eine hyperbole Funktion darstellt, wenn keine Substratsättigung vorliegt, und sich somit auch nicht linearisieren lässt um die Michaelis-Konstanten zu bestimmen, können einzelne Geschwindigkeitskonstanten zwar zusammengefasst werden, entsprechen aber nicht der Definition der Michaelis-Konstanten [Seg93]. Wird jedoch angenommen, dass schnelle Gleichgewichte zwischen den tenären Komplexen EAB und EP vorherrschen und keine langsamen Umwandlungen vorliegen, kann die Gleichung stark vereinfacht werden. Nach Cornish-Bowden verschwinden wie im ungeordneten Bi-Bi-Mechanismus im Nenner sowie im Zähler die quadratischen Terme und die Terme für  $[B][P]$ ,  $[A][P]$  und  $[A][B][P]$  [CB04]. Mit dieser Annahme sind  $k_{IA}$ ,  $k_{IB}$  und  $k_{IP}$  die Dissoziationskonstanten zu  $k_{mA}$ ,  $k_{mB}$  und  $k_{mP}$ . In diesem Mechanismus sind A und B in einander überführbar:

$k_{mA} k_{IB} = k_{IA} k_{mB}$ . Dieser Mechanismus trägt dann die Bezeichnung Rapid-Equilibrium-Random-Mechanismus.

$$k_{mA} = \frac{N_5}{N_3} \quad (3.94)$$

$$k_{mB} = \frac{N_1}{N_3} \quad (3.95)$$

$$k_{mP} = \frac{N_0}{N_8} \quad (3.96)$$

$$k_{IA} = \frac{N_1}{N_0} \quad (3.97)$$

$$k_{IB} = \frac{N_0}{N_5} \quad (3.98)$$

$$v = \frac{\frac{k_{cat}^+ [E]_0 [A][B]}{k_{IA} k_{mB}} - \frac{k_{cat}^- [E]_0 [P]}{k_{mP}}}{1 + \frac{[A]}{k_{IA}} + \frac{[B]}{k_{IB}} + \frac{[A][B]}{k_{mB} k_{IA}} + \frac{[P]}{k_{mP}}} \quad (3.99)$$

Für einen irreversiblen ungeordneten Bi-Uni-Mechanismus sieht die Formel für die Umsatzgeschwindigkeit dann folgendermaßen aus:

$$v = \frac{\frac{k_{cat}^+ [E]_0 [A][B]}{k_{IA} k_{mB}}}{1 + \frac{[A]}{k_{IA}} + \frac{[B]}{k_{IB}} + \frac{[A][B]}{k_{mB} k_{IA}}} \quad (3.100)$$

bzw.

$$v = \frac{k_{cat}^+ [E]_0 [A][B]}{k_{IA} k_{mB} + k_{mB} [A] + k_{mA} [B] + [A][B]} \quad (3.101)$$

### 3.3.6. Convenience Kinetik

Wie an den vorherigen Kinetiken eindeutig ersichtlich ist, können die kinetischen Funktionen für enzymatische Gleichungen sehr komplex ausfallen und eine Vielzahl von Parametern beinhalten. Aus diesem Grund wurde von W. Liebermeister und E. Klipp eine einfache generalisierte Kinetik eingeführt, die sogenannte Convenience-Kinetik“[WL06].

Der Convenience-Kinetik liegt die Michaelis-Menten-Kinetik zu Grunde und versteht sich als eine generalisierte Form dieser. Die Convenience-Kinetik deckt alle möglichen Stöchiometrien ab und ermöglicht die Darstellung von Regulationen der Enzymreaktion durch Aktivierung und Inhibition. Diese Kinetik wurde vom Rapid-Equilibrium-Random-Order-Enzymmechanismus abgeleitet. Zur Wahrung der Thermodynamik wurde die Convenience-Kinetik in Termen mit thermodynamisch unabhängigen Parametern verfasst:

$$v(\mathbf{a}, \mathbf{b}) = E \frac{k_+^{cat} \prod_i \tilde{a}_i^{\alpha_i} - k_-^{cat} \prod_j \tilde{b}_j^{\beta_j}}{\prod_i (1 + \tilde{a}_i + \dots + \tilde{a}_i^{\alpha_i}) + \prod_j (1 + \tilde{b}_j + \dots + \tilde{b}_j^{\beta_j}) - 1} \quad (3.102)$$

$\mathbf{a}$  und  $\mathbf{b}$  stellen hier die Konzentrationsvektoren zum einen für die Substrate und zum anderen für die Produkte dar.  $\tilde{a}_i = a_i/k_{a_i}^M$  und  $\tilde{b}_j = b_j/k_{b_j}^M$ , wobei  $k_{a_i}^M$  und  $k_{b_j}^M$ , analog zur Michaelis-Menten Kinetik, die Substratkonstante und Produktkonstante (in mM) darstellen. Die stöchiometrischen Koeffizienten  $\alpha_i$  und  $\beta_j$  tauchen hier im Exponenten auf. Die obige Gleichung beschreibt einen reversiblen Enzymmechanismus. Für die irreversible Form entfallen dafür die Produktterme und der Ausgleichsterm  $-1$ :

$$v(\mathbf{a}) = E \frac{k_+^{cat} \prod_i \tilde{a}_i^{\alpha_i}}{\prod_i (1 + \tilde{a}_i + \dots + \tilde{a}_i^{\alpha_i})} \quad (3.103)$$

Eine Regulation der Enzymreaktion kann zum einen durch eine Aktivierung bzw. eine Inhibition erfolgen. Für diese Ereignisse können die folgenden Terme mit obiger Gleichung 3.102 multipliziert werden:

$$h_A(d, k^A) = \frac{d}{k^A + d} \quad (3.104)$$

für einen Aktivator und

$$h_I(d, k^I) = \frac{k^I}{k^I + d} \quad (3.105)$$

für einen Inhibitor.  $k^A$  und  $k^I$  stellen die Aktivierungskonstante und die Inhibitionskonstante dar (in mM) und  $d$  entspricht der Konzentration des jeweiligen Modifikators. Werden Gleichung , und zusammengefügt, wird dadurch die vollständige Convenience-Gleichung erzeugt:

$$v_l = E_l \prod_m h_A(c_m, k_{lm}^A)^{w_{lm}^+} h_I(c_m, k_{lm}^I)^{w_{lm}^-} \frac{k_+^{cat} \prod_i \tilde{c}_{li}^{n_{il}^-} - k_-^{cat} \prod_j \tilde{c}_{li}^{n_{il}^+}}{\prod_i \sum_{m=0}^{n_{il}^-} (\tilde{c}_{li})^m + \prod_j \sum_{m=0}^{n_{il}^+} (\tilde{c}_{li})^m - 1}. \quad (3.106)$$

Hier entspricht  $c$  den jeweiligen Konzentrationen und  $\tilde{c}_{li} = c_i/k_{li}^M$ .

Um den thermodynamischen Gesetzen zu entsprechen, gibt es auch eine Form der Convenience-Kinetik, die auf jeden Fall sicherstellt, dass diesen Gesetzen entsprochen wird:

$$v_l = E_l \prod_m h_A(c_m, k_{lm}^A)^{w_{lm}^+} h_I(c_m, k_{lm}^I)^{w_{lm}^-} \times k_l^V \frac{\prod_i \tilde{c}_{li}^{n_{il}^-} (\tilde{k}_{li}^M)^{\frac{-n_{il}^-}{2}} - \prod_j \tilde{c}_{li}^{n_{il}^+} (\tilde{k}_{li}^M)^{\frac{n_{il}^+}{2}}}{\prod_i \sum_{m=0}^{n_{il}^-} (\tilde{c}_{li})^m + \prod_i \sum_{m=0}^{n_{il}^+} (\tilde{c}_{li})^m - 1}. \quad (3.107)$$

Das Benutzen dieser Gleichung ist von Nöten, wenn die zu Grunde liegende stöchiometrische Matrix  $\mathbf{N}$  keinen vollen Rang aufweist und somit angezeigt wird, dass die vorhandenen Parameter nicht unabhängig voneinander sind.  $\tilde{c}_{li} = c_i/k_{li}^M$  und  $\tilde{k}_{li}^M = k_i^G/k_{li}^M$ , wobei  $k_i^G = e^{G_i^{(0)}/RT}$  einer dimensionslosen Energiekonstante mit Boltzman-Gaskonstante  $R \approx 8,314(J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1})$  und absoluter Temperatur  $T$  entspricht.

### 3.3.7. Aktivierung und Inhibition von Enzymreaktionen

Die im Abschnitt Convenience-Kinetik eingeführten Aktivierungs- und Inhibitionsterme:

$$h_A(d, k^A) = \frac{d}{k^A + d} \quad (3.108)$$

für einen Aktivator und

$$h_I(d, k^I) = \frac{k^I}{k^I + d} \quad (3.109)$$

für die Inhibition, sind sehr allgemeine Ausdrücke und wurden zur Vereinfachung der komplexen Gleichungen auch für die generalisierte Massenwirkungskinetik, den Bi-Uni-Mechanismen und den Bi-Bi-Mechanismen herangezogen.

### 3.3.8. Zusammenfassung

Die folgenden Tabellen 3.1 und 3.2 bieten eine Übersicht über die besprochenen und zu implementierenden Mechanismen und Kinetiken.

---

Kinetik

---

Reversible generalisierte Massenwirkungskinetik

$$k_{+j} \prod_i S_i^{n_{ij}^-} - k_{-j} \prod_i S_i^{n_{ij}^+}$$

Irreversible generalisierte Massenwirkungskinetik

$$k_{+j} \prod_i S_i^{n_{ij}^-}$$

Reversible Michaelis-Menten-Kinetik

$$\frac{\frac{k_{cat}^+[E]_0[S]}{k_{m1}} - \frac{k_{cat}^-[E]_0[P]}{k_{m2}}}{1 + \frac{[S]}{k_{m1}} + \frac{[P]}{k_{m2}}}$$

Irreversible Michaelis-Menten-Kinetik

$$\frac{k_{cat}[E]_0[S]}{k_m + [S]}$$

Reversible geordnete Bi-Uni-Kinetik

$$\frac{\frac{k_{cat}^+[E]_0[A][B]}{k_{IA}k_{mB}} - \frac{k_{cat}^-[E]_0[P]}{k_{mP}}}{1 + \frac{[A]}{k_{IA}} + \frac{k_{mA}[B]}{k_{IA}k_{mB}} + \frac{[A][B]}{k_{mB}k_{IA}} + \frac{k_{mA}[B][P]}{k_{IA}k_{mB}k_{IP}} + \frac{[P]}{k_{mP}}}$$

Irreversible geordnete Bi-Uni-Kinetik

$$\frac{k_{cat}^+[E]_0[A][B]}{k_{IA}k_{mB} + k_{mB}[A] + k_{mA}[B] + [A][B]}$$

Reversible ungeordnete Bi-Uni-Kinetik

$$\frac{\frac{k_{cat}^+[E]_0[A][B]}{k_{IA}k_{mB}} - \frac{k_{cat}^-[E]_0[P]}{k_{mP}}}{1 + \frac{[A]}{k_{IA}} + \frac{[B]}{k_{IB}} + \frac{[A][B]}{k_{mB}k_{IA}} + \frac{[P]}{k_{mP}}}$$

Irreversible ungeordnete Bi-Uni-Kinetik

$$\frac{k_{cat}^+[E]_0[A][B]}{k_{IA}k_{mB} + k_{mB}[A] + k_{mA}[B] + [A][B]}$$

reversible geordnete Bi-Bi-Kinetik

$$\frac{\frac{k_{cat}^+[E]_0[A][B]}{k_{IA}k_{mB}} - \frac{k_{cat}^-[E]_0[P][Q]}{k_{mP}k_{IQ}}}{1 + \frac{[A]}{k_{IA}} + \frac{k_{mA}[B]}{k_{IA}k_{mB}} + \frac{[A][B]}{k_{mB}k_{IA}} + \frac{k_{mA}[B][P]}{k_{IA}k_{mB}k_{IP}} + \frac{[Q]}{k_{IQ}} + \frac{k_{mQ}[P]}{k_{IQ}k_{mP}} + \frac{k_{mQ}[A][P]}{k_{IA}k_{mP}k_{IQ}} + \frac{[P][Q]}{k_{IQ}k_{mP}} + \frac{[A][B][P]}{k_{IA}k_{mB}k_{IP}} + \frac{[B][P][Q]}{k_{IB}k_{mP}k_{IQ}}}$$


---

Tabelle 3.1.: Übersicht der Kinetiken für die verschiedenen Mechanismen (ohne Modifikationsterme)  
-Teil 1.

## Kinetik

## Irreversible geordnete Bi-Bi-Kinetik

$$\frac{k_{cat}^+[E]_0[A][B]}{k_{IA}k_{mB}+k_{mB}[A]+k_{mA}[B]+[A][B]}$$

## Reversible ungeordnete Bi-Bi-Kinetik

$$\frac{\frac{k_{cat}^+[E]_0[A][B]}{k_{IA}k_{mB}} - \frac{k_{cat}^-[E]_0[P][Q]}{k_{mP}k_{IQ}}}{1 + \frac{[A]}{k_{IA}} + \frac{[B]}{k_{IB}} + \frac{[A][B]}{k_{mB}k_{IA}} + \frac{[P]}{k_{IP}} + \frac{[Q]}{k_{IQ}} + \frac{[P][Q]}{k_{IQ}k_{mP}}}$$

## Irreversible ungeordnete Bi-Bi-Kinetik

$$\frac{k_{cat}^+[E]_0[A][B]}{k_{IA}k_{mB}+k_{mB}[A]+k_{mA}[B]+[A][B]}$$

## Reversible Ping-Pong-Bi-Bi-Kinetik

$$\frac{\frac{k_{cat}^+[E]_0[A][B]}{k_{IA}k_{mB}} - \frac{k_{cat}^-[E]_0[P][Q]}{k_{mQ}k_{IP}}}{\frac{[A]}{k_{IA}} + \frac{k_{mA}[B]}{k_{IA}k_{mB}} + \frac{[A][B]}{k_{mB}k_{IA}} + \frac{k_{mA}[B][Q]}{k_{IA}k_{mB}k_{IQ}} + \frac{[P]}{k_{IP}} + \frac{k_{mP}[Q]}{k_{IP}k_{mQ}} + \frac{[A][P]}{k_{IA}k_{IP}} + \frac{[P][Q]}{k_{IP}k_{mQ}}}$$

## Irreversible Ping-Pong-Bi-Bi-Kinetik

$$\frac{k_{cat}^+[E]_0[A][B]}{k_{mB}[A]+k_{mA}[B]+[A][B]}$$

## Reversible abhängige Convenience-Kinetik

$$E \mathbf{x} k_l^V \frac{\prod_i \tilde{c}_{li}^{n_{il}^-} (\tilde{k}_{li}^M)^{\frac{-n_{il}}{2}} - \prod_j \tilde{c}_{lj}^{n_{jl}^+} (\tilde{k}_{lj}^M)^{\frac{n_{jl}}{2}}}{\prod_i \sum_{m=0}^{n_{il}^-} (\tilde{c}_{li})^m + \prod_i \sum_{m=0}^{n_{il}^+} (\tilde{c}_{li})^m - 1}$$

## Irreversible abhängige Convenience-Kinetik

$$E \mathbf{x} k_l^V \frac{\prod_i \tilde{c}_{li}^{n_{il}^-} (\tilde{k}_{li}^M)^{\frac{-n_{il}}{2}}}{\prod_i \sum_{m=0}^{n_{il}^-} (\tilde{c}_{li})^m}$$

## Reversible unabhängige Convenience-Kinetik

$$E \frac{k_{+}^{cat} \prod_i \tilde{c}_{li}^{n_{il}^-} - k_{-}^{cat} \prod_j \tilde{c}_{lj}^{n_{jl}^+}}{\prod_i \sum_{m=0}^{n_{il}^-} (\tilde{c}_{li})^m + \prod_i \sum_{m=0}^{n_{il}^+} (\tilde{c}_{li})^m - 1}$$

## Irreversible unabhängige Convenience-Kinetik

$$E \frac{k_{+}^{cat} \prod_i \tilde{c}_{li}^{n_{il}^-}}{\prod_i \sum_{m=0}^{n_{il}^-} (\tilde{c}_{li})^m}$$

Tabelle 3.2.: Übersicht der Kinetiken für die verschiedenen Mechanismen (ohne Modifikationsterme)  
-Teil 2.

### 3.4. CellDesigner 4.0 $\alpha$

Der CellDesigner ist ein Java-basiertes Softwaretool zum Entwurf und zur Modellierung biochemischer und genregulatorischer Netzwerke und wurde im Rahmen des *Kitano Symbiotic Systems Project* (1998-2003) [Kit03] von Funahashi [ea03] entwickelt. Der CellDesigner besitzt eine benutzerfreundliche Oberfläche zum Entwurf biochemischer Netzwerke. Die Netzwerke werden mit Hilfe von graphischen Symbolen und einer graphischen Notation entworfen. Einer veröffentlichten Umfrage nach ist der CellDesigner die mit Abstand beliebteste und wichtigste Modellierungssoftware für die Systembiologie [EK].

Abbildung 3.9.: CellDesigner 4.0 $\alpha$

Im Folgenden werden die wichtigsten Funktionen des CellDesigners aufgeführt:

- Graphische Benutzeroberfläche für den Entwurf biochemischer und genregulatorischer Netzwerke.
- Export der graphischen Darstellung der Modelle: SVG, PNG, JPEG, PDF.
- Import und Export von SBML-Modellen [MH03].
- Export der Parameterlisten (Reaktionen, Parameter, ...) im CVS-Format.
- Dynamische Simulation biologischer Netzwerke.
- Bereitstellung eines internen numerischen Integrators für Differentialgleichungen.
- Anbindung an Datenbanken (z.. *BioModels*, *PubMed*, *Entrez Gene*).
- Plattformunabhängigkeit.
- Kostenloses Lizenzierungssystem (für akademische Zwecke).



- Ab Version 4.0 $\alpha$  unterstützt der CellDesigner erstmals das Entwickeln von Plugins. Näheres dazu im Abschnitt 4.5.

Der CellDesigner bietet eine strukturierte Arbeitsoberfläche (Abbildung 3.9). Des Weiteren existiert eine ausführliche Dokumentation [IoSB07]. Er bietet für einen Reaktanden (CellDesigner: Species) verschiedene Unterscheidungsmöglichkeiten an (Abbildung 3.10). In selber Weise lassen sich auch Reaktionen in verschiedene Klassen aufteilen. Die unterstützten Reaktionen finden sich in Abbildung 3.11. Mit Hilfe des CellDesigners kann der Benutzer neben der Modellierung des Netzwerkes auch Kinetiken und Parameter einer Reaktion über eine graphische Oberfläche spezifizieren. Eine Automatisierung der Erstellung der Kinetiken und Parameter ist im CellDesigner nicht vorgesehen. Für umfangreiche Modelle gestaltet sich die manuelle Erzeugung jedoch oftmals als sehr zeitaufwändig und aufgrund der Komplexität mancher Modelle auch schwierig.

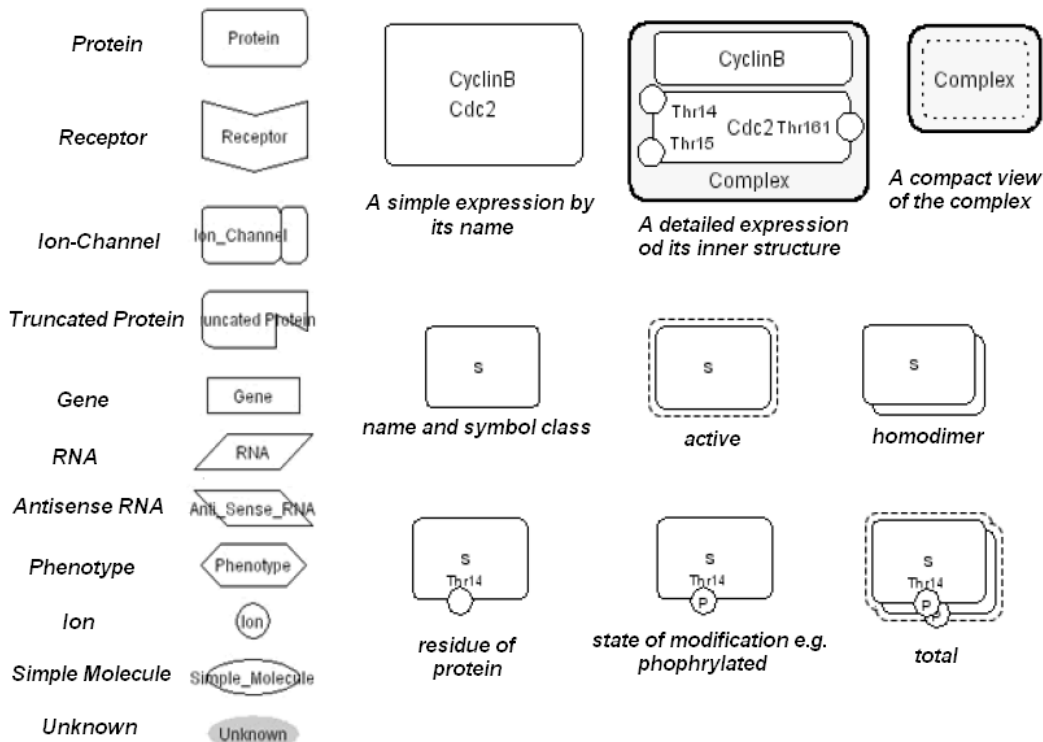


Abbildung 3.10.: Die Graphik zeigt die 12 Basisklassen, welche eine Spezies annehmen kann [IoSB07].

Da der CellDesigner die in Kapitel 3.3 besprochene Aktivierung einer Reaktion nicht als Reaktionssymbol spezifiziert hat, wird für diese Arbeit und dem SBMLsqueezer folgende Definition getroffen: Das im CellDesigner als *Unknown Catalyse* klassifizierte Reaktionssymbol wird der Aktivierung einer Reaktion zugeordnet (Abbildung 3.12).

Im CellDesigner werden die meisten Objekte (Species, Reaktionen) im SBML-Format repräsentiert. Die Entwickler des CellDesigners sind auch in der SBML-Entwicklung involviert. Objekteigenschaften, die nicht in SBML vorgesehen sind (Farbe des Objektes, Größe und Topologie etc.) werden als CellDesigner-spezifische Objekte gespeichert. Diese zusätzlichen Informationen werden

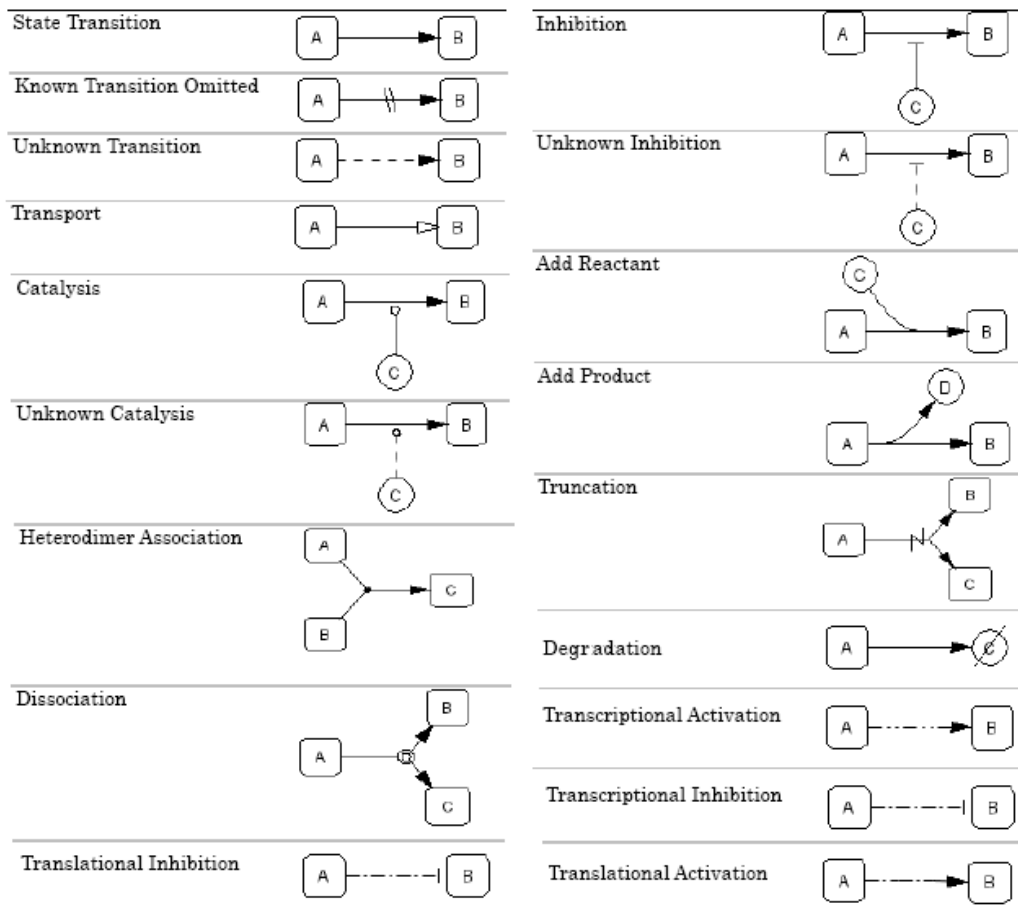


Abbildung 3.11.: Die Graphik zeigt die 13 Basisreaktionen des *CellDesigners* [IoSB07].

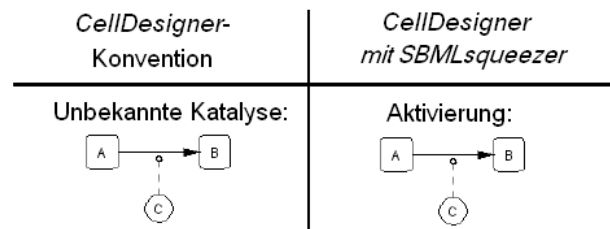


Abbildung 3.12.: Notwendige Neuordnung einer *CellDesigner*-Reaktionsklasse.

der SBML-Datei beigefügt. Es ist allerdings auch möglich, die SBML-Datei ohne CellDesigner-Informationen zu speichern.

Abschnitt 3.6 gibt daher eine kurze Einführung in SBML und anschließend eine Einführung in die vom CellDesigner über LibSBML und PluginLibSBML bereitgestellten Datenstrukturen und Zugriffsmöglichkeiten.

### 3.5. Cellerator

Der Cellerator ist ein Softwarepaket, das mit Hilfe von *Mathematica* sowohl einfache als auch Multi-Zell-Signaltransduktionsnetzwerke simulieren kann. Entwickelt wurde der Cellerator von Eric Mjølness, Andre Levchenko, und Bruce Shapiro im Jahr 2002 [BS03].

Abbildung 3.13.: Teil der Cellerator-Palette zur Modellierung von Reaktionsgleichungen [BS01].

Auch mit Hilfe des Cellerators lassen sich automatisiert gewöhnliche Differentialgleichungen (DGLs) zu Enzymreaktionen erstellen. Im einzelnen sind folgende Punkte zum Cellerator wissenswert:

- Der Cellerator benötigt zum Betrieb das lizenzpflichtige Mathematica 4.0 oder aktueller.
- Der Cellerator generiert zwar automatisch Differentialgleichungen für eine einzelne Reaktion, jedoch vermag er nicht, diese für ein ganzes Netzwerk automatisiert zu erzeugen. Dafür müsste der Benutzer für jedes Modell in Mathematica ein entsprechendes Rahmenprogramm implementieren.
- Der Cellerator unterstützt lediglich das Schreiben von Level-1-SBML-Dateien, aber nicht das Lesen. Level-2-SBML wird weder beim Lesen noch Schreiben unterstützt. Dadurch fällt ein weit verbreitetes Datenformat der Systembiologie für den Cellerator weg.
- Der Cellerator unterstützt mehrere Kinetikmodelle bzw. mathematische Modelle: u.a. Michaelis-Menten-Modelle, S-System [Sav91], Hill, sigmoidale und allosterische Modelle [BS01].

Die Oben genannten Einschränkungen die der Cellerator bei der automatischen Generierung von Kinetiken eines Modelles besitzt, sollte der SBMLsqueezer nicht aufweisen.

### 3.6. Die Systems Biology Markup Language (SBML)

Die Hauptidee hinter der Entwicklung der System Biology Markup Language (SBML) war, einen Standard zu entwickeln, der es ermöglicht, biologische und chemische Modelle zu teilen, zu bearbeiten und weiter zu entwickeln. Es gibt einige wichtige Motivationsgründe zur Definition von SBML als Standard [MH03]:

- Austausch von Modellen in der Forschungsgemeinschaft der Systembiologie.
- Austausch von Daten zwischen verschiedenen Applikationen.
- Modelle mussten bisher teilweise per Hand manuell in andere übertragen werden.
- Modelle von nicht weiterentwickelter Software gehen verloren.

SBML ist frei zugänglich und beruht auf dem XML-Format (Extensible Markup Language, engl. für erweiterbare Auszeichnungssprache). Durch die zu Grunde liegende XML-Struktur ist es möglich, mit SBML erzeugte biochemische Netzwerke in einem Textformat abzuspeichern, in welchem die Daten hierarchisch strukturiert vorliegen (siehe Abbildung 3.14).

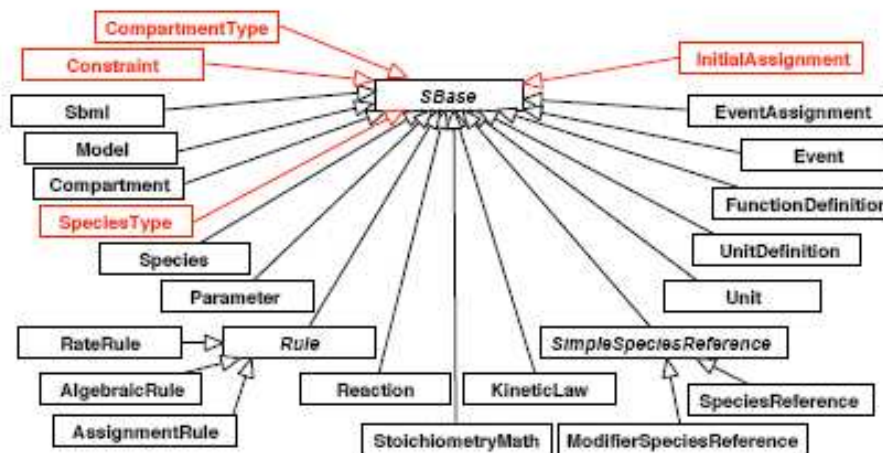


Abbildung 3.14.: Ein UML-Diagramm der Vererbungsstruktur eines SBML-Formates Level-2 Version-2 [AFN06].

#### 3.6.1. Versionen von SBML

Nachdem im April 2000 mit der Entwicklung des SBML-Formates begonnen wurde, sind inzwischen mehrere Level und Versionen von SBML erschienen. Erst kürzlich, im Juni 2007, fand die letzte

Entwicklung, die primär durch Michael Hucka, Herbert Sauro, Andrew Finney und Hamid Bolouri betrieben wurde, ihren vorläufigen Abschluss in der Spezifikation von Level-2 Version-3 [AF03]. Die Bezeichnung *Level* steht in der SBML-Terminologie für die Hauptveröffentlichung des Formates. Eine Änderung des Levels zeugt von einer substantiellen Änderung der Aufbaustruktur des Formates. Die Änderung des Levels und somit des Strukturaufbaus wurde erst einmal vorgenommen. Level 2 wurde im Juni 2003 erstmals in Form von Version-1 veröffentlicht. Level-2 stellt eine stufenweise Verbesserung und vor allem eine Erweiterung dar, die durch den wissenschaftlichen Gebrauch und die Anforderungen vieler Anwender und Entwickler in die Wege geleitet wurde. Zwar lassen sich viele Konstrukte des SBML-Level-1 Formates in Level-2 Formate überführen, jedoch besteht keinerlei Abwärts- oder Aufwärtskompatibilität. Auch lassen sich Modelle des SBML-Level-2 Formates manuell in Level-1 Formate überführen, jedoch kann es hierbei zu Datenverlust kommen. Obwohl Level-2 eine Übermenge von Level 1 darstellt, verweisen die Entwickler auf eine sinnvolle Koexistenz beider Spezifikationen. Level-2 verfügt im Gegensatz zu Level-1 über die Fähigkeit, MathML zu unterstützen, das zusätzliche Einfügen von Metadaten und sogenannte *delay functions* als Platzhalter für unbekannte Zusammenhänge ermöglicht. Inzwischen ist der Entwicklungsfokus ganz auf Level 3 ausgerichtet (geplant sind u.a. hierarchische Modelle und Netzwerkdiagramme). Im Gegensatz dazu werden geringfügige Änderungen (Fehlerkorrekturen, Anpassungen) innerhalb der Datenstrukturen als *Versionen* bezeichnet. Hinsichtlich Änderungen an der Version wird auf maximale Abwärtskompatibilität Wert gelegt.

Im Folgenden wird das Format SBML-Level-2 Version-1 näher betrachtet, da der CellDesigner 4.0 $\alpha$  in diesem Format arbeitet und speichert. Jede dieser Komponenten ist listenartig aufgebaut und optional, wodurch sich verschiedenste Modelle effizient darstellen lassen, da nur die für notwendig befundenen Inhalte in das Modell übertragen werden können. Soll jedoch ein ausführliches und komplexes Modell dargestellt werden, können durch den optionalen Aufbau auch sehr viele zusätzliche Information in der Datei abgelegt werden. Nicht nur die Komponenten, die im Folgenden kurz erläutert werden, weisen einen optionalen Charakter auf. Alle erzeugten Elemente einer Komponentenliste besitzen Attribute, die ein Element näher definieren. Diese Attribute sind ebenfalls zumeist optional. Einzig das Attribut *Id*, welches jedem Element einen eindeutigen Identifier zuweist, muss gesetzt werden, sobald ein Element erzeugt wird.

Zur Erläuterung der einzelnen Komponenten wird die SBML-Syntax übernommen (Abbildung 3.15):

**Species:** Species sind chemische Substanzen und Strukturen, die Teil einer Reaktion sind. Beispielsweise sind Moleküle und Ionen, die an einer Reaktion des entsprechenden Modells beteiligt sind, Species.

**Reaction:** Als Reaction werden Aussagen begriffen, die Transformationen, Transporte oder Bindeprozesse beschreiben, die ein oder mehrere Species verändern können. Zu der jeweiligen Reaction gehören auch die beteiligten Edukte, Produkte, Modifier, stöchiometrische Koeffizienten und die kinetischen Gesetzte.

**Compartment:** Als Compartments werden abgeschlossene Volumen betrachtet, in denen die befindlichen Species Reaktionen miteinander eingehen. Compartments müssen nicht notwendigerweise mit biologischen Strukturen wie Zellwänden gleichzusetzten sein. Es ist auch möglich, Reaktionen zwischen zwei Species, die unterschiedlichen Compartments angehören, zu modellieren. Wird bei der Erstellung des Modells kein explizites Compartment erzeugt, wird automatisch ein Default-Compartment erzeugt, in dem sich alle Species befinden.

**Parameter:** Als Parameter werden Mengen betrachtet, die Variablen in den kinetischen Gesetzen näher definieren. SBML bietet die Möglichkeit, die Parameter global für das ganze Model oder lokal nur für die jeweilige Reaktion zu definieren.

**Unit Definition:** Einheiten, die die jeweiligen Elemente beschreiben.

Es können sowohl neue Unit Definitions erzeugt werden oder Default Unit Definitions verändert werden.

**Rule:** Mathematische Aussagen, die neben den kinetischen Gesetzen für Reaktionen gesetzt werden können, um die Kinetiken zu vervollständigen, falls diese alleine nicht ausreichen, um bestimmte mathematische Bedingungen auszudrücken.

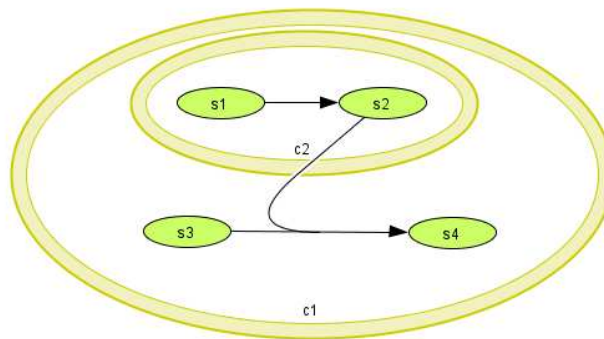


Abbildung 3.15.: Bildlicher Zusammenhang von Kompartments, Species und Reaktionen. Das Bild wurde mit CellDesigner 4.0 $\alpha$  erzeugt.

#### 3.6.2. Aufbau eines SBML-Modells

Um SBML-Modelle besser verstehen zu können, folgt ein Beispiel, an dem optionale Attribute näher beschrieben werden. Weiterhin sollen insbesondere diejenigen Attribute kurz erläutert werden, die für diese Arbeit von besonderer Wichtigkeit sind.

Erläuterungen zum SBML-Dokument (Algorithmus 1):

**Species** Die in ListOfSpecies enthaltenen Elemente Species, bekommen in den Zeilen 7 bis 13 die Attribute *id*, *name*, *compartment* und *boundaryCondition* zugewiesen.

*Id* und *compartment* sind in dieser Version nicht optional und müssen aufgeführt werden. *Name* gibt dem Benutzer die Möglichkeit, neben dem kurzen Identifier den biologisch motivierten Namen der Species mit abzuspeichern. Mit Hilfe von *BoundaryCondition* ist es dem Benutzer möglich, mit *true* und *false* anzuzeigen, ob die Konzentration der Species während der Zeit konstant bleibt oder sich verändert. Die Default-Einstellung wäre *false*, entspricht also einer Veränderung der Konzentration über die Zeit. In Abbildung 3.16 werden alle Attribute von Species mit ihren Default-Einstellungen gezeigt.

---

**Algorithmus 1** Abbildung 3.15 beschreibende SBML-Datei

---

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<sbml xmlns="http://www.sbml.org/sbml/level2" level="2" version="1">
<model id="untitled">
  <listOfCompartments>
    <compartment id="c1" name="c1" outside="default">
  </listOfCompartments>
  <listOfSpecies>
    <species id="s1" name="s1" compartment="c1" initialAmount="0">
    <species id="s2" name="s2" compartment="c1" initialAmount="0">
    <species id="s3" name="s3" compartment="c1" initialAmount="0">
    <species id="s4" name="s4" compartment="c1" initialAmount="0"
      boundaryCondition="true">
  </listOfSpecies>
  <listOfParameters>
    <parameter id="k1" value="0">
  </listOfParameters>
  <listOfReactions>
    <reaction id="re1" reversible="false">
      <listOfReactants>
        <speciesReference species="s1">
      </listOfReactants>
      <listOfProducts>
        <speciesReference species="s2">
      </listOfProducts>
      <listOfModifiers>
        <modifierSpeciesReference species="s4">
      </listOfModifiers>
    <reaction id="re2" reversible="false">
      <listOfReactants>
        <speciesReference species="s2">
      </listOfReactants>
      <listOfProducts>
        <speciesReference species="s3">
      </listOfProducts>
      <kineticLaw>
        <kineticLaw formula="k1*s3">
      </kineticLaw>
    </listOfReactions>
  </model>
</sbml>
```

---

<u>Species</u>
id: SId name: string { use = "optional" } speciesType: SId { use = "optional" } compartment: SId initialAmount: double { use = "optional" } initialConcentration: double { use = "optional" } substanceUnits: UnitSId { use = "optional" } spatialSizeUnits: UnitSId { use = "optional" } hasOnlySubstanceUnits: boolean { use = "optional" default="false" } boundaryCondition: boolean { use = "optional" default="false" } charge: int { use = "optional" } deprecated constant: boolean { use = "optional" default="false" }

Abbildung 3.16.: Definition von Species mit Attributen. [AFN06].

**Parameter** Die in ListOfParameters enthaltenen Elemente, bekommen in Zeile 14 bis 16 die Attribute *id* und *value* zugewiesen. *Id* ist auch hier ein nicht-optionaler Bestandteil und weist dem Parameter einen Identifier zu. Wird das Attribut *value* nicht gesetzt, so wird davon ausgegangen, dass der Wert Null zugewiesen ist. In Abbildung 3.17 werden alle Attribute der Parameter mit ihren Default-Einstellungen gezeigt.

<u>Parameter</u>
id: SId name: string { use = "optional" } value: double { use = "optional" } units: double { use = "optional" } units: UnitSId { use = "optional" } constants: boolean { use = "optional" default="true" } sboTerm: SBOTerm { use = "optional" }

Abbildung 3.17.: Definition von Parameter mit Attributen. [AFN06]

**Reaction** Den in ListOfReactions enthaltenen Elementen, werden in den Zeilen 17 bis 38 ListOfReactants, ListOfProducts, ListOfModifiers und KineticLaw zugewiesen. Wie an der Bezeichnung der ersten drei Attribute bereits feststellbar ist, sind dies selbst Listen mit Elementen und Attributen, welche diese wiederum näher beschreiben. *Id* ist auch hier ein fester Bestandteil. Ebenfalls kann nicht auf listOfReactants und listOfProducts bzw. listOfModifiers verzichtet werden, wenn eine Reaktion dargestellt werden soll. KineticLaw ist hingegen ein optionales Attribut, und kann gesetzt werden, wenn der Benutzer die Reaktion einer kinetischen Formel zuweisen möchte. Abbildung 3.18 verdeutlicht die Einstellungen.

Die Nutzer des SBML-Formates erstellen ihre Modelle meist nicht von Hand, es sind in der Regel Softwarewerkzeuge wie der CellDesigner, die dieses Format beispielsweise mit Hilfe von LibSBML schreiben und lesen.



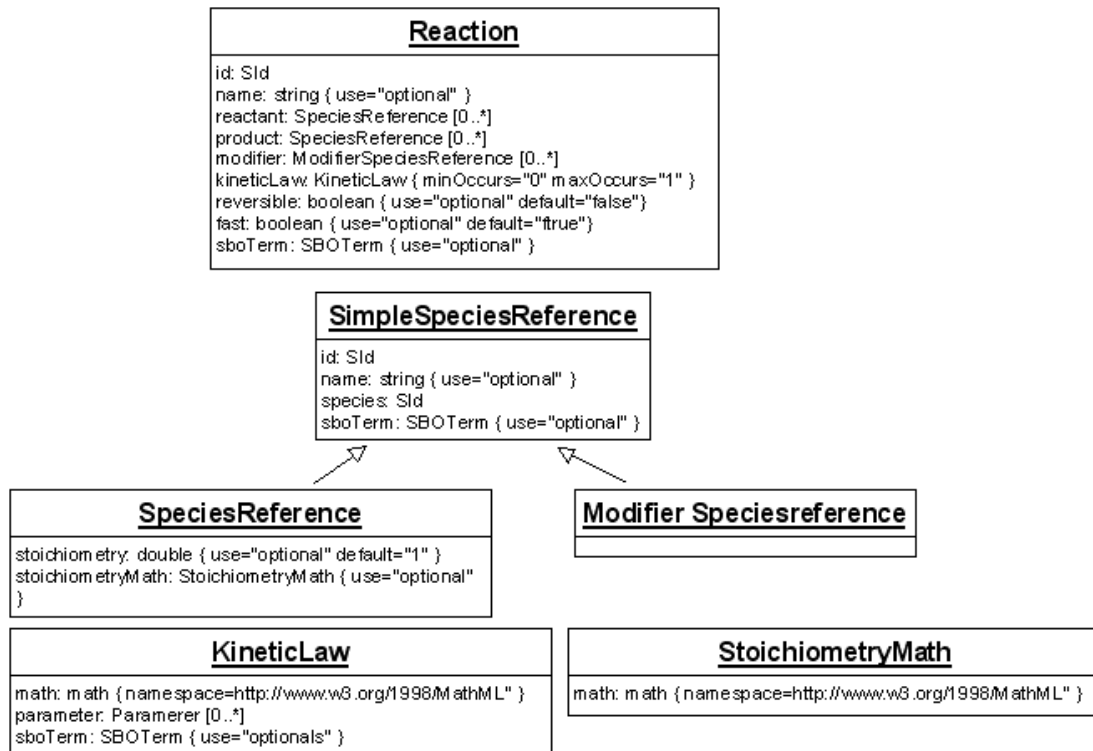


Abbildung 3.18.: Definition von Reaction, KineticLaw, SpeciesReference und ModifierSpeciesReference mit Attributen. [AFN06].

### 3.7. LibSBML

LibSBML [Bor05] ist eine Bibliothek, die die Handhabung von SBML-Dateien erlaubt. Mit Hilfe dieser Bibliothek können SBML-Dateien gelesen, geschrieben, manipuliert, translatiert und validiert werden, daher handelt es sich um ein *Application programming interface* (API). LibSBML ist selbst keine eigenständige Applikation, sondern eine Bibliothek, die in verschiedenen Programmen verwendet bzw. angewendet werden kann. Es handelt sich um *open-source* Software, deren Lizenz das freie und kommerzielle Nutzen ausdrücklich gestattet.

Im Folgenden sind die SBML-Formate aufgelistet, die unterstützt werden:

- SBML Level-1 Version-1 und Version-2 als Eingabeformat
- SBML Level-2 Version-1 als Eingabeformat

Folgende Betriebssysteme und Programmiersprachen werden unterstützt:

- Betriebssysteme: Windows, Linux, MacOS
- Programmiersprachen: C, C++, Java, Python, MATLAB, Perl, Lisp

Es stellt sich die Frage, warum zum Lesen der XML-basierten SBML-Dateien kein gängiges XML-Dokument-Object-Model (XML-DOM) zum Einlesen der SBML-Daten benutzt wird, und einfach die notwendigen Informationen extrahiert. Ein Grund, der für die Verwendung von LibSBML spricht, ist die den Daten angepasste Spezifität der dargebotenen Manipulations- und Lesewerkzeuge. Ein anderer Grund ist der Speicherplatzbedarf (Abbildung 3.19). Außerdem bietet LibSBML die Möglichkeit, Level-1 SBML-Dokumente in Level-2 Dokumente zu konvertieren.

Nachfolgend werden lediglich die wichtigsten Befehlssätze und Datenstrukturen erwähnt. Weitergehende Informationen sowie eine detailliertere Einführung bietet das LibSBML-Developers-Manual [ST07].

#### 3.7.1. SBML-Klassen in LibSBML

Jede in SBML definierte Klasse (Compartment, Parameter, Species, Reaction, KineticLaw etc.) besitzt eine korrespondierende Java-Klasse (siehe Tabelle 3.3).

Das folgende Beispiel erzeugt ein Objekt der Klasse Species:

```
Species species = new Species()
```

Will man das Objekt mit einem zugewiesenen Identifier `id` erzeugen, verwendet man folgende Notation: `Species species = new Species(java.lang.String id)`

#### 3.7.2. Zugriff und Manipulation auf Datenstrukturen

Der Zugriff auf die einzelnen Getter und Setter erfolgt trivialerweise mit `Class.getVariable()`. Nachfolgend werden exemplarisch einige Getter- und Setter-Funktionen für die Klasse Species genannt. Abbildung 3.17 zeigt eine Übersicht der Felder, die die Klasse Species besitzt.

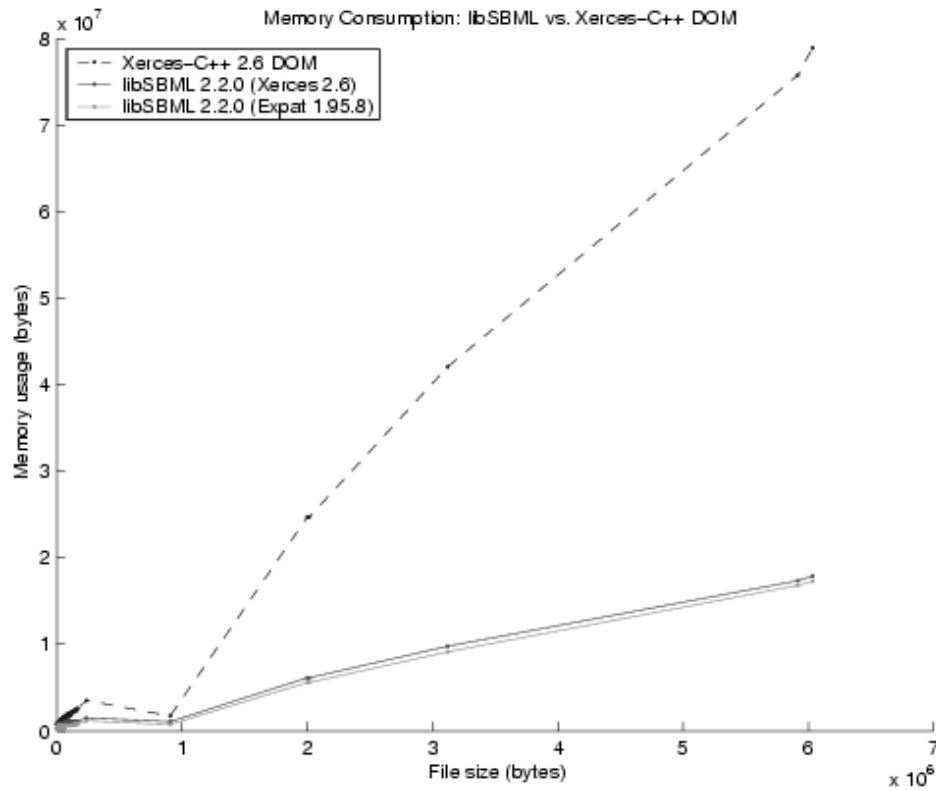


Abbildung 3.19.: Speicherplatzbedarf von *LibSBML* und *Xerxes C++ 2.6 DOM* [ST07]

SBML Klasse	Java Klasse
SBase	SBase.class
Model	Model.class
FunctionDefinition	FunctionDefinition.class
UnitDefinition	UnitDefinition.class
Compartment	Compartment.class
Parameter	Parameter.class
Species	Species.class
Reaction	Reaction.class
KineticLaw	KineticLaw.class
ParameterRule	ParameterRule.class
ModifierSpeciesReference	ModifierSpeciesReference.class
...	...

Tabelle 3.3.: Übersicht einiger SBML-Klassen und deren Repräsentation in der korrespondierenden Java-Klasse.

#### Getter-Funktionsauswahl für die Klasse *Species*

- **public double getInitialConcentration()**  
Liefert die initiale Konzentration als Double-Wert zurück.
- **public java.lang.String getId()**  
Liefert einen **id**-String als Identifikation der Species zurück. Diese **id** ist meist sehr kurz und automatisiert zugewiesen.
- **public java.lang.String getName()**  
Liefert einen **name**-String als Identifikation der Species zurück. Der **name**-String beinhaltet in der Regel den biologischen Namen und kann zum Teil sehr lang sein. Aus diesem Grund wird **name** im *SBMLsqueezer* nicht in erzeugten Kinetiken verwendet.
- **public java.lang.String getCompartment()**  
Liefert das **compartment** in Form eines Strings. Mit Hilfe dieses Wertes kann das compartment, dem diese Species angehört, eindeutig bestimmt werden.
- **public boolean getBoundaryCondition()**  
Liefert einen booleschen Wert zurück, der eine Aussage über die Konstanz der Konzentration dieser Species macht. *True* bedeutet, dass sich die Konzentration dieser Species auch dann nicht verändert, wenn diese an Reaktionen beteiligt ist, und dort eigentlich verbraucht werden würde. Als Konsequenz daraus, muss auch das Differentialgleichungssystem dieser Species konstant 0 gesetzt werden.
- **public int getCharge()**  
Liefert die Ladung der Species als int-Wert zurück.

#### Setter-Funktionensauswahl für die Klasse *Species*

- **public void setInitialConcentration (double arg0)**  
Setzt die initiale Konzentration auf eine Kopie von **arg0**.
- **public void setID (java.lang.String arg0)**  
Setzt die Identifikation der Species auf eine Kopie von **arg0**.
- **public void setName (java.lang.String arg0)**  
Setzt den Namen der Species auf eine Kopie von **arg0**.
- **public void setBoundaryCondition (boolean arg0)**  
Setzt die Begrenzungskondition der Species auf eine Kopie von **arg0**.
- **public void setCharge (int arg0)**  
Setzt die Ladung der Species auf eine Kopie von **arg0**.

#### Zustandsabfragen für die Klasse *Species*

LibSBML unterstützt auch die Zustandsabfrage, ob ein optionales Feld (Abbildung 3.20) gesetzt ist. Dies wird mit folgendem Aufruf erreicht:

```
public boolean isSetName( )
```

Ist der Species ein Name zugewiesen worden, so liefert die Funktion *true* als Rückgabe, sonst *false*. Eine detaillierte Übersicht findet sich im Usermanual [ST07].

### 3.7.3. Einfaches Beispiel in Java

Das folgende sehr einfache Beispielprogramm (Algorithmus 2) lädt zunächst die SBML-Bibliothek. Anschließend wird mit Hilfe eines erzeugten `SBMLReader()`-Objektes ein SBML-Dokument eingelesen und das `SBMLDocument` erzeugt. Mit der Methode `getModel()` dieses Objektes erhält der Benutzer Zugriff auf das Modell. Die Klasse `Model` selbst hat als Variablen einige Listen, unter anderem **`Model.ListOfSpecies`** - eine *private* Liste aller dem Modell angehörigen Species der Klasse `Species`. Mit Hilfe der Getter-Funktion `Model.getListOfSpecies()` kann auf diese Liste zugegriffen werden. Die Anzahl der Species ist mit Hilfe der Variable **`Model.NumOfSpecies`** abgreifbar, welche vom Typ `Integer` ist, und auf die ebenfalls mit Hilfe einer Getter-Methode Zugriff genommen werden kann. Nun wird in dem Beispielprogramm die Liste **`Model.ListOfSpecies`** iterativ durchlaufen und der Name der Species, die Compartment-Zugehörigkeit sowie der `InitialAmount` ausgegeben:

---

**Algorithmus 2** Ein einfaches LibSBML Programm in Java

---

```
import org.sbml.libsbml.*;

public class Demo{

    public static void main(String args[]){
        System.loadLibrary("sbml");

        SBMLReader reader = new SBMLReader();
        SBMLDocument document = reader.readSBML("/home/sbml-file.xml");
        Model model = document.getModel();
        ListOf listOfSpecies = model.getListOfSpecies();

        for(int i = 0; i < model.getNumSpecies(); i++){
            Species species = (Species)listOfSpecies.get(i);
            System.out.println(
                species.getId() + " " +
                species.getName() + " " +
                species.getCompartment()
            );
        }
    }
}
```

---

## 3.8. PluginLibSBML

Der CellDesigner 4.0  $\alpha$  erlaubt es Entwicklern erstmals, die Funktionen des CellDesigners zu erweitern. In diesem Abschnitt wird erläutert, wie ein solches Plugin auf Basis der Bibliothek `PluginLibSBML` entwickelt wird, und welche Möglichkeiten dem Programmierer zur Verfügung stehen. Anschließend wird kurz auf die programmiertechnische Integration des `SBMLsqueezers` in den CellDesigner eingegangen.

In Kapitel 3.4 wurde erwähnt, dass der CellDesigner zusätzliche Informationen in das SBML-Dokument einbaut. Es handelt sich dabei im wesentlichen um zwei zusätzliche Arten von Informatio-

nen (Algorithmus 3):

**Layout-Informationen** Position und Farbe des Objektes im Modellierungsfenster des CellDesigners. Die Daten werden dem SBML-Dokument als *annotation*-Teil zugefügt. In der XML-Struktur liegt dieser Punkt hierarchisch unter *Model* und liegt global vor.

**Strukturelement-Informationen** Den meisten Strukturelementen wie Compartment, Species oder Reaction werden CellDesigner-spezifische Informationen zugefügt. Diese werden ebenfalls als *annotation* gespeichert. Sie liegen in der Regel lokal im XML-Dokument bei dem jeweiligen Strukturelement vor. Für die Entwicklung des SBMLsqueezers sind sowohl der Typ jeder Species (Ion, RNA, Protein,...) als auch der Typ der Reaktion (Inhibition, Katalyse, unbekannte Katalyse,...) von besonderer Bedeutung.

Mit Hilfe von LibSBML kann auf diese zusätzlichen Informationen nur in ungenügender Form, nämlich auf den gesamten Annotations-String, zugegriffen werden. Getter- und Setterfunktionen existieren für diese Variante nicht. Zur Implementation der in Abschnitt 3.3 behandelten mathematischen Modelle ist es jedoch zwingend notwendig zu wissen, um was für Reaktionstypen und um welche Arten von Species es sich bei den Reaktanden handelt. Ionen beispielsweise, die als Katalysator modelliert wurden, sind keine Enzyme, und können daher auch nicht durch Enzymkinetiken dargestellt werden. Diese Reaktion wird mit Hilfe der generalisierten Massenwirkungskinetik modelliert. Diese Differenzierung kann mit Hilfe von PluginLibSBML gemacht werden, eine Erweiterung und Anpassung von LibSBML zur Implementierung von Plugins für den CellDesigner. Die Bibliothek stellt, neben der Schnittstelle zum Plugin, auch für die erwähnten CellDesigner-spezifische Informationen Getter- und Settermethoden zur Verfügung.

---

**Algorithmus 3** Vom CellDesigner zugefügte Informationen zum SBML-Dokument.

---

```
<sbml>
  <model>
    <annotation> LAYOUT INFORMATIONEN </annotation>
    <listOfSpecies>
      <species>
        <annotation> LAYOUT INFORMATIONEN </annotation>
      </species>
    </listOfSpecies>
  </model>
</sbml>
```

---

#### 3.8.1. Integration des SBMLsqueezers in den CellDesigner

Als Entwicklungsumgebung eines Plugins wird benötigt:

- CellDesigner 4.0  $\alpha$
- JDK 1.5.0
- Eclipse (getestet mit Version 3.2.1)

Sind anschließend die notwendigen Ressourcenbibliotheken (celldesigner.jar und sbmlj.jar) in dem Projekt eingebunden, kann mit der Entwicklung des Plugins begonnen werden. Um ein Plugin für den CellDesigner zu entwerfen, sollte der Entwickler zunächst folgende Schritte sequentiell durchlaufen: Im ersten Schritt wird die Plugin-Klasse geschrieben. Diese muss die Klasse CellDesignerPlugin.class erweitern. Der CellDesigner wird dann den Konstruktor dieser Plugin-Klasse instanzieren (Algorithmus 4).

---

**Algorithmus 4** Plugin-Klassenrumpf

---

```
import jp.sbi.celldesigner.plugin.*;

public class SamplePlugin extends CellDesignerPlugin {
    public SamplePlugin() {
    }
}
```

---

**2. Die Action-Klasse schreiben.** Die Action-Klasse, welche die PluginAction.class vom CellDesigner erweitert wird benötigt, um ein Action-Event auszulösen. Wählt ein Benutzer in der CellDesigner-Graphikoberfläche den Menüpunkt des Plugins aus, so wird ein Event weitergeleitet, welches dann in einer Methode myActionPerformed() abgefangen werden kann (Algorithmus 5).

---

**Algorithmus 5** Action-Klasse

---

```
import java.awt.event.ActionEvent;
import javax.swing.JMenuItem;
import jp.sbi.celldesigner.plugin.*;

public class SamplePluginAction extends PluginAction {
    private SamplePlugin plugin;

    public SamplePluginAction(SamplePlugin plugin) {
        this.plugin = plugin;
    }

    public void myActionPerformed(ActionEvent e) {
        // CODE FOR ACTION EVENT
    }
}
```

---

**3. Ein Menü sowie dessen Menü-Unterpunkte für den CellDesigner entwerfen.** Um das Plugin in der graphischen Benutzeroberfläche überhaupt sichtbar zu machen, müssen zuvor mit Hilfe der Klassen PluginMenuItem.class und PluginMenu.class Menüpunkte erzeugt werden. Dies geschieht in der Regel im Konstruktor der Plugin-Klasse aus Schritt 1 (Algorithmus 7).

**4. Die Action-Klasse beim PluginMenü registrieren.** Ist die Menüstruktur erzeugt, muss noch der Action-Klasse aus Schritt 2 das zugehörigen PluginMenuItem zugeordnet werden. Nur so kann ein Ereignis der Action-Klasse übergeben werden (Algorithmus 7).

- 5. Notwendige Methoden implementieren, um Ereignisse vom CellDesigner zu empfangen.** Die in Algorithmus 7 beschriebenen Methoden müssen implementiert werden, damit die Kompilierung nicht fehlschlägt. Diese sind notwendig, damit das Plugin Ereignisse empfangen kann, die bei der Arbeit eines Benutzers mit dem CellDesigner ausgelöst werden.

---

**Algorithmus 6** Plugin-Klasse für den SBMLsqueezer

---

```
import java.awt.event.ActionEvent;
import javax.swing.JMenuItem;
import jp.sbi.celldesigner.plugin.*;

public class SamplePluginAction extends PluginAction {
    private SamplePlugin plugin;

    public SamplePluginAction(SamplePlugin plugin) {
        this.plugin = plugin;
    }

    public void myActionPerformed(ActionEvent e) {
        if (((JMenuItem)e.getSource()).getText() == plugin.menuItem1.getText()) {
            Gui SBMLsqueezer = new Gui(plugin);
            SBMLsqueezer.getJFrameMainFrame().setVisible(true);
        }
    }
}
```

---

Im Falle des SBMLsqueezer-Plugins wird mit dem Drücken des Menüitems eine Instanz der Klasse `Gui.class` erzeugt. Dem Konstruktor werden die Modellinformationen mit Hilfe des Objektes `SamplePlugin` zur Verarbeitung und Manipulation übergeben. Die Klasse `Gui.class` baut die graphische Benutzerschnittstelle (GUI) des SBMLsqueezers auf (Algorithmus 6). Die Funktionalität und der Aufbau des SBMLsqueezers wird in Kapitel 4.1 erläutert.

Seinen Abschluss findet die Implementation des Plugins in der Archivierung des kompilierten Java-Projektes in Form eines Java-jar-Archivs, und dessen Einbindung in das Plugin-Installationsverzeichnis des CellDesigners. Dieser lädt beim Starten alle gültigen Java-jar-Archive, die sich in dem Plugin-Verzeichnis befinden.



---

**Algorithmus 7** Plugin-Klasse für den SBMLsqueezer

---

```
import jp.sbi.celldesigner.plugin.*;

public class SamplePlugin extends CellDesignerPlugin {
    public PluginMenu menu;
    public PluginMenuItem menuItem1;

    public SamplePlugin() {
        menu = new PluginMenu("SBMLsqueezer");
        SamplePluginAction action = new SamplePluginAction(this);
        menuItem1 = new PluginMenuItem("SBMLsqueezer", action);
        menu.add(menuItem1);
        addCellDesignerPluginMenu(menu);
    }
    public void addPluginMenu() {
    }

    // Methode is invoked, when SBase is added on CellDesigner
    public void SBaseAdded(PluginSBase arg0) {
    }

    // Methode is invoked, when SBase is changed on CellDesigner
    public void SBaseChanged(PluginSBase arg0) {
    }

    // Methode is invoked, when SBase is deleted on CellDesigner
    public void SBaseDeleted(PluginSBase arg0) {
    }

    // Methode is invoked, when model is closes on CellDesigner
    public void modelClosed(PluginSBase arg0) {
    }

    // Methode is invoked, when model is opened or created on CellDesigner
    public void modelOpened(PluginSBase arg0) {
    }

    // Methode is invoked, when model is changed on CellDesigner
    public void modelSelectChanged(PluginSBase arg0) {
    }
}
```

---

### 3.9. Experimentelle Testnetzwerke

Um den SBMLsqueezer zu testen und seine Funktionalität darzulegen, werden Kinetiken zu verschiedenen Testdaten mit Hilfe des SBMLsqueezers erzeugt. Zu diesem Zwecke wurden im wesentlichen drei Testnetzwerke aufgegriffen bzw. entwickelt.

Beim ersten Netzwerk handelt es sich um eine Aneinanderreihung von verschiedenen Basiskomponenten realer Modellnetzwerke. Beim zweiten Netzwerk handelt es sich um ein nicht-veröffentlichtes T-Zell-Signaltransduktionsnetzwerk, mit der sich das CD3/CD28-abhängige T-Zell Verhalten mit verschiedenen Stimuli untersuchen läßt [Sch06]. Das dritte Netzwerk ist ein veröffentlichtes metabolisches Netzwerk des Glucosestoffwechsels von *Escheria Coli* [CC02].

#### 3.9.1. Grundlegende Reaktionskomponenten

Um die Implementation zu testen, wird ein einfaches und kleines, im CellDesigner erzeugtes, Modell herangezogen. Dieses Modell spiegelt kein verzweigtes oder komplexes Netzwerk wieder, sondern besteht aus sechs Reaktionen mit insgesamt 22 Komponenten in einem Kompartiment (Abbildung 3.20). Diese sechs von einander verschiedenen Reaktionen (Tabelle 3.5) sollen es ermöglichen, die verschiedenen Einstellungsmöglichkeiten des SBMLsqueezers zu testen. Die biologischen Netzwerke, die im Folgenden kurz vorgestellt werden, bieten aus einigen Gründen nicht die Möglichkeit, die Fähigkeiten des SBMLsqueezers auf angemessene Weise darzulegen. Die beiden biologischen Systeme wurden entweder nicht im CellDesigner mit den benötigten Konventionen erstellt oder liefern durch die Art der enthaltenen Reaktionen keine wünschenswerte Vielfalt zum Testen des Programms. Um die Arbeitsweise besser verstehen zu können, wurde den einzelnen Reaktanden dieses Modells keinen Namen zugewiesen. Es wurde lediglich mit den zugewiesenen Identifizierungskürzeln (Ids) gearbeitet, um die Reaktionsgleichungen und Kinetiken überschaulich zu gestalten.

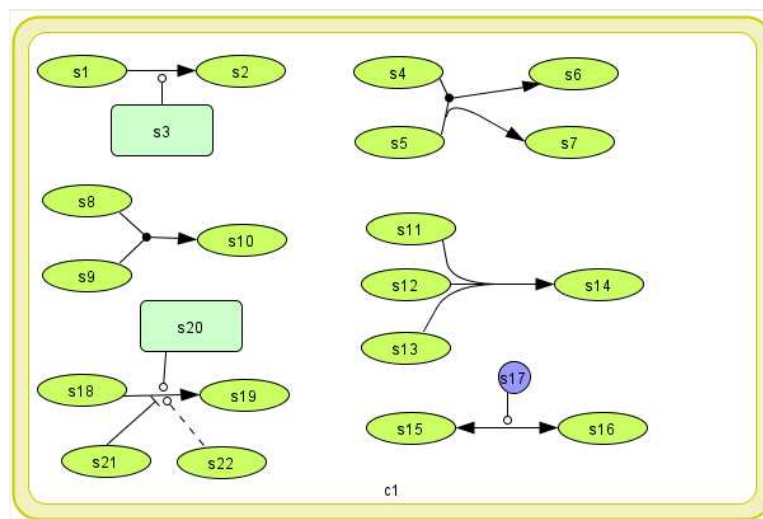


Abbildung 3.20.: Modell mit Basiskomponenten, im CellDesigner 4.0α erstellt, um die Arbeitsweise des Plugins darzustellen.

Id	Reaktion	Mechanismus
re1	$[s_1] + [s_3] \longrightarrow [s_2] + [s_3]$	Uni-Uni-Enzymreaktion
re2	$[s_8] + [s_9] \longrightarrow [s_{10}]$	Bi-Uni-Reaktion
re3	$[s_{18}] + [s_{20}] \xrightleftharpoons[s_{22}]{s_{21}} [s_{19}] + [s_{20}]$	Uni-Uni-Enzymreaktion mit Aktivierung/Inhibition
re4	$[s_4] + [s_5] \longrightarrow [s_6] + [s_7]$	Bi-Bi-Reaktion
re5	$[s_{11}] + [s_{12}] + [s_{13}] \longrightarrow [s_{14}]$	Tri-Uni-Reaktion
re6	$[s_{15}] + [s_{17}] \longleftrightarrow [s_{16}] + [s_{17}]$	Uni-Uni-Katalysereaktion

Tabelle 3.4.: Reaktionen des Modells mit Basiskomponenten und zugehörige Mechanismen.

### 3.9.2. Modell 2: T-Zell-Signaltransduktionsnetzwerk

Das Modell des T-Zell-Transduktionsnetzwerks gehört zu den wenigen Modellierungen eines biochemischen Netzes einer eukaryotischen Zelle. Diese Netze sind auf Grund ihrer enormen Komplexität immer noch eine große Herausforderung und sind bisher nur selten erfolgreich modelliert worden, im Gegensatz zu genregulatorische und metabolische Systeme in Bakterienzellen.

Die experimentellen Daten, die zum Entstehen dieses Signaltransduktionsnetzwerks geführt haben, stammen aus Versuchen des Interfakultären Instituts für Zellbiologie der Universität Tübingen von Karsten Köhler und Dr. Roland Brock. Mit einer dort entwickelte Versuchsanordnung auf Basis von stimulatorischen Antikörper-Microarrays wurde versucht, Einblicke in die dynamische Regulation des Transkriptionsfaktors NFAT in Abhängigkeit unterschiedlicher Stimulationen der T-Zell-Rezeptoren CD3 und CD28 zu gewinnen. Das zugehörige mathematische Modell wurde anhand eines vereinfachten Reaktionsschemas im Rahmen einer Diplomarbeit von Adrian Schröder in der Fakultät Informatik im Arbeitsbereich Rechnerarchitektur in Tübingen unter Prof. Dr. Andreas Zell erstellt. Das Ziel dieser Arbeit war es, dem biologischen Hintergrund entsprechend, mathematische Modelle zu erzeugen und durch Parameteroptimierungen so anzupassen, dass die gewonnenen biologischen Daten so gut wie möglich simulieren werden können [Sch06]. Diese Arbeit lieferte Ergebnisse, die den biologischen Daten sehr nahe kommen und eine hohe Genauigkeit aufweisen. Durch diese Tatsache können die vom SBMLsqueezer erzeugten Daten mit Kinetiken verglichen werden, die den biologischen Hintergrund gut widerspiegeln und nicht nur auf Gesetzmäßigkeiten beruhen.

Das T-Zell-Signaltransduktionsnetzwerk wurde mit vereinfachten Reaktionsmechanismen im CellDesigner graphisch modelliert und mit den manuell dazu erzeugten Kinetiken im SBML-Format des CellDesigners abgespeichert (Abbildung 3.21 und Abbildung 3.22). Das Netzwerk besteht aus 35 mathematisch modellierten Reaktionen mit insgesamt 46 Komponenten, wobei circa ein Drittel der Reaktionen enzymatische Prozesse widerspiegeln. Die enthaltenen Reaktionen stellen nur Uni-Uni-Enzymmechanismen, die durch die Michaelis-Menten-Kinetiken beschrieben werden, und gewöhnliche Reaktionen nach dem Massenwirkungsgesetz dar. Die Reaktionen des Netzwerkes unterliegen auch keiner weiteren Modifikation, wie einer Inhibition und Aktivierung, und sind dadurch weniger komplex und aufwendig.

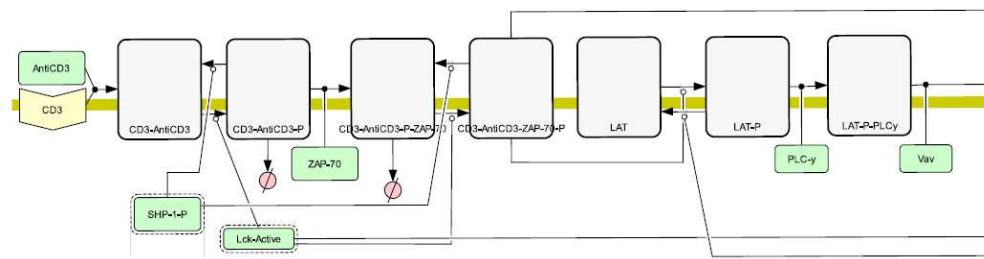


Abbildung 3.21.: Netzwerktopologie des Modells der T-Zell-Signaltransduktion als CellDesigner3.2-Graphik. Teil 1: Aktivierung des Hauptrezeptors CD3 bis zur Bildung des LAT-Signalsoms [Sch06].

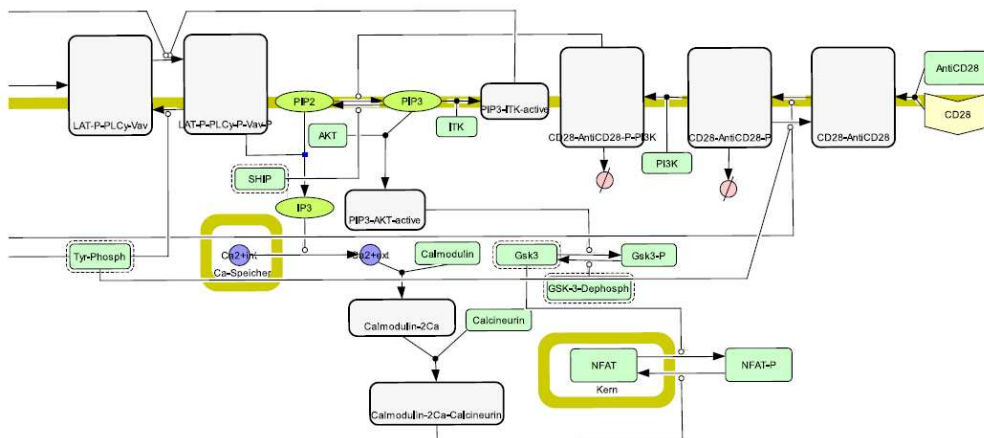


Abbildung 3.22.: Netzwerktopologie des Modells der T-Zell-Signaltransduktion als CellDesigner3.2-Graphik. Teil 2: Aktivierung des Korezeptors CD28 bis zur CD3- und CD28-abhängigen NFAT-Translokation [Sch06].

### 3.9.3. Modell 3: Glykolyisenetzwerk *Escherichia coli*

Die Untersuchung von metabolischen Netzwerken ist gegenüber den Signaltransduktionsnetzwerken bei weitem besser und differenzierter untersucht worden, da es sich um weniger komplexe Modelle handelt. Dennoch sind diese Netzwerke keinesfalls klein. Besonders ausgiebiger Forschung unterliegt das Bakterium *Escherichia coli*. An diesem Bakterium wurden wegen seiner relativen Einfachheit viele grundlegende Mechanismen und regulatorische Effekte erforscht.

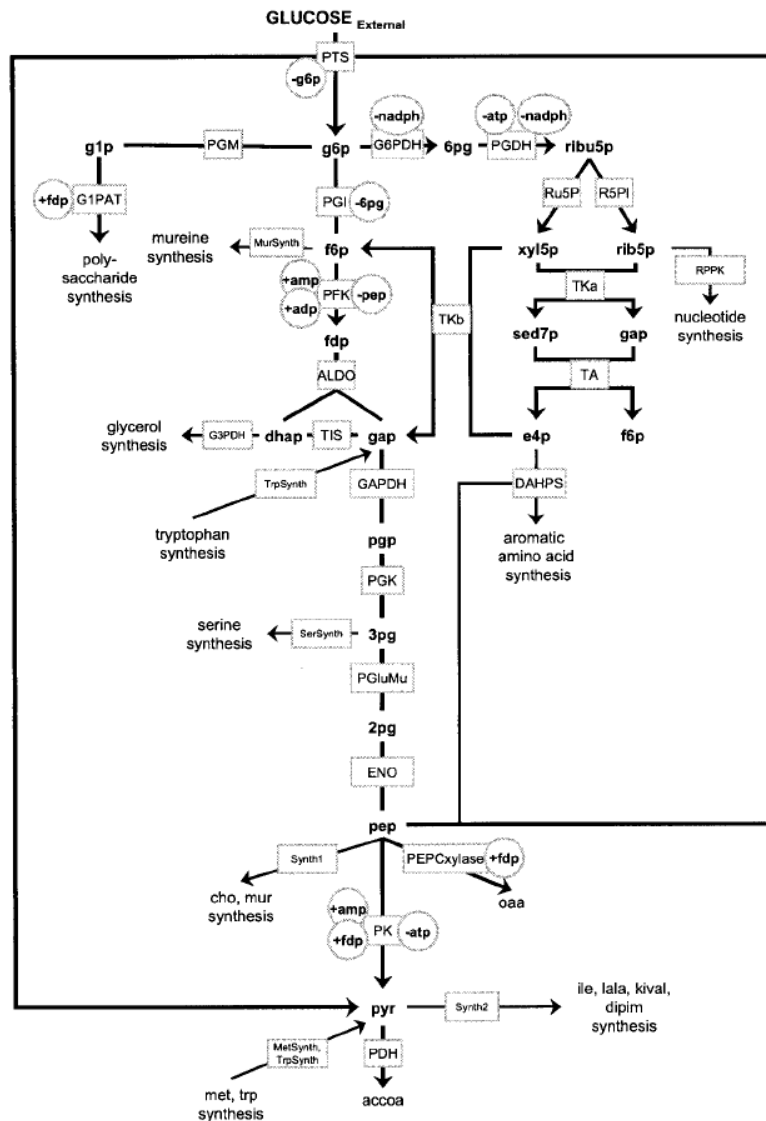


Abbildung 3.23.: Struktur des metabolischen Modells der Glykolyse von *E.coli* [CC02].

Ein sehr wichtiges Stoffwechselmodell ist der Kohlenstoffzyklus von *Escherichia coli*. Dieses Modell wurde schon seit Jahrzehnten ausgiebig untersucht, weshalb es zu den 30 Reaktionen des Modells viele Informationen gibt. Es ist daher nicht verwunderlich, dass sich zu diesem Modell mit seinen 30

Reaktionen viele ausführliche Informationen finden lassen. Die Daten, die für dieses Modell herangezogen wurden, stammen aus der Arbeit von Christophe Chassagnole, Naruamol Noisommit-Rizzi, Joachim W. Schmid, Klaus Mauch und Matthias Reuss vom Institut für Verfahrenstechnik der Universität Stuttgart [CC].

Ziel der Arbeit von Chassagnole et al. war es, aufgrund von publizierten Informationen über die Reaktionskinetiken, die aus in-vitro-Versuchen gereinigter Enzyme entstammen, mit den Parametern so zu optimieren um den realen biologischen Verläufen so nahe wie möglich zu kommen. In Fällen, in denen die experimentellen Kinetiken nicht flexibel genug waren, wurde auf empirische mathematische Modelle zurückgegriffen. Die verwendeten mathematischen Modelle sind in Tabelle 3.5 aufgelistet. Dieses Modell ist gegenüber dem Signaltransduktionsnetzwerk mit vielen verschiedenen Reaktionsmechanismen ausgestattet. Einige Reaktionen unterliegen auch Modifikationen (Tabelle 3.5). Auch hier besteht der Nachteil darin, dass dieses Modell ohne die in dieser Arbeit getroffenen Konventionen erstellt wurde. Auch wurde das Netzwerk nicht mit dem CellDesigner graphisch entwickelt (Abbildung 3.23). Insbesondere ist es wichtig zu erwähnen, dass die zusätzlichen Daten hinsichtlich Reaktionstyp und Speciestyp im SBML-Dokument nicht oder nur unzureichend eingearbeitet, jedoch von der Arbeitsgruppe um Chassagnole bei der manuellen Entwicklung der Reaktionskinetiken berücksichtigt wurden. Zu erwarten ist daher, dass es zu deutlichen Differenzen zwischen den vom SBMLsqueezer erzeugten Kinetiken und den veröffentlichten Kinetiken kommen wird.

Nummer	Reaktion	Kinetik	Akti.	Inhib.
1	PTS	byLiao et al.		X
2	PGI, PGM	Reversible Michaelis-Menten		X
3	PGM	Reversible Michaelis-Menten		
4	G6PDH	Irreversible Bi-Uni-Michaelis-Menten		X
5	PFK	Allosterisches Enzym	X	X
6, 7, 8	TA, TKa und TKb	Reversible Massenwirkungskinetik		
9, 13, 25	Mureine-, Tryptophan-, Methionin-Synthese	Konstantes Level		
10	Aldo	Geordneter Bi-Uni-Mechanismus		
11, 15	GAPDH, PGK	Reversible Bi-Uni-Michaelis-Menten		
12	TIS	Reversible Michaelis-Menten		
14, 16, 29	G3PDH, Serin-Synthes, RPPK	Michaelis-Menten		
17, 18	PGluMu, ENO	Reversible Michaelis-Menten		
19	PK	Allosterische Regulation	X	X
20	PEPCxylase	Bi-Uni-Gleichung mit allosterischer Aktivierung	X	
21, 22	Synthese 1 und 2	Michaelis-Menten		
23, 24	DAHPS, PDH	Hill-Gleichung		
26	PGDH	Irreversible Bi-Uni-Michaelis-Menten		X
28, 27	Ru5P und R5PI	Reversible Massenwirkungskinetik		
30	G1PAT	Allosterische Aktivierung	X	

Tabelle 3.5.: Reaktionen des Basismodells mit zugehörigem Mechanismus.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. SBMLsqueezer

#### 4.1.1. Aufbau und Funktionalität

Der entwickelte SBMLsqueezer ist als Plugin für den CellDesigner 4.0 $\alpha$  entworfen worden und in diesen voll integriert. Der SBMLsqueezer präsentiert sich mit einer graphischen Benutzeroberfläche. Das Softwaretool bietet die Möglichkeit, für ein im CellDesigner geladenes Modell, sowohl die Reaktionsparameter als auch die Reaktionskinetiken für alle Reaktionen zu entwerfen. Dabei können folgende mathematischen Modelle als Grundlage dienen:

- Generalisierte Massenwirkungskinetik
- Michaelis-Menten-Kinetik
- Geordnete Bi-Uni-Kinetik
- Ungeordnete Bi-Uni-Kinetik
- Geordnete Bi-Bi-Kinetik
- Ungeordnete Bi-Bi-Kinetik
- Ping-Pong-Bi-Bi-Kinetik
- Convenience-Kinetik für unabhängige Parameter
- Convenience-Kinetik für abhängige Parameter

Für jeden Reaktionsmechanismus ist sowohl eine reversible als auch eine irreversible Form implementiert. Der SBMLsqueezer ist ebenfalls in der Lage, Modifikationen, wie Inhibition oder Aktivierung, zu erfassen und diese in die Reaktionskinetiken einfließen zu lassen. Er generiert die Reaktionsparameter und Kinetiken entsprechend der vom Benutzer eingestellten Parametern vollautomatisch und vermag die erzeugten Daten sowohl in den CellDesigner, und damit in das erweiterte SBML-Dokument zu transferieren, als auch die erzeugten Daten in verschiedenen Formaten (L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X- und Textformat) abzuspeichern. Auch kann der Benutzer zwischen der kompletten Neugenerierung aller Daten oder der Vervollständigung fehlender Daten wählen. Eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus und der Parametrisierung des SBMLsqueezers liefert der folgende Abschnitt.

#### 4.1.2. Graphisches Benutzerinterface

Bei der Gestaltung der graphischen Benutzerschnittstelle wurde auf Bedienungsfreundlichkeit durch Verständlichkeit und Übersichtlichkeit geachtet. Aus diesem Grund wurden den einzelnen graphischen Objekten Kurzbeschreibungen in Form von Tooltips zugefügt. Dieses Kapitel beschreibt die einzelnen Fenster des Benutzerinterface vom SBMLsqueezer ausführlich, und gibt einen Einblick in die Funktionsweise des SBMLsqueezers.

## Mainframe

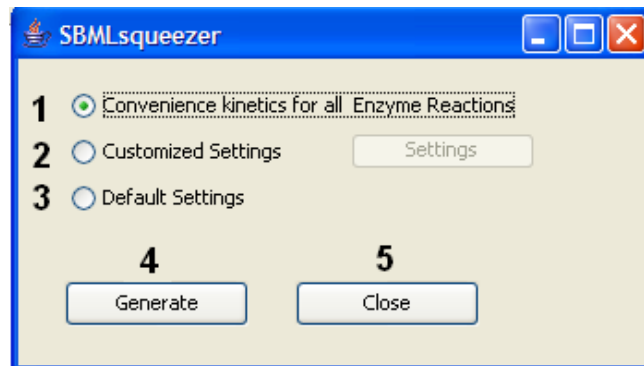


Abbildung 4.1.: Das MainFrame des SBMLsqueezers.

Startet der Benutzer durch Auswahl des SBMLsqueezers-Menüitems im Plugin-Menü des Cell-Designers den SBMLsqueezer, so wird das Startfenster (MainFrame, Abbildung 4.1) des SBMLsqueezers sichtbar. Im MainFrame steht zunächst eine Auswahlmöglichkeit in Form einer Gruppe von drei RadioButtons zur Verfügung. Diese spezifizieren, welche Parametereinstellung zur automatischen Generierung der Kinetiken verwendet werden soll. Weiterhin kann der Benutzer entweder den automatischen Generierungsprozess mit Hilfe des PushButtons *Generate* starten, oder den SBMLsqueezer mit dem Pushbutton *Close* schließen.

**RadioButton-Group** Diese RadioButton Gruppe spezifiziert, welche Parameterkonstellation zur Generierung der Kinetiken und Reaktionsparameter verwendet werden. Es kann jeweils nur ein RadioButton dieser Gruppe aktiv sein.

**Customized Settings** Ist diese Option aktiviert, so wird der PushButton *Settings* aktiv. Diese Option erlaubt dem Benutzer die Anpassung wichtiger Parameter, die einen Einfluss auf die automatische Generierung der Kinetiken und Reaktionsparameter haben. Diese Parameter sollten den jeweiligen Modelleigenschaften individuell angepasst werden.

**Default Settings** Bei Auswahl dieser RadioBox werden die Default-Einstellungen hinsichtlich der SBMLsqueezer-Parameter verwendet. Eine Übersicht der Default-Einstellung findet sich im Abschnitt SettingsFrame.

**Radio Button: Convenience kinetics for all Enzyme Reactions** Ist diese Option ausgewählt, so werden die Default-Settings verwendet, jedoch mit der Einschränkung, dass alle als Enzymreaktionen identifizierten Reaktionen mit Hilfe der Convenience-Kinetik modelliert werden. Für alle anderen Reaktionen werden die Kinetiken mit der generalisierten Massenwirkungskinetik erzeugt.

**PushButton: Settings** Dieser Button wird nur aktiv, wenn die RadioBox *Customized Settings* ausgewählt ist. Drückt man anschließend auf den Button *Settings*, wird das MainFrame unsichtbar, und das SettingsFrame sichtbar.

**PushButton: Generate** Mit Hilfe dieses Buttons wird der Prozess der automatischen Erzeugung von kinetischen Gleichungen entsprechend der gewählten Parametereinstellung gestartet. Ist die Er-



zeugung von Kinetiken und Reaktionsparameter abgeschlossen, so wird das MainFrame unsichtbar, und das ReactionListFrame sichtbar.

**PushButton: Close** Drückt man den Button *Close*, so wird der SBMLsqueezer geschlossen, ohne das Kinetiken oder Reaktionsparameter erzeugt oder in den CellDesigner transferiert wurden.

## SettingsFrame

Das SettingsFrame gibt dem Benutzer die Möglichkeit, einerseits die eingestellten Parameter des SBMLsqueezers einzusehen und andererseits diese zu manipulieren bzw. manipulierte Einstellungen wieder auf Default-Einstellung zurückzusetzen. Weiterhin ist es möglich, die eigenen gewählten Einstellungen für Dokumentationszwecke oder zur Wiederverwendung zu speichern und zu laden.

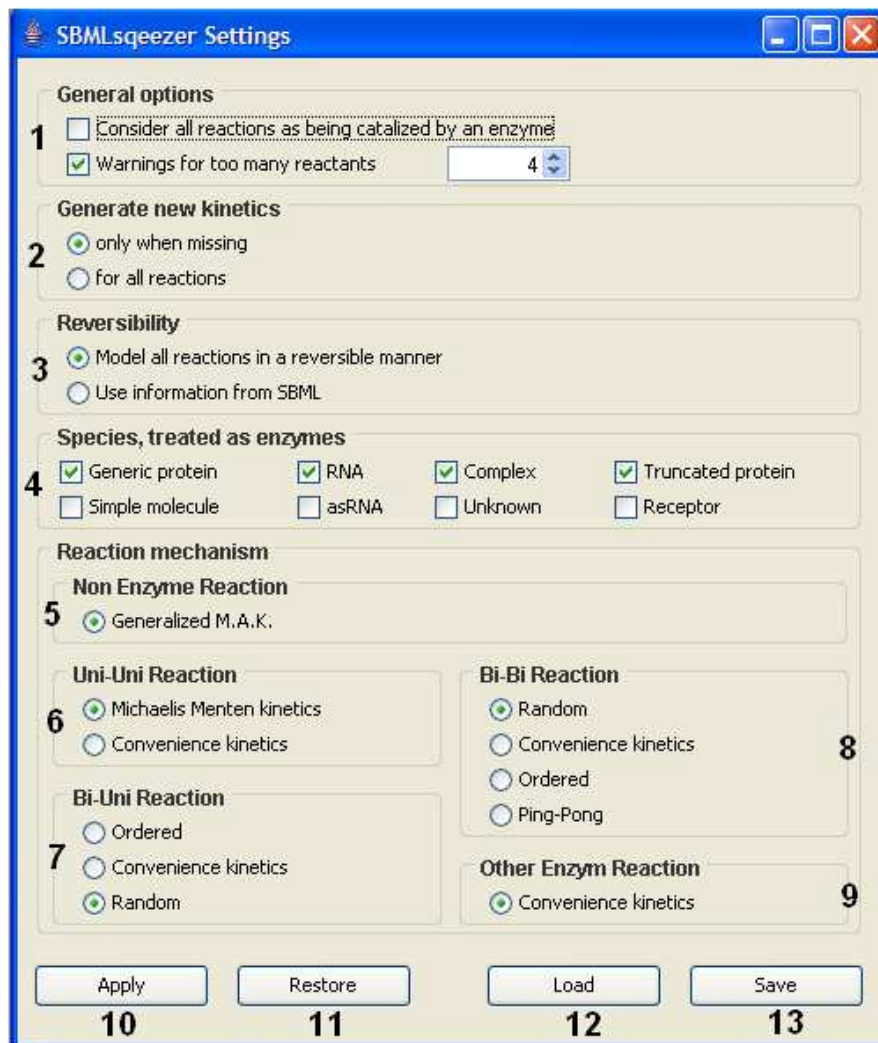


Abbildung 4.2.: Das SettingsFrame des SBMLsqueezers. Dargestellt sind die Default-Parametereinstellungen.

**1. General Options Group** In dieser Gruppe können allgemeine Optionen eingestellt werden.

**CheckBox: Consider all reactions as being catalized by an enzyme** Eine Auswahl dieser CheckBox bewirkt, dass jede im Modell vorkommende katalysierte Reaktion als Enzymreaktion modelliert wird, unabhängig von der Art der Reaktion, des Katalysators oder der Reaktanden. Die Aktivierung dieser Option sollte mit Bedacht gewählt werden.

**CheckBox: Warnings for too many reactants** Im aktivierten Zustand dieser CheckBox werden im ReactionListFrame, neben der Übersicht der erzeugten Reaktionen und Reaktionsparameter, diejenigen Reaktionen durch eine farbliche Markierung angezeigt, bei denen die Anzahl der Reaktanden den im rechts stehenden Spinner definierten Wert überschreiten. Die Aktivierung wird empfohlen, da es in natürlichen biochemischen Umgebungen sehr selten zu Reaktionen vierter bzw. größerer Reaktionsordnung kommt.

**2. RadioButton Group: Generate new kinetics** Hier ist auswählbar, ob ausschließlich noch nicht erzeugte (RadioButton: only when missing) Reaktionskinetiken erzeugt, oder ob auch bereits vorhandene Reaktionskinetiken (RadioButton: for all kinetics) neu generiert werden sollen.

**3. RadioButton Group: Reversibility** Diese Gruppe von Radio-Buttons ermöglicht eine Spezifizierung, welche Reaktionen als reversibel angenommen werden sollen. Ist der Radio-Button *Model all reactions in a reversibel manner* ausgewählt, so werden alle im Modell vorhandenen Reaktionen als reversibel angenommen. Wird dagegen *Use information from SBML* ausgewählt, so werden nur die im SBML-Dokument des Modells als reversibel definierten Reaktionen als solche betrachtet. Eine reversible Reaktion hat zur Konsequenz, dass nicht nur die Hinreaktion zu den Produkten, sondern auch gleichzeitig die Rückreaktion abläuft. In diesem Fall wird das jeweilige reversible mathematische Modell (Abschnitt 3.3) zu Grunde gelegt. Als Default-Einstellung werden alle Reaktionen als reversibel angenommen. Diese Entscheidung basiert auf den Gedanken, dass sich eine reversible Kinetik einfach in eine irreversible Kinetik umwandeln lässt, indem man die Reaktionsparameter anpasst. Eine irreversible Reaktionskinetik lässt sich dagegen nicht ohne größeren Aufwand als reversibel darstellen.

**4. CheckBox Group: Species, treated as enzymes** In dieser Checkbox-Gruppe werden diejenigen Species-Typen definiert, welche als Enzym betrachtet werden, wenn sie als Katalysator an einer Katalyse teilnehmen. Zur Auswahl stehen nicht alle im CellDesigner definierten Species-Typen, da bestimmte Klassen (Ion, Ion channel, Gene, Phenotype) grundsätzlich nicht als Enzym betrachtet werden können. Zur Auswahl stehen Generic protein, RNA, Complex, Truncated protein, Simple molecule, asRNA, Unknown und Receptor. Als Default-Einstellung werden Generic protein, RNA, Complex und Truncated protein gewählt, da Enzyme für gewöhnlich biologische Stoffe wie Proteine und RNA sind.

**Reaction mechanism Group** In den folgenden Gruppen werden die mathematischen Modelle für die verschiedenen Reaktionsmechanismen definiert.

**5. RadioButton Group: Non-Enzyme Reaction** In dieser Button-Gruppe wird der Reaktionsmechanismus für nicht-Enzymreaktionen spezifiziert. Zur Auswahl steht nur die generalisierte Massenwirkungskinetik (*Generalized M.A.K.*).

**6. RadioButton Group: Uni-Uni Reaction** Hier wird das mathematische Modell für Uni-Uni-Reaktionen definiert. Zur Auswahl stehen die Michaelis-Menten-Kinetik oder die Convenience-Kinetik. Als Default-Einstellung wird die Michaelis-Menten-Kinetik definiert, da dies der Standard für Uni-Uni-Reaktionen ist.

- 7. RadioButton Group: Bi-Uni Reaction** Hier wird das mathematische Modell für Bi-Uni-Reaktionen definiert. Zur Auswahl stehen die geordnete Kinetik, Convenience-Kinetik und ungeordnete Kinetik. Als Default-Einstellung wird die ungeordnete Kinetik verwendet, da dieses Modell die allgemeingültigsten Annahmen macht (Kapitel 3.3)
- 8. RadioButton Group: Bi-Bi Reaction** Hier wird das mathematische Modell für Bi-Bi Reaktionen definiert. Zur Auswahl stehen die ungeordnete Kinetik, Convenience-Kinetik, die geordnete Kinetik und Ping-Pong-Kinetik. Als Default-Einstellung wird die ungeordnete Kinetik verwendet, da dieses Modell die allgemeingültigsten Annahmen macht (Kapitel 3.3).
- 9. RadioButton Group: Other Enzyme Reaction** Hier wird das mathematische Modell für Enzymreaktionen, die nicht eine Uni-Uni-, Bi-Uni- oder Bi-Bi-Struktur aufweisen definiert. Zur Auswahl steht lediglich die Convenience-Kinetik, und ist daher auch Default-Einstellung.
- 10. PushButton: Apply** Mit Hilfe dieses Buttons werden die gewählten Einstellungen übernommen, und das SettingsFrame unsichtbar sowie das MainFrame sichtbar.
- 11. PushButton: Restore** Mit Hilfe dieses Buttons können vom Benutzer modifizierte Einstellungen wieder auf die Default-Einstellungen zurückgesetzt werden.
- 12. PushButton: Load** Mit Hilfe dieses Buttons können zuvor gespeicherte SBMLsqueezer-Einstellungen geladen, und damit die aktuellen Einstellungen überschrieben werden. Beim Betätigen dieses Buttons wird ein LoadFile-Dialogfenster geöffnet, in dem der Benutzer eine SBMLsqueezer-Parameterdatei auswählen kann.
- 13. PushButton: Save** Mit Hilfe dieses Buttons können die aktuellen SBMLsqueezer-Einstellungen gespeichert werden. Beim Drücken dieses Buttons wird ein SaveFile-Dialogfenster geöffnet, in dem der Benutzer den Speicherort und den Namen der SBMLsqueezer-Parameterdatei spezifizieren kann. Das Speicherformat der SBMLsqueezer-Parameterdatei ist der Einfachheit halber eine Textdatei (\*.txt), und kann somit auch leicht ohne graphische Oberfläche eingesehen und manipuliert werden (Algorithmus 8).

## ReactionListFrame

Wurden die Einstellungen für den SBMLsqueezer im MainFrame bzw. SettingsFrame gesetzt und der automatische Prozess der Erzeugung von Reaktionskinetiken und Reaktionsparametern gestartet, so erscheint nach Abschluss der Generierung das ReactionListFrame (Abbildung 4.3). In diesem Frame werden alle Reaktionen mit den beteiligten Species (Identifikation ID), die Anzahl der an der Reaktion beteiligten Reaktanden, die erzeugten Reaktionsparametern und die Reaktionskinetik übersichtlich tabellarisch dargestellt. Anschließend kann der Benutzer die Daten in den CellDesigner transferieren oder verwerfen. Die erzeugten Daten können zudem im  $\text{\LaTeX}$ -Format oder Text-Format zur Archivierung oder Weiterverarbeitung abgespeichert werden.

- 1. ReactionsTable** Im *Reactionstable* werden alle erzeugten Kinetiken dargestellt. Jede Reaktion umfasst eine Tabellenzeile. Die Spalten beinhalten (von Links nach Rechts) die Anzahl der an der Reaktion beteiligten Edukte, den Identifikationsnamen der Reaktion, den Identifikationsnamen der beteiligten Reaktanden, die Reaktionsparameter der Reaktion sowie die Gleichung der

**Algorithmus 8** SBMLsqueezer-Parameterdatei für Default-Settings.

```
SBMLsqueezer Settings-file
version:1.00
START
maxSpecies:4
uniUnitType:3
biUnitType:4
biBiType:4
warnings:true
noReactionMAK:true
possibleEnzymeRNA:true
GenKinForAllReac:false
reversibility:true
possibleEnzymeGenericProtein:true
possibleEnzymeTruncatedProtein:true
possibleEnzymeComplex:true
possibleEnzymeUnknown:false
possibleEnzymeReceptor:false
possibleEnzymeSimpleMolecule:false
possibleEnzymeAsRNA:false
possibleEnzymeAllNotChecked:false
forceAllReactionsAsEnzymeReaction:false
END
```

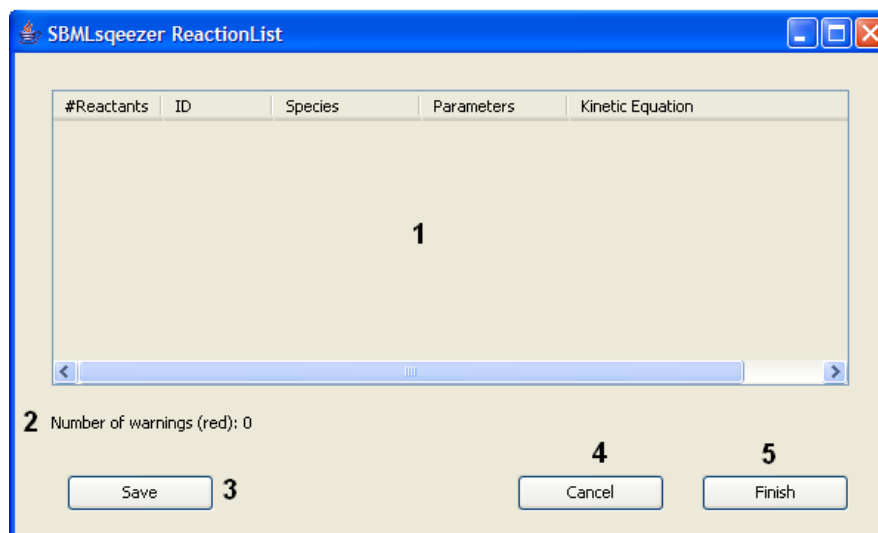


Abbildung 4.3.: Das ReactionListFrame des SBMLsqueezers.

Reaktionskinetik der Reaktion. Ferner kann für eine bestimmte Reaktion das Feld *Anzahl-der-Edukte* rot eingefärbt sein. Dies ist immer dann der Fall, wenn die Anzahl der an der Reaktion beteiligten Edukte größer ist als die im SettingsFrame definierten maximalen Anzahl von Edukten.

2. **Warnings** Die Anzahl der im ReactionsTable als *Warnung*-markierten Reaktionen wird hier dargestellt. Der Wert dient ebenso wie die farbliche Markierung im ReactionsTable lediglich der Information bzw. zur Warnung an den Benutzer, hat jedoch keinerlei Einfluss auf den Generierungs- oder Transferprozess.
3. **PushButton: Save** Mit Hilfe dieses Buttons werden die erzeugten Kinetiken in das CellDesigner-Modell transferiert und integriert. Anschließend öffnet sich ein Save-File-Dialogfenster in dem der Benutzer den Speicherort, den Namen sowie das Datenformat der erzeugten Daten auswählen kann. Zur Verfügung stehen eine  $\text{\LaTeX}$ -Version (\*.tex) sowie eine Textversion (\*.txt) (Abbildung 4.4).
4. **PushButton: Cancel** Mit Hilfe dieses Buttons können die erzeugten Parameter und Kinetiken verworfen und das ReactionListFrame geschlossen. Gleichzeitig wird das MainFrame sichtbar. Es werden keinerlei generierte Daten in den CellDesigner transferiert, das Modell bleibt unverändert erhalten.
5. **PushButton: Finish** Mit Hilfe dieses Buttons werden die erzeugten Kinetiken in das CellDesigner-Modell transferiert und integriert. Anschließend wird der SBMLsqueezer geschlossen.

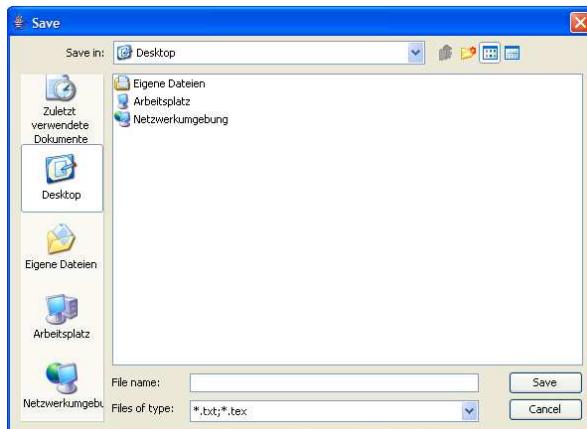


Abbildung 4.4.: SaveFile-Dialogfenster des SBMLsqueezers zum Abspeichern der erzeugten Daten im  $\text{\LaTeX}$ - oder Text-Format.

### Ablaufkontrolle: Übersicht

Abbildung 4.5 veranschaulicht zusammenfassend die Ablaufstruktur bei der Benutzung des SBMLsqueezers.

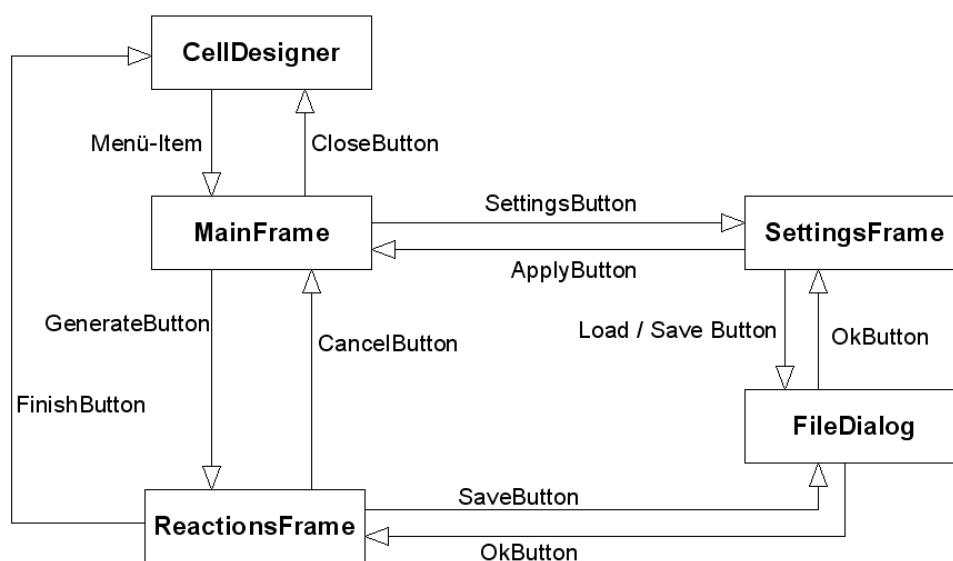


Abbildung 4.5.: Ablaufstrukturgraph des SBMLsqueezers: Die gerichteten Kanten veranschaulichen die Aktion des Benutzers (Betätigen eines PushButtons), die Knoten das jeweilig aktive Fenster.

## 4.2. Automatisches Erzeugung von Kinetiken

### 4.2.1. Modell 1: Grundlegende Reaktionskomponenten

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse des SBMLsqueezers für das einfache Modell mit den Basisreaktionen vorgestellt. Dieses Netzwerk wurde mit drei verschiedenen Einstellungen des SBMLsqueezers mathematisch modelliert. Die Einstellungen haben für dieses Modell keinen biologischen Hintergrund. Auch steht nicht das Bestreben im Vordergrund, den vorgegebenen Kinetiken so gut wie möglich zu entsprechen. Das Präsentieren dieser Einstellungen mit den dazugehörigen Kinetiken soll lediglich die Möglichkeiten des SBMLsqueezers verdeutlichen.

#### Erste Einstellung: Convenience-Kinetik für alle enzymatischen Reaktionen

Für diese Einstellungen des SBMLsqueezers wurde lediglich im Main-Frame in der **RadioButton-Group** der **RadioButton:Convenience kinetics for all Enzyme Reactions** betätigt. In Tabelle 4.1 werden die einzelnen Reaktionen mit den erzeugten Kinetiken präsentiert. Es ist zu sehen, dass die Reaktionskinetiken enzymkatalysierter Reaktionen durch die Convenience-Kinetik, nicht enzymatisch-katalysierte durch die einfache generalisierte Massenwirkungskinetik dargestellt werden. Für Reaktion re3 sind auch die Terme für eine Aktivierung (Term 1) und eine Inhibition (Term 2) mit in die Gleichung eingeflossen. Ein weiterer erwähnenswerter Punkt ist die reversible Form aller Reaktionskinetiken, obwohl nur re6 eine Reversibilität aufweist. Dies ist dadurch zu erklären, dass wenn nicht anders vom Benutzer im Settings-Frame eingestellt, alle Reaktionen als reversibel modelliert werden.

Id	Reaktion	Kinetik
re1	$[s_1] + [s_3] \longrightarrow [s_2] + [s_3]$	$[s_3] \cdot \frac{k_{+,1,0}^{\text{cat}} \cdot \left( \frac{[s_1]}{k_{\text{Ma}}^{1,0,0}} \right) - k_{-,1,0}^{\text{cat}} \cdot \left( \frac{[s_2]}{k_{\text{Mb}}^{1,0,0}} \right)}{\left( 1 + \frac{[s_1]}{k_{\text{Ma}}^{1,0,0}} \right) + \left( 1 + \frac{[s_2]}{k_{\text{Mb}}^{1,0,0}} \right) - 1}$
re2	$[s_8] + [s_9] \longrightarrow [s_{10}]$	$k_{+,3} \cdot [s_8] \cdot [s_9] - k_{-,3} \cdot [s_{10}]$
re3	$[s_{18}] + [s_{20}] \xrightleftharpoons[s_{22}]{s_{21}} [s_{19}] + [s_{20}]$	$\frac{[s_{22}]}{k_{5,0,0}^{\text{A}} + [s_{22}]} \cdot \frac{k_{5,0,0}^{\text{I}}}{k_{5,0,0}^{\text{I}} + [s_{21}]} \cdot [s_{20}] \cdot \frac{k_{+,5,0}^{\text{cat}} \cdot \left( \frac{[s_{18}]}{k_{\text{Ma}}^{5,0,0}} \right) - k_{-,5,0}^{\text{cat}} \cdot \left( \frac{[s_{19}]}{k_{\text{Mb}}^{5,0,0}} \right)}{\left( 1 + \frac{[s_{18}]}{k_{\text{Ma}}^{5,0,0}} \right) + \left( 1 + \frac{[s_{19}]}{k_{\text{Mb}}^{5,0,0}} \right) - 1}$
re4	$[s_4] + [s_5] \longrightarrow [s_6] + [s_7]$	$k_{+,6} \cdot [s_4] \cdot [s_5] - k_{-,6} \cdot [s_6] \cdot [s_7]$
re5	$[s_{11}] + [s_{12}] + [s_{13}] \longrightarrow [s_{14}]$	$k_{+,4} \cdot [s_{12}] \cdot [s_{11}] \cdot [s_{13}] - k_{-,4} \cdot [s_{14}]$
re6	$[s_{15}] + [s_{17}] \longleftrightarrow [s_{16}] + [s_{17}]$	$k_{+,2} \cdot [s_{15}] \cdot [s_{17}] - k_{-,2} \cdot [s_{16}] \cdot [s_{17}]$

Tabelle 4.1.: Kinetiken, die mit der Convenience-Einstellung für das Modell welches die Basisreaktionen beinhaltet generiert wurden.

### Zweite Einstellung: Default-Einstellung

Für diese Einstellung des SBMLsqueezers wurde im Main-Frame in der **RadioButtonGroup** der **RadioButton:Default Settings** betätigt. In Tabelle 4.2 werden die einzelnen Reaktionen mit den erzeugten Kinetiken präsentiert.

Auch bei dieser Einstellung werden die Reaktionskinetiken nicht-enzymkatalysierter Reaktionen mit der generalisierten Massenwirkungskinetik erstellt. Lediglich die Enzymreaktionen werden nicht mehr durch die Convenience-Kinetik modelliert. Für Reaktion re1 und re3 werden für diese Einstellung die Michaelis-Menten-Kinetik benutzt.

### Dritte Einstellung: Benutzerdefinierte Einstellungen

Bei diesem Versuch wurden im SBMLsqueezer nach Betätigung des **RadioButton:Customized Settings** im Main-Frame, einige benutzerdefinierte Einstellungen im Settings-Frame vorgenommen:

- Aktivierung der **CheckBox:Consider all reactions as being catalized by an enzyme** in der **General-Options-Group**.
- Aktivierung des **RadioButton:Ordered** in der **RadioButton-Group: Bi-Bi-Reaction**.

In Tabelle 4.3 werden die einzelnen Reaktionen mit den erzeugten Kinetiken präsentiert.

Anhand der Formeln in Tabelle 4.3 ist ersichtlich, dass durch die Einstellung, dass alle Reaktionen als Enzymreaktionen betrachten werden sollen, die Komplexität der Reaktionskinetiken stark zunimmt. Insbesondere Reaktion re4 wird nun durch eine Kinetik des geordneten Bi-Bi-Mechanismus repräsentiert.



Id	Reaktion	Kinetik
re1	$[s_1] + [s_3] \longrightarrow [s_2] + [s_3]$	$\frac{k_{+1,0}^{\text{cat}} \cdot [s_3] \cdot [s_1] \cdot k_{1,0}^{\text{Mp}} - k_{-1,0}^{\text{cat}} \cdot [s_3] \cdot [s_2] \cdot k_{1,0}^{\text{Ms}}}{k_{1,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{1,0}^{\text{Mp}} + ([s_1] \cdot k_{1,0}^{\text{Mp}} + [s_2] \cdot k_{1,0}^{\text{Ms}})}$
re2	$[s_8] + [s_9] \longrightarrow [s_{10}]$	$k_{+,3} \cdot [s_8] \cdot [s_9] - k_{-,3} \cdot [s_{10}]$
re3	$[s_{18}] + [s_{20}] \xrightleftharpoons[s_{22}]{s_{21}} [s_{19}] + [s_{20}]$	$\frac{k_{+5,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{20}] \cdot [s_{18}] \cdot k_{5,0}^{\text{Mp}} - k_{-5,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{20}] \cdot [s_{19}] \cdot k_{5,0}^{\text{Ms}}}{k_{5,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{5,0}^{\text{Mp}} \cdot \left(1 + \frac{[s_{21}]}{k_{5,0}^{\text{Aa}}}\right) \cdot \left(1 + \frac{k_{5,0}^{\text{Aa}}}{[s_{22}]}\right) + ([s_{18}] \cdot k_{5,0}^{\text{Mp}} + [s_{19}] \cdot k_{5,0}^{\text{Ms}}) \cdot \left(1 + \frac{[s_{21}]}{k_{5,0}^{\text{Ib}}}\right) \cdot \left(1 + \frac{k_{5,0}^{\text{Ib}}}{[s_{22}]}\right)}$
re4	$[s_4] + [s_5] \longrightarrow [s_6] + [s_7]$	$k_{+,6} \cdot [s_4] \cdot [s_5] - k_{-,6} \cdot [s_6] \cdot [s_7]$
re5	$[s_{11}] + [s_{12}] + [s_{13}] \longrightarrow [s_{14}]$	$k_{+,4} \cdot [s_{12}] \cdot [s_{11}] \cdot [s_{13}] - k_{-,4} \cdot [s_{14}]$
re6	$[s_{15}] + [s_{17}] \longleftrightarrow [s_{16}] + [s_{17}]$	$k_{+,2} \cdot [s_{15}] \cdot [s_{17}] - k_{-,2} \cdot [s_{16}] \cdot [s_{17}]$

Tabelle 4.2.: Kinetiken, die mit der Default-Einstellung für das Modell welches die Basisreaktionen beinhaltet generiert wurden.

#### 4.2.2. Modell 2: T-Zell-Signaltransduktionsnetzwerk

Das T-Zell-Signaltransduktionsnetzwerk aus der Arbeit von Adrian Schröder bietet sich durch seine begrenzte Anzahl an Reaktionsmechanismen zum einfachen Vergleich an. In Tabelle 4.4 werden die Kinetiken, die durch den SBMLsqueezer unter der Default-Einstellung erzeugt wurden, den manuell modellierten Kinetiken gegenüber gestellt. Es ist erkennbar, dass die gewählten Mechanismen der Reaktionskinetiken übereinstimmen. Die Bezeichnung der Reaktanden weicht allerdings voneinander ab, da bei den automatisiert erstellten Gleichungen die Id und nicht der Name verwendet wurden, um die Gleichungen so einfach wie möglich zu gestalten. Ein Unterschied zwischen den manuell und den automatisch erzeugten Kinetiken besteht darin, dass unter den Default-Einstellungen reversible Kinetiken erzeugt werden, der Erzeuger der manuellen Kinetiken jedoch irreversible Michaelis-Menten-Kinetiken verwendet hat. Der SBMLsqueezer produzierte für dieses Modell 47 Kinetiken. In der Arbeit über das T-Zell-Transduktionsnetzwerk wurden allerdings nur 35 Kinetiken modelliert. Da der SBMLsqueezer für alle Reaktionen die keine Kinetik enthalten oder falls entsprechend eingestellt für alle Reaktionen Kinetiken erstellt, werden auch Kinetiken erzeugt, die dem Erzeuger der manuellen Kinetiken unwichtig erschienen. Bei diesen Reaktionen handelt es sich um die Aktivierung von Proteinen bzw. Enzymen. Die vollständige Tabelle der erzeugten Kinetiken befindet sich im Anhang.

#### 4.2.3. Modell 3: Glykolysenetzwerk

Das zur Verfügung stehende SBML-Dokument für das metabolische Netzwerk des Kohlenstoffwechsels von *E. Coli* beinhaltet bereits alle Reaktionskinetiken für die Reaktionen. Da es zudem abwechslungsreiche Reaktionsmechanismen bietet, scheint dieses Modell hervorragend zum Vergleich, der durch den SBMLsqueezer erzeugten Kinetiken, geeignet. Leider wurden dem SBML-Dokument Angaben von Modifikationen durch Katalyse, Inhibition und Aktivierung nicht beigefügt, sodass es im Ergebnis zu großen Differenzen zwischen den vom SBMLsqueezer erzeugten und den manuell generierten Reaktionskinetiken kommt. Durch die Parameter der Default-Einstellung werden lediglich



Id	Reaktion	Kinetik
re1	$[s_1] + [s_3] \longrightarrow [s_2] + [s_3]$	$\frac{k_{+1,0}^{\text{cat}} \cdot [s_3] \cdot [s_1] \cdot k_{1,0}^{\text{Mp}} - k_{-1,0}^{\text{cat}} \cdot [s_3] \cdot [s_2] \cdot k_{1,0}^{\text{Ms}}}{k_{1,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{1,0}^{\text{Mp}} + ([s_1] \cdot k_{1,0}^{\text{Mp}} + [s_2] \cdot k_{1,0}^{\text{Ms}})}$
re2	$[s_8] + [s_9] \longrightarrow [s_{10}]$	$\frac{\frac{k_{+3,0}^{\text{cat}} \cdot [E] \cdot [s_8] \cdot [s_9]}{k_{3,0}^{\text{Ir1}} \cdot k_{3,0}^{\text{Mr2}}} - \frac{k_{-3,0}^{\text{cat}} \cdot [E] \cdot [s_{10}]}{k_{3,0}^{\text{Mp1}}}}{1 + \frac{[s_8]}{k_{3,0}^{\text{Ir1}}} + \frac{[s_9]}{k_{3,0}^{\text{Ir2}}} + \frac{[s_{10}]}{k_{3,0}^{\text{Mp1}}} + \frac{[s_8] \cdot [s_9]}{k_{3,0}^{\text{Ir1}} \cdot k_{3,0}^{\text{Mr2}}}}$
re3	$[s_{18}] + [s_{20}] \xrightleftharpoons[s_{22}]{s_{21}} [s_{19}] + [s_{20}]$	$\frac{k_{+5,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{20}] \cdot [s_{18}] \cdot k_{5,0}^{\text{Mp}} - k_{-5,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{20}] \cdot [s_{19}] \cdot k_{5,0}^{\text{Ms}}}{k_{5,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{5,0}^{\text{Mp}} \cdot \left(1 + \frac{[s_{21}]}{k_{5,0}^{\text{Aa}}}\right) + ([s_{18}] \cdot k_{5,0}^{\text{Mp}} + [s_{19}] \cdot k_{5,0}^{\text{Ms}}) \cdot \left(1 + \frac{[s_{21}]}{k_{5,0}^{\text{Ab}}}\right) \cdot \left(1 + \frac{k_{5,0}^{\text{Ab}}}{[s_{22}]}\right)}$
re4	$[s_4] + [s_5] \longrightarrow [s_6] + [s_7]$	$\frac{\frac{k_{+6,0}^{\text{cat}} \cdot [E] \cdot [s_4] \cdot [s_5]}{k_{6,0}^{\text{Ir1}} \cdot k_{6,0}^{\text{Mr2}}} - \frac{k_{-6,0}^{\text{cat}} \cdot [E] \cdot [s_6] \cdot [s_7]}{k_{6,0}^{\text{Ip2}} \cdot k_{6,0}^{\text{Mp1}}}}{1 + \frac{[s_4]}{k_{6,0}^{\text{Ir1}}} + \frac{k_{6,0}^{\text{Mr1}} \cdot [s_5]}{k_{6,0}^{\text{Ir1}} \cdot k_{6,0}^{\text{Mr2}}} + \frac{k_{6,0}^{\text{Mp2}} \cdot [s_6]}{k_{6,0}^{\text{Ip2}} \cdot k_{6,0}^{\text{Mp1}}} + \frac{[s_7]}{k_{6,0}^{\text{Ip2}}} + \frac{[s_4] \cdot [s_5]}{k_{6,0}^{\text{Ir1}} \cdot k_{6,0}^{\text{Mr2}}} + \frac{k_{6,0}^{\text{Mp2}} \cdot [s_4] \cdot [s_6]}{k_{6,0}^{\text{Ir1}} \cdot k_{6,0}^{\text{Mp1}} \cdot k_{6,0}^{\text{Ip2}}} + \frac{k_{6,0}^{\text{Mr1}} \cdot [s_5] \cdot [s_7]}{k_{6,0}^{\text{Ir1}} \cdot k_{6,0}^{\text{Mr2}} \cdot k_{6,0}^{\text{Ip2}}} + \frac{[s_6] \cdot [s_7]}{k_{6,0}^{\text{Mp1}} \cdot k_{6,0}^{\text{Ip2}}} + \frac{[s_4] \cdot [s_5] \cdot [s_6]}{k_{6,0}^{\text{Ir1}} \cdot k_{6,0}^{\text{Mr2}} \cdot k_{6,0}^{\text{Ip1}}} + \frac{[s_5] \cdot [s_6] \cdot [s_7]}{k_{6,0}^{\text{Ir2}} \cdot k_{6,0}^{\text{Mp1}} \cdot k_{6,0}^{\text{Ip2}}}}$
re5	$[s_{11}] + [s_{12}] + [s_{13}] \longrightarrow [s_{14}]$	$[E] \cdot \frac{k_{+4,0}^{\text{cat}} \cdot \left(\frac{[s_{12}]}{k_{4,0,0}^{\text{Ma}}}\right) \cdot \left(\frac{[s_{11}]}{k_{4,0,0}^{\text{Ma}}}\right) \cdot \left(\frac{[s_{13}]}{k_{4,0,0}^{\text{Ma}}}\right) - k_{-4,0}^{\text{cat}} \cdot \left(\frac{[s_{14}]}{k_{4,0,0}^{\text{Mb}}}\right)}{\left(1 + \frac{[s_{12}]}{k_{4,0,0}^{\text{Ma}}}\right) \cdot \left(1 + \frac{[s_{11}]}{k_{4,0,0}^{\text{Ma}}}\right) \cdot \left(1 + \frac{[s_{13}]}{k_{4,0,0}^{\text{Ma}}}\right) + \left(1 + \frac{[s_{14}]}{k_{4,0,0}^{\text{Mb}}}\right) - 1}$
re6	$[s_{15}] + [s_{17}] \longleftrightarrow [s_{16}] + [s_{17}]$	$\frac{k_{+2,0}^{\text{cat}} \cdot [E] \cdot [s_{15}] \cdot k_{2,0}^{\text{Mp}} - k_{-2,0}^{\text{cat}} \cdot [E] \cdot [s_{16}] \cdot k_{2,0}^{\text{Ms}}}{k_{2,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{2,0}^{\text{Mp}} + ([s_{15}] \cdot k_{2,0}^{\text{Mp}} + [s_{16}] \cdot k_{2,0}^{\text{Ms}})}$

Tabelle 4.3.: Kinetiken, die mit Hilfe einer benutzerdefinierten Einstellung für das Modells Modell welches die Basisreaktionen beinhaltet generiert wurden. Einstellungen: Alle Reaktionen werden als Enzymreaktion betrachtet. Für den Bi-Bi-Mechanismus gilt die ungeordnete Kinetik. Für die restlichen SBMLsqueezer-Parameter wurden die Default Einstellungen verwendet.

Id	Manuell erzeugte Kinetiken	Kinetiken des SBMLsqueezers
$Re_1$	$k1_{ass}[\text{CD3}][\text{AntiCD3}] - k1_{diss}[\text{CD3-AntiCD3}]$	$v_0 = k_{+,1} \cdot [s_2] \cdot [s_1] - k_{-,1} \cdot [s_5]$
$Re_4$	$k3_{ass}[\text{CD3-AntiCD3-P}][\text{ZAP-70}] - k3_{diss}[\text{CD3-AntiCD3-P-ZAP-70}]$	$v_1 = k_{+,2} \cdot [s_6] \cdot [s_8] - k_{-,2} \cdot [s_7]$
$Re_5$	$k24_{ass}[\text{CD28}][\text{AntiCD28}] - k24_{diss}[\text{CD28-AntiCD28}]$	$v_2 = k_{+,3} \cdot [s_4] \cdot [s_3] - k_{-,3} \cdot [s_{10}]$
$Re_7$	$k19_{ass}[\text{CD28-AntiCD28-P}][\text{PI3K}] - k19_{diss}[\text{CD28-AntiCD28-P-PI3K}]$	$v_3 = k_{+,4} \cdot [s_{11}] \cdot [s_{43}] - k_{-,4} \cdot [s_{12}]$
$Re_{10}$	$\frac{k9_{cat}[\text{LAT-1}][\text{CD3-AntiCD3-ZAP-70-P}]}{k9_m + [\text{LAT-1}]}$	$v_4 = \frac{k_{+,5,0}^{\text{cat}} \cdot [s_9] \cdot [s_{14}] \cdot k_{5,0}^{\text{Mp}} - k_{-,5,0}^{\text{cat}} \cdot [s_9] \cdot [s_{15}] \cdot k_{5,0}^{\text{Ms}}}{k_{5,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{5,0}^{\text{Mp}} + ([s_{14}] \cdot k_{5,0}^{\text{Mp}} + [s_{15}] \cdot k_{5,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{12}$	$\frac{k15_{cat}[\text{PIP2}][\text{CD28-AntiCD28-P-PIBK}]}{k15_m + [\text{PIP3}]}$	$v_5 = \frac{k_{+,6,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{12}] \cdot [s_{17}] \cdot k_{6,0}^{\text{Mp}} - k_{-,6,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{12}] \cdot [s_{18}] \cdot k_{6,0}^{\text{Ms}}}{k_{6,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{6,0}^{\text{Mp}} + ([s_{17}] \cdot k_{6,0}^{\text{Mp}} + [s_{18}] \cdot k_{6,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{14}$	$k18_{ass}[\text{PIP3}][\text{ITK}] - k18_{diss}[\text{PIP3-ITK-Active}]$	$v_6 = k_{+,7} \cdot [s_{18}] \cdot [s_{22}] - k_{-,7} \cdot [s_{21}]$
$Re_{15}$	$k17_{ass}[\text{PIP3}][\text{AKT}] - k17_{diss}[\text{PIP3-AKT-Active}]$	$v_7 = k_{+,8} \cdot [s_{18}] \cdot [s_{23}] - k_{-,8} \cdot [s_{24}]$
$Re_{16}$	$\frac{k27_{cat}[\text{Ca}^{2+}_{int}][\text{IP3}]}{k27_m + [\text{Ca}^{2+}_{ext}]}$	$v_8 = \frac{k_{+,9,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{20}] \cdot [s_{25}] \cdot k_{9,0}^{\text{Mp}} - k_{-,9,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{20}] \cdot [s_{26}] \cdot k_{9,0}^{\text{Ms}}}{k_{9,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{9,0}^{\text{Mp}} + ([s_{25}] \cdot k_{9,0}^{\text{Mp}} + [s_{26}] \cdot k_{9,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{82}$		$v_{28} = \frac{k_{+,29,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{15}] \cdot [s_{99}] \cdot k_{29,0}^{\text{Mp}} - k_{-,29,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{15}] \cdot [s_{100}] \cdot k_{29,0}^{\text{Ms}}}{k_{29,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{29,0}^{\text{Mp}} + ([s_{99}] \cdot k_{29,0}^{\text{Mp}} + [s_{100}] \cdot k_{29,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{83}$		$v_{29} = \frac{k_{+,30,0}^{\text{cat}} \cdot [s_9] \cdot [s_{100}] \cdot k_{30,0}^{\text{Mp}} - k_{-,30,0}^{\text{cat}} \cdot [s_9] \cdot [s_{99}] \cdot k_{30,0}^{\text{Ms}}}{k_{30,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{30,0}^{\text{Mp}} + ([s_{100}] \cdot k_{30,0}^{\text{Mp}} + [s_{99}] \cdot k_{30,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{84}$		$v_{30} = \frac{k_{+,31,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{99}] \cdot [s_{114}] \cdot k_{31,0}^{\text{Mp}} - k_{-,31,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{99}] \cdot [s_{101}] \cdot k_{31,0}^{\text{Ms}}}{k_{31,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{31,0}^{\text{Mp}} + ([s_{114}] \cdot k_{31,0}^{\text{Mp}} + [s_{101}] \cdot k_{31,0}^{\text{Ms}})}$

Tabelle 4.4.: Auszug aus den manuell und automatisiert erzeugten Kinetiken von Modell 2.

Gleichungen der generalisierten Massenwirkungskinetik erzeugt, da der SBMLsqueezer im SBML-Dokument keine Angaben bezüglich katalytischer Vorgängen vorfindet. Die Default-Einstellungen erzeugt aufgrund der mangelhaften Informationen in der SBML-Datei circa zwei Drittel der Reaktionen falsch. Wird eine benutzerdefinierte Einstellung folgender Form verwendet:

- Aktivierung der CheckBox: Consider all reactions as being catalized by an enzyme in der **General Options Group**,

so werden zwar die Enzymkinetiken korrekt modelliert, jedoch werden die nicht-enzymkatalysierten Reaktionen dann fehlerhaft berechnet. Die folgenden Abschnitte beschreiben die Vor- und Nachteile des SBMLsqueezers gegenüber anderen Lösungsvorschlägen (Cellerator) für die Problematik der automatischen Generierung von Reaktionskinetiken. Andererseits werden die Beschränkungen des SBMLsqueezers sowie die Probleme, die bei der Verwendung des SBMLsqueezers auftreten können beschrieben.

#### 4.2.4. Vergleich des SBMLsqueezers mit dem Cellerator

In Abschnitt 3.5 wurde der Cellerator als Tool beschrieben, welches in der Lage ist, automatisiert gewöhnliche Differentialgleichungen zu Enzymreaktionen zu erstellen. Der SBMLsqueezer wurde entwickelt, da der Cellerator einigen Beschränkungen unterliegt und nicht die volle gewünschte Funktionalität bietet. So benötigt der Cellerator Mathematica 4.0 oder höherer Version, und setzt damit ein kostenpflichtiges Lizenzierungsverfahren voraus. Der SBMLsqueezer benötigt dagegen den CellDesigner, welcher ein kostenloses Lizenzierungsverfahren in Form einer Registrierung für akademische Zwecke anbietet. Auch unterstützt der Cellerator nur im begrenztem Maße das SBML-Format, und zwar ausschließlich das Schreiben von Level-1-SBML-Daten. Der CellDesigner und damit auch der SBMLsqueezer unterstützen dagegen sämtliche SBML-Formate sowohl beim Lesen als auch beim Schreiben. Ein weiterer wichtiger Vorteil des SBMLsqueezers gegenüber dem Cellerator liegt darin, dass der Cellerator zwar einzelne Differentialgleichungen automatisch erzeugen kann, im Unterschied zum SBMLsqueezer jedoch nicht ganze Netzwerke. Ein differenziertes automatisches Generieren ganzer Netzwerke bedarf ein in Mathematica implementiertes Rahmenprogramm. Hinsichtlich der Kinetiken bzw. mathematischen Modellen unterstützt der Cellerator zum jetzigen Zeitpunkt mehr Modelle als der SBMLsqueezer (S-System, Hill-Gleichungen, sigmoidale und allosterische Modelle). Demgegenüber bietet der SBMLsqueezer eine größere Differenzierung hinsichtlich der Michaelis-Menten-Kinetik für bis zu zwei Substraten und Produkten sowie die Convenience-Kinetik.

Anforderung	Cellerator	SBMLsqueezer
kostenloses Lizenzsystem	Nein	Ja (akademisch)
SBML-Unterstützung lesen Level-1	Nein	Ja
SBML-Unterstützung lesen Level-2	Nein	Ja
SBML-Unterstützung schreiben Level-1	Ja	Ja
SBML-Unterstützung schreiben Level-2	Nein	Ja
Automatisches Erzeugen einzelner ODE's	Ja	Ja
Automatische Erzeugen ganzer Netzwerke	Nein	Ja

Tabelle 4.5.: Cellerator und SBMLsqueezer im Vergleich.

### 4.3. Beschränkungen und Probleme bei der Verwendung des SBMLsqueezers

Der SBMLsqueezer vermag es, die ihm gesetzten Ziele hinsichtlich der korrekten automatischen Generierung kinetischer Gleichungen aus einem im CellDesigner modellierten Netzwerken, zu erfüllen. Dennoch gibt es einige Einschränkungen, Nachteile und Probleme, die bei der Verwendung des SBMLsqueezers bedacht werden sollten:

**Nicht mit CellDesigner entworfenen SBML-Dateien** Bei Modellen, die nicht im CellDesigner entworfen wurden, für die jedoch mit Hilfe des CellDesigner-Plugins SBMLsqueezer Reaktionskinetiken und Reaktionsparameter erzeugt werden sollen, besteht die Gefahr, dass auf Grund fehlender Informationen hinsichtlich des Reaktionstyps und des Speciestyps die automatische Auswahl des mathematischen Modells auf unzureichender Datengrundlage basiert. Die mögliche Folge ist, dass das vom SBMLsqueezer ausgewählte mathematische Modelle ein anderes ist, als dasjenige, dass der Benutzer, durch seine weitergehenden Kenntnisse, manuell erzeugt hätte.

**CellDesigner-Inhibition** Da der CellDesigner keine Aktivierung vorsieht und diese im Rahmen dieser Arbeit neu definiert wurde, kann es auf Grund mangelnder Kenntnis eines Benutzers zu Mißverständnissen kommen, wenn dieser Umstand bei der Erzeugung des Modells nicht hinreichend beachtet bzw. das Modell entsprechend angepasst wurde.

**Beschränkte Auswahl an Kinetikmodellen** Im SBMLsqueezer wurden die wichtigsten mathematischen Modelle für verschiedene Reaktionsmechanismen implementiert, jedoch existieren noch weitere verbreitete und für die Forschung interessante Modelle wie das S-System für genregulatorische Netzwerke oder die Hill-Gleichung, die aktuell beide nicht vom SBMLsqueezer unterstützt werden.

**CellDesigner-Abhängigkeit** Der SBMLsqueezer ist als Plugin für den CellDesigner entworfen, und damit von dessen Entwicklung abhängig. Wird der CellDesigner weiterentwickelt, so ist ggf. eine Anpassung des SBMLsqueezers notwendig, um mit neueren Versionen einwandfrei arbeiten zu können.

**SBML-Version-3** Diese Version des SBML-Formates befindet sich gegenwärtig in der Entwicklung, daher konnte beim Entwurf des SBMLsqueezers keine Rücksicht auf dieses Format und seine Ergänzungen zum SBML-Level-2-Format genommen werden.

An den hier erwähnten Einschränkungen und den Ergebnissen für die drei Testmodelle ist ersichtlich, dass dieses Softwaretool nicht ohne Bedacht und ohne Vorkenntnisse im Umgang mit dem CellDesigner und den in dieser Arbeit getroffenen Konventionen, angewendet werden sollte. Die gewählten Einstellungen sollten sich immer nach den biologischen Vorgaben richten. Die vom SBMLsqueezer erzeugten Kinetiken können auch als eine Art *Startkinetik* benutzt werden, die der Benutzer, wenn gewünscht, von Hand anpassen und nachbessern kann. Wird diesen Punkten Beachtung geschenkt, kann der SBMLsqueezer dem Benutzer eine enorme Arbeitserleichtung, insbesondere bei großen biologischen Netzwerken, verschaffen. Dem Benutzer wird die Möglichkeit gegeben, seine zur Verfügung stehende Zeit und Ressourcen der Simulation und Parameteroptimierung zu widmen und gegebenenfalls Simulationen mit verschiedenen Kinetiken zu testen.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

### 5.1. Zusammenfassung

Im Bereich der Systemwissenschaften fallen auf Grund immer erfolgreicherer Methoden bei der Analyse von Genexpression und Proteinfunktion durch moderne Hochdurchsatzverfahren größere Datenmengen an. Die enormen Datenmengen sind aus Zeitgründen manuell kaum noch handhabbar, daher wird zunehmend nach Automatisierungsmöglichkeiten gesucht. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, einerseits einen Lösungsansatz für einen solchen Automatisierungsprozess zu entwickeln, und andererseits diesen Lösungsansatz zu implementieren und zu testen. Konkret ging es um das automatische generieren von Reaktionskinetiken und Reaktionsparametern für ein gegebenes biochemisches Netzwerk. Hierfür sollte ein Programm in Form eines Plugins für den CellDesigner 4.0 $\alpha$  entwickelt werden.

Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst die theoretischen Grundlagen der dynamischen Modellierung besprochen und die für diese Arbeit wichtigsten mathematischen Modelle für Enzymreaktionen eingeführt. Anschließend wurde die Michaelis-Menten-Kinetik hergeleitet. Diese bildete die Basis zur Entwicklung von Modellen für Uni-Uni-, Bi-Uni- und Bi-Bi-Reaktionsschemata. Da insbesondere die Bi-Uni-Kinetik in der Fachliteratur, für diese Arbeit, in unzulänglicher Weise beschrieben wird, musste sie mit Hilfe der King-Altman-Methode entwickelt und angepasst werden.

Nachdem die zu implementierenden mathematischen Modelle entworfen waren, wurden die Programme und Hilfsmittel, die im Rahmen der Entwicklung des Plugins verwendet wurden vorgestellt. Es wurde detailliert auf das vom CellDesigner verwendete SBML-Format sowie auf die Programmierbibliotheken eingegangen, die einen Zugriff auf die Daten dieses Formats ermöglichen.

Im Anschluss wurde ein biochemisches Modell erzeugt, sowie zwei weitere Modelle vorgestellt, mit denen die Funktionalität des entwickelten Plugins *SBMLsqueezer* vorgestellt und erfolgreich getestet wurde. Die manuell erzeugten Reaktionskinetiken wurden dazu den Automatisierten, vom *SBMLsqueezer* erzeugten, gegenübergestellt. Die Arbeit findet ihren Abschluss in einem Vergleich des *SBMLsqueezers* mit einem anderen, ähnlich funktionierendem Tool, dem Cellerator.

### 5.2. Ausblick

Der entwickelte *SBMLsqueezer* ermöglicht einen schnellen und unkomplizierten Prozess der automatischen Erzeugung von Reaktionskinetiken und Reaktionsparametern für im CellDesigner gegebene biochemische Netzwerke. Der *SBMLsqueezer* kann daher als ein gutes Werkzeug betrachtet werden, um die Handhabung der in absehbarer Zukunft weiter steigenden Datenmengen im Bereich der Systembiologie zu erleichtern. Dennoch bietet die derzeitige Version des *SBMLsqueezers* Raum für Verbesserungen:

**Erweiterung der mathematischen Modelle** Es existiert noch eine Vielzahl an gebräuchlichen mathematischen Modellen, die der *SBMLsqueezer* bisher nicht auszudrücken vermag. Darunter das für genregulatorische Netzwerke wichtige S-System oder die Hill-Gleichung, einer erweiterten Michaelis-Menten-Kinetik.

**Einbindung in JCell** JCell ist eine Java-basierte Software zur Simulation und Parameteroptimierung von Netzwerken. Es wäre wünschenswert, wenn der SBMLsqueezer dahingehend modifiziert würde, dass dieser mit JCell dahingehend zusammenarbeitet, dass vom SBMLsqueezer erzeugte Reaktionsparameter mit Hilfe von JCell optimiert werden können.

## A. Ergebnistabellen zu Modell 2

Die nachfolgenden Tabellen zeigen die vom SBMLsqueezer automatisch generierten Kinetiken sowie die manuell erzeugten im Vergleich.

Nr.	Manuell-erzeugte Kinetik	SBMLsqueezer-erzeugte Kinetik
$Re_1$	$k1_{ass}[\text{CD3}][\text{AntiCD3}] - k1_{diss}[\text{CD3-AntiCD3}]$	$v_0 = k_{+,1} \cdot [s_2] \cdot [s_1] - k_{-,1} \cdot [s_5]$
$Re_4$	$k3_{ass}[\text{CD3-AntiCD3-P}][\text{ZAP-70}] - k3_{diss}[\text{CD3-AntiCD3-P-ZAP-70}]$	$v_1 = k_{+,2} \cdot [s_6] \cdot [s_8] - k_{-,2} \cdot [s_7]$
$Re_5$	$k24_{ass}[\text{CD28}][\text{AntiCD28}] - k24_{diss}[\text{CD28-AntiCD28}]$	$v_2 = k_{+,3} \cdot [s_4] \cdot [s_3] - k_{-,3} \cdot [s_{10}]$
$Re_7$	$k19_{ass}[\text{CD28-AntiCD28-P}][\text{PI3K}] - k19_{diss}[\text{CD28-AntiCD28-P-PI3K}]$	$v_3 = k_{+,4} \cdot [s_{11}] \cdot [s_{43}] - k_{-,4} \cdot [s_{12}]$
$Re_{10}$	$\frac{k9_{cat}[\text{LAT-1}][\text{CD3-AntiCD3-ZAP-70-P}]}{k9_m + [\text{LAT-1}]}$	$v_4 = \frac{k_{+,5,0}^{\text{cat}} \cdot [s_9] \cdot [s_{14}] \cdot k_{5,0}^{\text{Mp}} - k_{-,5,0}^{\text{cat}} \cdot [s_9] \cdot [s_{15}] \cdot k_{5,0}^{\text{Ms}}}{k_{5,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{5,0}^{\text{Mp}} + ([s_{14}] \cdot k_{5,0}^{\text{Mp}} + [s_{15}] \cdot k_{5,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{12}$	$\frac{k15_{cat}[\text{PIP2}][\text{CD28-AntiCD28-P-PIBK}]}{k15_m + [\text{PIP3}]}$	$v_5 = \frac{k_{+,6,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{12}] \cdot [s_{17}] \cdot k_{6,0}^{\text{Mp}} - k_{-,6,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{12}] \cdot [s_{18}] \cdot k_{6,0}^{\text{Ms}}}{k_{6,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{6,0}^{\text{Mp}} + ([s_{17}] \cdot k_{6,0}^{\text{Mp}} + [s_{18}] \cdot k_{6,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{14}$	$k18_{ass}[\text{PIP3}][\text{ITK}] - k18_{diss}[\text{PIP3-ITK-Active}]$	$v_6 = k_{+,7} \cdot [s_{18}] \cdot [s_{22}] - k_{-,7} \cdot [s_{21}]$
$Re_{15}$	$k17_{ass}[\text{PIP3}][\text{AKT}] - k17_{diss}[\text{PIP3-AKT-Active}]$	$v_7 = k_{+,8} \cdot [s_{18}] \cdot [s_{23}] - k_{-,8} \cdot [s_{24}]$
$Re_{16}$	$\frac{k27_{cat}[\text{Ca}_{int}^{2+}][\text{IP3}]}{k27_m + [\text{Ca}_{ext}^{2+}]}$	$v_8 = \frac{k_{+,9,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{20}] \cdot [s_{25}] \cdot k_{9,0}^{\text{Mp}} - k_{-,9,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{20}] \cdot [s_{26}] \cdot k_{9,0}^{\text{Ms}}}{k_{9,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{9,0}^{\text{Mp}} + ([s_{25}] \cdot k_{9,0}^{\text{Mp}} + [s_{26}] \cdot k_{9,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{17}$		$v_9 = \frac{k_{+,10,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{32}] \cdot [s_{27}] \cdot k_{10,0}^{\text{Mp}} - k_{-,10,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{32}] \cdot [s_{28}] \cdot k_{10,0}^{\text{Ms}}}{k_{10,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{10,0}^{\text{Mp}} + ([s_{27}] \cdot k_{10,0}^{\text{Mp}} + [s_{28}] \cdot k_{10,0}^{\text{Ms}})}$

Tabelle A.1.: Manuell und automatisierte Kinetiken zu Modell 2.

Nr.	Manuell-erzeugte Kinetik	SBMLsqueezer-erzeugte Kinetik
$Re_{39}$	$\frac{k_{6cat}[\text{CD3-AntiCD3-P-ZAP-70-P}][\text{Lck-Active}]}{k_{6m} + [\text{CD3-AntiCD3}]}$	$v_{17} = \frac{k_{+,18,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{114}] \cdot [s_7] \cdot k_{18,0}^{\text{Mp}} - k_{-,18,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{114}] \cdot [s_9] \cdot k_{18,0}^{\text{Ms}}}{k_{18,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{18,0}^{\text{Mp}} + ([s_7] \cdot k_{18,0}^{\text{Mp}} + [s_9] \cdot k_{18,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{40}$	$\frac{k_{23cat}[\text{CD28-AntiCD28}][\text{Lck-Active}]}{k_{23m} + [\text{CD28-AntiCD28}]}$	$v_{18} = \frac{k_{+,19,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{114}] \cdot [s_{10}] \cdot k_{19,0}^{\text{Mp}} - k_{-,19,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{114}] \cdot [s_{11}] \cdot k_{19,0}^{\text{Ms}}}{k_{19,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{19,0}^{\text{Mp}} + ([s_{10}] \cdot k_{19,0}^{\text{Mp}} + [s_{11}] \cdot k_{19,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{42}$	$\frac{k_{26cat}[\text{PIP2}][\text{LAT-P-PLCy-P-Vav-P}]}{k_{26m} + [\text{PIP2}]}$	$v_{19} = \frac{k_{+,20,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{59}] \cdot [s_{17}] \cdot k_{20,0}^{\text{Mp}} - k_{-,20,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{59}] \cdot [s_{20}] \cdot k_{20,0}^{\text{Ms}}}{k_{20,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{20,0}^{\text{Mp}} + ([s_{17}] \cdot k_{20,0}^{\text{Mp}} + [s_{20}] \cdot k_{20,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{45}$	$k_{11ass}[\text{LAT-P}][\text{PLC-y}] - k_{11diss}[\text{LAT-P-PLCy}]$	$v_{20} = k_{+,21} \cdot [s_{15}] \cdot [s_{57}] - k_{-,21} \cdot [s_{55}]$
$Re_{53}$	$k_{29ass}[\text{Ca}_{ext}^{2+}][\text{Calmodulin}] - k_{29diss}[\text{Calmodulin-2Ca}^{2+}]$	$v_{21} = k_{+,22} \cdot [s_{26}] \cdot [s_{62}] - k_{-,22} \cdot [s_{74}]$
$Re_{54}$	$k_{31ass}[\text{Ca}_{ext}^{2+}][\text{Calmodulin}] - k_{31diss}[\text{Calmodulin-2Ca}^{2+}]$	$v_{22} = k_{+,23} \cdot [s_{74}] \cdot [s_{63}] - k_{-,23} \cdot [s_{64}]$
$Re_{55}$	$\frac{k_{4cat}[\text{CD3-AntiCD3-P}][\text{CD3-AntiCD3}]}{k_{4m} + [\text{CD3-AntiCD3-P}]}$	$v_{23} = \frac{k_{+,24,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{99}] \cdot [s_6] \cdot k_{24,0}^{\text{Mp}} - k_{-,24,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{99}] \cdot [s_5] \cdot k_{24,0}^{\text{Ms}}}{k_{24,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{24,0}^{\text{Mp}} + ([s_6] \cdot k_{24,0}^{\text{Mp}} + [s_5] \cdot k_{24,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{56}$	$\frac{k_{7cat}[\text{CD3-AntiCD3-ZAP-70-P}][\text{SHP-1-P}]}{k_{7m} + [\text{CD3-AntiCD3-ZAP-70-P}]}$	$v_{24} = \frac{k_{+,25,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{99}] \cdot [s_9] \cdot k_{25,0}^{\text{Mp}} - k_{-,25,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{99}] \cdot [s_7] \cdot k_{25,0}^{\text{Ms}}}{k_{25,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{25,0}^{\text{Mp}} + ([s_9] \cdot k_{25,0}^{\text{Mp}} + [s_7] \cdot k_{25,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{59}$		$v_{25} = \frac{k_{+,26,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{115}] \cdot [s_{32}] \cdot k_{26,0}^{\text{Mp}} - k_{-,26,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{115}] \cdot [s_{31}] \cdot k_{26,0}^{\text{Ms}}}{k_{26,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{26,0}^{\text{Mp}} + ([s_{32}] \cdot k_{26,0}^{\text{Mp}} + [s_{31}] \cdot k_{26,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{62}$	$\frac{k_{21cat}[\text{CD28-AntiCD28-P}][\text{SHP-1-P}]}{k_{21m} + [\text{CD28-AntiCD28-P}]}$	$v_{26} = \frac{k_{+,27,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{119}] \cdot [s_{11}] \cdot k_{27,0}^{\text{Mp}} - k_{-,27,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{119}] \cdot [s_{10}] \cdot k_{27,0}^{\text{Ms}}}{k_{27,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{27,0}^{\text{Mp}} + ([s_{11}] \cdot k_{27,0}^{\text{Mp}} + [s_{10}] \cdot k_{27,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{63}$	$\frac{k_{33cat}[\text{Gsk3-P}][\text{Gsk3-Phosph-Active}]}{k_{33m} + [\text{Gsk3-P}]}$	$v_{27} = \frac{k_{+,28,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{104}] \cdot [s_{38}] \cdot k_{28,0}^{\text{Mp}} - k_{-,28,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{104}] \cdot [s_{37}] \cdot k_{28,0}^{\text{Ms}}}{k_{28,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{28,0}^{\text{Mp}} + ([s_{38}] \cdot k_{28,0}^{\text{Mp}} + [s_{37}] \cdot k_{28,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{82}$		$v_{28} = \frac{k_{+,29,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{15}] \cdot [s_{99}] \cdot k_{29,0}^{\text{Mp}} - k_{-,29,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{15}] \cdot [s_{100}] \cdot k_{29,0}^{\text{Ms}}}{k_{29,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{29,0}^{\text{Mp}} + ([s_{99}] \cdot k_{29,0}^{\text{Mp}} + [s_{100}] \cdot k_{29,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{83}$		$v_{29} = \frac{k_{+,30,0}^{\text{cat}} \cdot [s_9] \cdot [s_{100}] \cdot k_{30,0}^{\text{Mp}} - k_{-,30,0}^{\text{cat}} \cdot [s_9] \cdot [s_{99}] \cdot k_{30,0}^{\text{Ms}}}{k_{30,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{30,0}^{\text{Mp}} + ([s_{100}] \cdot k_{30,0}^{\text{Mp}} + [s_{99}] \cdot k_{30,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{84}$		$v_{30} = \frac{k_{+,31,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{99}] \cdot [s_{114}] \cdot k_{31,0}^{\text{Mp}} - k_{-,31,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{99}] \cdot [s_{101}] \cdot k_{31,0}^{\text{Ms}}}{k_{31,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{31,0}^{\text{Mp}} + ([s_{114}] \cdot k_{31,0}^{\text{Mp}} + [s_{101}] \cdot k_{31,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{85}$		$v_{31} = \frac{k_{+,32,0}^{\text{cat}} \cdot [s_9] \cdot [s_{101}] \cdot k_{32,0}^{\text{Mp}} - k_{-,32,0}^{\text{cat}} \cdot [s_9] \cdot [s_{114}] \cdot k_{32,0}^{\text{Ms}}}{k_{32,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{32,0}^{\text{Mp}} + ([s_{101}] \cdot k_{32,0}^{\text{Mp}} + [s_{114}] \cdot k_{32,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{88}$		$v_{32} = \frac{k_{+,33,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{64}] \cdot [s_{105}] \cdot k_{33,0}^{\text{Mp}} - k_{-,33,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{64}] \cdot [s_{104}] \cdot k_{33,0}^{\text{Ms}}}{k_{33,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{33,0}^{\text{Mp}} + ([s_{105}] \cdot k_{33,0}^{\text{Mp}} + [s_{104}] \cdot k_{33,0}^{\text{Ms}})}$



Nr.	Manuell-erzeugte Kinetik	SBMLsqueezer-erzeugte Kinetik
$Re_{89}$		$v_{33} = \frac{k_{+,34,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{40}] \cdot [s_{104}] \cdot k_{34,0}^{\text{Mp}} - k_{-,34,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{40}] \cdot [s_{105}] \cdot k_{34,0}^{\text{Ms}}}{k_{34,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{34,0}^{\text{Mp}} + ([s_{104}] \cdot k_{34,0}^{\text{Mp}} + [s_{105}] \cdot k_{34,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{90}$		$v_{34} = \frac{k_{+,35,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{31}] \cdot [s_{115}] \cdot k_{35,0}^{\text{Mp}} - k_{-,35,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{31}] \cdot [s_{116}] \cdot k_{35,0}^{\text{Ms}}}{k_{35,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{35,0}^{\text{Mp}} + ([s_{115}] \cdot k_{35,0}^{\text{Mp}} + [s_{116}] \cdot k_{35,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{91}$		$v_{35} = k_{+,36} \cdot [s_{116}] \cdot [s_{28}] - k_{-,36} \cdot [s_{115}] \cdot [s_{28}]$
$Re_{92}$	$k_{22_{\text{int}}}[\text{CD28-AntiCD28-P}]$	$v_{36} = k_{+,37} \cdot [s_{11}] - k_{-,37} \cdot [s_{108}]$
$Re_{95}$		$v_{37} = \frac{k_{+,38,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{59}] \cdot [s_{120}] \cdot k_{38,0}^{\text{Mp}} - k_{-,38,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{59}] \cdot [s_{119}] \cdot k_{38,0}^{\text{Ms}}}{k_{38,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{38,0}^{\text{Mp}} + ([s_{120}] \cdot k_{38,0}^{\text{Mp}} + [s_{119}] \cdot k_{38,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{96}$		$v_{38} = \frac{k_{+,39,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{14}] \cdot [s_{119}] \cdot k_{39,0}^{\text{Mp}} - k_{-,39,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{14}] \cdot [s_{120}] \cdot k_{39,0}^{\text{Ms}}}{k_{39,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{39,0}^{\text{Mp}} + ([s_{119}] \cdot k_{39,0}^{\text{Mp}} + [s_{120}] \cdot k_{39,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{97}$	$\frac{k_{10_{\text{cat}}}[\text{LAT-P}][\text{Tyr-Phosph}]}{k_{10_m} + [\text{LAT-P}]}$	$v_{39} = \frac{k_{+,40,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{119}] \cdot [s_{15}] \cdot k_{40,0}^{\text{Mp}} - k_{-,40,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{119}] \cdot [s_{14}] \cdot k_{40,0}^{\text{Ms}}}{k_{40,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{40,0}^{\text{Mp}} + ([s_{15}] \cdot k_{40,0}^{\text{Mp}} + [s_{14}] \cdot k_{40,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{99}$		$v_{40} = \frac{k_{+,41,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{20}] \cdot [s_{121}] \cdot k_{41,0}^{\text{Mp}} - k_{-,41,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{20}] \cdot [s_{122}] \cdot k_{41,0}^{\text{Ms}}}{k_{41,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{41,0}^{\text{Mp}} + ([s_{121}] \cdot k_{41,0}^{\text{Mp}} + [s_{122}] \cdot k_{41,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{100}$		$v_{41} = \frac{k_{+,42,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{59}] \cdot [s_{122}] \cdot k_{42,0}^{\text{Mp}} - k_{-,42,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{59}] \cdot [s_{121}] \cdot k_{42,0}^{\text{Ms}}}{k_{42,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{42,0}^{\text{Mp}} + ([s_{122}] \cdot k_{42,0}^{\text{Mp}} + [s_{121}] \cdot k_{42,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{103}$		$v_{42} = \frac{k_{+,43,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{122}] \cdot [s_{18}] \cdot k_{43,0}^{\text{Mp}} - k_{-,43,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{122}] \cdot [s_{17}] \cdot k_{43,0}^{\text{Ms}}}{k_{43,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{43,0}^{\text{Mp}} + ([s_{18}] \cdot k_{43,0}^{\text{Mp}} + [s_{17}] \cdot k_{43,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{104}$	$k_{20_{\text{int}}}[\text{CD28-AntiCD28-P-PI3K}]$	$v_{43} = k_{+,44} \cdot [s_{12}] - k_{-,44} \cdot [s_{113}]$
$Re_{106}$	$k_{12_{\text{ass}}}[\text{LAT-P}][\text{Vav}] -$ $k_{12_{\text{diss}}}[\text{LAT-P-Vav}]$	$v_{44} = k_{+,45} \cdot [s_{55}] \cdot [s_{60}] - k_{-,45} \cdot [s_{123}]$
$Re_{107}$	$\frac{k_{13_{\text{acat}}}[\text{LAT-P-PLCy-Vav}][\text{CD3-AntiCD3-P-ZAP-70-P}]}{k_{13_{\text{am}}} + [\text{LAT-P-PLCy-Vav}]} +$ $\frac{k_{13_{\text{bcac}}}[\text{LAT-P-PLCy-Vav}][\text{PIP3-ITK-Active}]}{k_{13_{\text{bm}}} + [\text{LAT-P-PLCy-Vav}]}$	$v_{45} = \frac{k_{+,46,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{21}] \cdot [s_{123}] \cdot k_{46,0}^{\text{Mp}} - k_{-,46,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{21}] \cdot [s_{59}] \cdot k_{46,0}^{\text{Ms}}}{k_{46,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{46,0}^{\text{Mp}} + ([s_{123}] \cdot k_{46,0}^{\text{Mp}} + [s_{59}] \cdot k_{46,0}^{\text{Ms}})}$ $+ \frac{k_{+,46,1}^{\text{cat}} \cdot [s_9] \cdot [s_{123}] \cdot k_{46,1}^{\text{Mp}} - k_{-,46,1}^{\text{cat}} \cdot [s_9] \cdot [s_{59}] \cdot k_{46,1}^{\text{Ms}}}{k_{46,1}^{\text{Ms}} \cdot k_{46,1}^{\text{Mp}} + ([s_{123}] \cdot k_{46,1}^{\text{Mp}} + [s_{59}] \cdot k_{46,1}^{\text{Ms}})}$
$Re_{108}$	$k_{14_{\text{ass}}}[\text{LAT-P}][\text{Vav}] -$ $k_{14_{\text{diss}}}[\text{LAT-P-Vav}]$	$v_{46} = \frac{k_{+,47,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{119}] \cdot [s_{59}] \cdot k_{47,0}^{\text{Mp}} - k_{-,47,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{119}] \cdot [s_{123}] \cdot k_{47,0}^{\text{Ms}}}{k_{47,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{47,0}^{\text{Mp}} + ([s_{59}] \cdot k_{47,0}^{\text{Mp}} + [s_{123}] \cdot k_{47,0}^{\text{Ms}})}$

Tabelle A.3.: Manuell und automatisierte Kinetiken zu Modell 2.

Nr.	Manuell-erzeugte Kinetik	SBMLsqueezer-erzeugte Kinetik
$Re_{19}$		$v_{10} = \frac{k_{+,11,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{59}] \cdot [s_{31}] \cdot k_{11,0}^{\text{Mp}} - k_{-,11,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{59}] \cdot [s_{32}] \cdot k_{11,0}^{\text{Ms}}}{k_{11,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{11,0}^{\text{Mp}} + ([s_{31}] \cdot k_{11,0}^{\text{Mp}} + [s_{32}] \cdot k_{11,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{22}$	$\frac{k_{34_{cat}}[\text{Gsk3}][\text{PIP3-AKT-Active}]}{k_{34_m} + [\text{Gsk3}]}$	$v_{11} = \frac{k_{+,12,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{24}] \cdot [s_{37}] \cdot k_{12,0}^{\text{Mp}} - k_{-,12,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{24}] \cdot [s_{38}] \cdot k_{12,0}^{\text{Ms}}}{k_{12,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{12,0}^{\text{Mp}} + ([s_{37}] \cdot k_{12,0}^{\text{Mp}} + [s_{38}] \cdot k_{12,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{23}$	$\frac{k_{35_{cat}}[\text{NFAT}][\text{Gsk3}]}{k_{35_m} + [\text{NFAT}]}$	$v_{12} = \frac{k_{+,13,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{37}] \cdot [s_{39}] \cdot k_{13,0}^{\text{Mp}} - k_{-,13,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{37}] \cdot [s_{40}] \cdot k_{13,0}^{\text{Ms}}}{k_{13,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{13,0}^{\text{Mp}} + ([s_{39}] \cdot k_{13,0}^{\text{Mp}} + [s_{40}] \cdot k_{13,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{24}$	$\frac{k_{30_{cat}}[\text{NFAT-P}][\text{Calmodulin-2Ca}^{2+} - \text{Calcineurin}]}{k_{30_m} + [\text{NFAT-P}]}$	$v_{13} = \frac{k_{+,14,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{64}] \cdot [s_{40}] \cdot k_{14,0}^{\text{Mp}} - k_{-,14,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{64}] \cdot [s_{39}] \cdot k_{14,0}^{\text{Ms}}}{k_{14,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{14,0}^{\text{Mp}} + ([s_{40}] \cdot k_{14,0}^{\text{Mp}} + [s_{39}] \cdot k_{14,0}^{\text{Ms}})}$
$Re_{31}$	$k_{5_{int}}[\text{CD3-AntiCD3-P}]$	$v_{14} = k_{+,15} \cdot [s_6] - k_{-,15} \cdot [s_{49}]$
$Re_{32}$	$k_{8_{int}}[\text{CD3-AntiCD3-P-ZAP-70}]$	$v_{15} = k_{+,16} \cdot [s_7] - k_{-,16} \cdot [s_{50}]$
$Re_{38}$	$\frac{k_{2_{cat}}[\text{CD3-AntiCD3}][\text{Lck-Active}]}{k_{2_m} + [\text{CD3-AntiCD3}]}$	$v_{16} = \frac{k_{+,17,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{114}] \cdot [s_5] \cdot k_{17,0}^{\text{Mp}} - k_{-,17,0}^{\text{cat}} \cdot [s_{114}] \cdot [s_6] \cdot k_{17,0}^{\text{Ms}}}{k_{17,0}^{\text{Ms}} \cdot k_{17,0}^{\text{Mp}} + ([s_5] \cdot k_{17,0}^{\text{Mp}} + [s_6] \cdot k_{17,0}^{\text{Ms}})}$

Tabelle A.4.: Manuell und automatisierte Kinetiken zu Modell 2.

Reaktion	SBMLSqueezer erzeugte Kinetik
vPTS	$v_0 = k_{+,1} \cdot [cglce x] \cdot [cpep]^{65} - k_{-,1} \cdot [cg_{6p}]^{65} \cdot [cpyr]^{65}$
vPGI	$v_1 = k_{+,2} \cdot [cg_{6p}] - k_{-,2} \cdot [cf_{6p}]$
vPGM	$v_2 = k_{+,3} \cdot [cg_{6p}] - k_{-,3} \cdot [cg_{1p}]$
vG6PDH	$v_3 = k_{+,4} \cdot [cg_{6p}] - k_{-,4} \cdot [cpg]$
vPFK	$v_4 = k_{+,5} \cdot [cf_{6p}] - k_{-,5} \cdot [cf dp]$
vTA	$v_5 = k_{+,6} \cdot [cgap] \cdot [csed_{7p}] - k_{-,6} \cdot [cf_{6p}] \cdot [ce_{4p}]$
vTKA	$v_6 = k_{+,7} \cdot [crib_{5p}] \cdot [c xyl_{5p}] - k_{-,7} \cdot [cgap] \cdot [csed_{7p}]$
vTKB	$v_7 = k_{+,8} \cdot [ce_{4p}] \cdot [c xyl_{5p}] - k_{-,8} \cdot [cgap] \cdot [cf_{6p}]$
vMURSyNTH	$v_8 = k_{+,9} \cdot [cf_{6p}]^2 - k_{-,9} \cdot [X]$
vALDO	$v_9 = k_{+,10} \cdot [cf dp] - k_{-,10} \cdot [cdhap] \cdot [cgap]$
vGAPDH	$v_{10} = k_{+,11} \cdot [cgap] - k_{-,11} \cdot [cpgp]$
vTIS	$v_{11} = k_{+,12} \cdot [cdhap] - k_{-,12} \cdot [cgap]$
vTRPSYNTH	$v_{12} = k_{+,13} \cdot [X] - k_{-,13} \cdot [cpyr] \cdot [cgap]$
vG3PDH	$v_{13} = k_{+,14} \cdot [cdhap] - k_{-,14} \cdot [X]$
vPGK	$v_{14} = k_{+,15} \cdot [cpgp] - k_{-,15} \cdot [cpg_3]$
vsersynth	$v_{15} = k_{+,16} \cdot [cpg_3] - k_{-,16} \cdot [X]$
vrpGluMu	$v_{16} = k_{+,17} \cdot [cpg_3] - k_{-,17} \cdot [cpg_2]$
vENO	$v_{17} = k_{+,18} \cdot [cpg_2] - k_{-,18} \cdot [cpep]$
vPK	$v_{18} = k_{+,19} \cdot [cpep] - k_{-,19} \cdot [cpyr]$
vpepC xylase	$v_{19} = k_{+,20} \cdot [cpep] - k_{-,20} \cdot [X]$
vSynth1	$v_{20} = k_{+,21} \cdot [cpep] - k_{-,21} \cdot [X]$
vSynth2	$v_{21} = k_{+,22} \cdot [cpyr] - k_{-,22} \cdot [X]$
vDAHPS	$v_{22} = k_{+,23} \cdot [ce_{4p}] \cdot [cpep] - k_{-,23} \cdot [X]$
vPDH	$v_{23} = k_{+,24} \cdot [cpyr] - k_{-,24} \cdot [X]$
vMethSynth	$v_{24} = k_{+,25} \cdot [X] - k_{-,25} \cdot [cpyr]$
vPGDH	$v_{25} = k_{+,26} \cdot [cpg] - k_{-,26} \cdot [cribu_{5p}]$
vR5PI	$v_{26} = k_{+,27} \cdot [cribu_{5p}] - k_{-,27} \cdot [crib_{5p}]$
vRu5P	$v_{27} = k_{+,28} \cdot [cribu_{5p}] - k_{-,28} \cdot [c xyl_{5p}]$
vPPK	$v_{28} = k_{+,29} \cdot [crib_{5p}] - k_{-,29} \cdot [X]$
vG1PAT	$v_{29} = k_{+,30} \cdot [cg_{1p}] - k_{-,30} \cdot [X]$
vG6P	$v_{30} = k_{+,31} \cdot [cg_{6p}] - k_{-,31} \cdot [X]$
vf6P	$v_{31} = k_{+,32} \cdot [cf_{6p}] - k_{-,32} \cdot [X]$
vfdP	$v_{32} = k_{+,33} \cdot [cf dp] - k_{-,33} \cdot [X]$
vGAP	$v_{33} = k_{+,34} \cdot [cgap] - k_{-,34} \cdot [X]$

Tabelle A.5.: Automatisierte Kinetiken zu Modell 3.

## B. Ergebnistabellen zu Modell 3

Die nachfolgenden Tabellen zeigen die vom SBMLSqueezer automatisch generierten Kinetiken.

Reaktion.	SBMLSqueezer erzeugte Kinetik
vDHAP	$v_{34} = k_{+,35} \cdot [cdhap] - k_{-,35} \cdot [X]$
vPGP	$v_{35} = k_{+,36} \cdot [cpgp] - k_{-,36} \cdot [X]$
vPG3	$v_{36} = k_{+,37} \cdot [cpg3] - k_{-,37} \cdot [X]$
vpg2	$v_{37} = k_{+,38} \cdot [cpg2] - k_{-,38} \cdot [X]$
vPEP	$v_{38} = k_{+,39} \cdot [cpep] - k_{-,39} \cdot [X]$
vRibu5p	$v_{39} = k_{+,40} \cdot [ribu5p] - k_{-,40} \cdot [X]$
vRIB5P	$v_{40} = k_{+,41} \cdot [rib5p] - k_{-,41} \cdot [X]$
vXYL5P	$v_{41} = k_{+,42} \cdot [cxl5p] - k_{-,42} \cdot [X]$
vSED7P	$v_{42} = k_{+,43} \cdot [csed7p] - k_{-,43} \cdot [X]$
vpyr	$v_{43} = k_{+,44} \cdot [cpyr] - k_{-,44} \cdot [X]$
vPG	$v_{44} = k_{+,45} \cdot [cpg] - k_{-,45} \cdot [X]$
vE4P	$v_{45} = k_{+,46} \cdot [ce4p] - k_{-,46} \cdot [X]$
vGLP	$v_{46} = k_{+,47} \cdot [cglp] - k_{-,47} \cdot [X]$
vEXTER	$v_{47} = k_{+,48} \cdot [X] - k_{-,48} \cdot [cglcex]$

Tabelle B.1.: Automatisierte Kinetiken zu Modell 3.

# Literaturverzeichnis

- [AF03] A. FINNEY, M. HUCKA: *Systems biology markup language: Level 2 and beyond*. Biochem. Soc. Trans. 31. 2003, pages 1472-1473, 2003.
- [AFN06] ANDREW FINNEY, MICHAEL HUCKA und NICHOLAS LE NOVÉRE: *Systems Biology Markup Language(SBML)Level 2: Structures and Facilities for Model Definitions*. SBML.org, URZ, September 2006.
- [Atk06] ATKINS, P.W.: *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
- [Bis00] BISSWANGER, HANS: *Enzymkinetik – Theorie und Methoden*. WILEY-VCH, 2000.
- [Bor05] BORNSTEIN, BEN: *libsbml-Developer’s Manual*. sbml.org, URZ, Oktober 2005.
- [Bos94] BOSSEL, H.: *Modellbildung und Simulation: Konzepte, Verfahren und Modelle zum Verhalten dynamischer Systeme*. Vieweg-Verlag, 1994.
- [BS01] B.E. SHAPIRO, E.D. MJOLSNESS: *Developmental Simulations with Cellerator*. Second International Conference of System Biology (ICBS), November 2001.
- [BS03] B.E. SHAPIRO, A. LEVCHENKO, E.M. MEYEROWITZ B.J. WOLD E.D. MJOLSNESS: *Cellerator: extending a computer algebra system to include biochemical arrows for signal transduction simulations*. Bioinformatics 19(5), pages 677-8., March 2003.
- [CB04] CORNISH-BOWDEN, ATHEL: *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. PORTLAND PRESS, 2004.
- [CC] C. CHASSAGNOLE, N. NOISOMMIT-RIZZI, J. W. SCHMID K. MAUCH M. REUSS: *Dynamic Modelling of the Central Carbon Metabolism of Escherichia Coli*. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 79, No. 1., pages. 53-73, January.
- [CC02] CHRISTOPHE CHASSAGNOLE, MARUEMOL NOISOMMIT-RIZZI, JOACHIM W. SCHMID KLAUS MAUCH MATTHIAS REUSS: *Dynamic Modeling of the Central Carbon Metabolism of Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering, Vol.79, NO. 1, Institute of biochemical Engineering, Universität Stuttgart, July 2002.
- [Cen02] CENTLER, F.: *Deterministische und stochastische Simulation eines Sensorkinase-Antwortregulator-Systems*. Technical report, 2002.
- [ea03] AL, A. FUNAHASHI ET: *CellDesigner: a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks*. Biosilico, 5, pages 159-162, 2003.
- [EK] E. KLIPP, W. LIEBERMEISTER, A. HELBIG A. KOWALD J. SCHABER: *Standarts in Computational Systems Biology - Supplementary Material: Statements About Specific Computational Tools*. NBT0407-390-S1.

- [GL03] G. LOEFFLER, P. PETRIDES: *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, 2003.
- [HS96] HEINRICH, REINHART und STEFAN SCHUSTER: *The Regulation of Cellular systems*. Chapman Hall, 1996.
- [IoSB07] SYSTEM BIOLOGY, TOKIO, JAPAN. INSTITUTE OF: *CellDesigner Help*. <http://www.celldesigner.org/help/index.html>, 2007.
- [Kit00] KITANO, HIROAKI: *Perspective on Systems Biology*. New Generations Computing 18, S. 199-216, 2000.
- [Kit03] KITANO, H.: *A graphical notation for biochemical networks*. Biosilico, 1, pages 169-176, 2003.
- [MH03] M. HUCKA, A. FINNEY, H.M. SAURO H. BOLOURI J.C. DOYLE H. KITANO: *The systems biology markup language(SBML): a medium for Representation and exchange of biochemical network models*. Bioinformatics, Oxford University Press, Vol. 19 no. 4 2003, pages 524-531, Institute for Theoretical Chemistry, Universität Wien., April 2003.
- [MUW06] M. ULLAH, H. SCHMIDT, K.-H. CHO und O. WOLKENHAUER: *Deterministic modelling and stochastic simulation of biochemical pathways using MATLAB*. IEE Proc.-Syst. Biol., Vol. 153, No. 2, Systems Biology and Bioinformatics Group, Universität Rostock, März 2006.
- [Rei02] REISS, THOMAS: *Systeme des Lebens - Systembiology*. Technical report, Bundesministerium für Bildung und Forschung, 2002.
- [Sau05] SAURO, H. M.: *Databases for Systems Biology*. Technical report, Keck Graduate Institute, 2005.
- [Sav91] SAVAGEAU, M. A.: *20 years of S-Systems*. Canonical Nonlinear Modelling. S-Systems approach to understand complexity, pages 1-44, 1991.
- [Sch06] SCHRÖDER, ADRIAN: *Modellierung der T-Zell-Signal transduktion*. Diplomarbeit, Wilhelm-Schickard-Institut für Informatik, Universität Tübingen, October 2006.
- [Seg93] SEGEL, I.: *Enzyme Kinetics - Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. Wiley Classics Library Edition, 1993.
- [ST07] SBML-TEAM: *LibSBML Memory Consumption on SBML Hackaton*. <http://www.celldesigner.org/help/index.html>, 2007.
- [TI01] T. IDEKER, T. GALITSKI, L. HOOD: *A new approach to decoding life: Systems Biology*. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2, 2001.
- [WL06] WOLFRAM LIEBERMEISTER, EDDA KLIPP: *Bringing metabolic networks to life: convenience rate law and thermodynamic constraints*. Theoretical Biology and Medical Modelling 2006, 10.1186/1742-4682-3-41, Computational Systems Biology, Max Planck Institute for Genetics, Ihnestr. 63-73, 14195 Berlin, Dezember 2006.