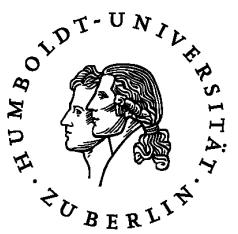


H U M B O L D T - U N I V E R S I T Ä T Z U B E R L I N



MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHE FAKULTÄT I
INSTITUT FÜR BIOLOGIE

DIPLOMARBEIT
ZUM ERWERB DES AKADEMISCHEN GRADES
DIPLOM-BIOPHYSIKER/IN

Metabolische Netzwerkrekonstruktion des
humanen Hepatozyten Kernmetabolismus

&

Kinetisches Netzwerk der
Glykolyse, Gluconeogenese und des Glykogenstoffwechsels

vorgelegt von Matthias König
geb. am 25.06.1981 in Stuttgart
angefertigt in der Arbeitsgruppe Computational Systems Biochemistry
am Institut für Biochemie der Charite - Universitätsmedizin Berlin
Berlin, im Dezember 2009

Betreuer: Prof. Hermann-Georg Holzhütter & Sascha Bulik
Betreuer an der Humboldt Universität: Prof. Edda Klipp

Zusammenfassung

Metabolische Netwerkrekonstruktion des humanen Hepatozyten Kernmetabolismus

In dieser Arbeit wurde ein metabolisches Netzwerk des humanen Hepatozyten Kernstoffwechsels rekonstruiert. Zur funktionellen Validierung des Netzwerks wurden Flussrechnungen mittels Flussbilanzanalyse (FBA) durchgeführt. Die Simulationen zur Sauerstoffbelastung, zur Untersuchung des Pentosephosphatwegs und der Gluconeogenese ausgehend von verschiedenen Substraten werden detailliert diskutiert.

Kinetisches Netzwerk der Glykolyse, Gluconeogenese und des Glykogenstoffwechsels

In dieser Arbeit wurde ein detailliertes kinetisches Modell der Glykolyse, Gluconeogenese und des Glykogenstoffwechsels des humanen Hepatozyten aufgestellt. Dieses beinhaltet sowohl allosterische Regulationsmechanismen als auch hormonelle Regulation durch Insulin und Glucagon. Die Hormone wirken dabei über Veränderung des Phosphorylierungszustands interkonvertierbarer Enzyme.

Das Modell ist in der Lage das schnelle Umschaltverhalten des Hepatozyten zwischen HGP (hepatic glucose production) und HGU (hepatic glucose utilisation) in Abhängigkeit von der externen Glucosekonzentration zu zeigen. Der Glykogenspeicher wird bei HGP geleert und bei HGU gefüllt. Laktat hat nur bei niedrigen Konzentrationen einen Einfluss auf die HGP.

Bei gestörten Insulin- und Glucagonsignalen ist auch der Umschaltprozess zwischen HGP und HGU gestört. Im Fall von Diabetes Typ II führt diese Störung zu einer erhöhten HGP, der Glykogenstoffwechsel wird nur wenig verändert. Durch Wiederherstellung der Insulin- und Glucagonantwort können diese Störungen teilweise behoben werden.

Vorwort

Danksagung

Ich bedanke mich für die Betreuung durch Prof. Hermann-Georg Holzhütter und Sascha Bulik.

Vielen Dank an Andreas Hoppe, der mir bei den Flussrechnungen hilfreich zur Seite stand und dessen FBA Simulationspaket Fasimu ich für die FBA Rechnungen verwendete. Vielen Dank an Michael Weidlich für die Unterstützung bei der Datenbank Implementation und hilfreichen Gesprächen zum Datenmanagement. Weiterhin möchte ich mich bei Christian Bölling für die Hilfe zur evidenzbasierten Netzwerkrekonstruktion und bei Christoph Gille für die Unterstützung mit Metannogen in der Netzwerkrekonstruktion bedanken.

Weiterhin danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe mathematische Systembiologie, die hier nicht namentlich erwähnt werden für die kreative und schöne Arbeitsatmosphäre und hilfreiche Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis

1 Metabolische Netzwerkrekonstruktion	2
1.1 Einleitung	2
1.1.1 Netzwerkrekonstruktion	2
1.1.2 Leber und Hepatozyt	3
1.1.3 Rekonstruktion Kernhepatozyt	3
1.2 Methoden	3
1.2.1 Validierung Netzwerkobjekte	4
1.2.2 Validierung im Netzwerkkontext	4
1.3 Ergebnis	6
2 Flussbilanzanalyse [FBA]	10
2.1 Einleitung	10
2.2 Theorie und Methode	11
2.2.1 Modelldefinition	11
2.2.2 Stöchiometrische Matrix und Fliessgleichgewicht	12
2.2.3 Zusätzliche Bedingungen	13
2.2.4 Zielfunktion	13
2.2.5 Software	15
2.2.6 Simulationen	15
2.2.7 Einzelsimulation	17
2.3 Ergebnisse	19
2.3.1 Sauerstoffabhängige Glucoseverwertung	21
2.3.2 Pentosephosphatweg [PPP]	34
2.3.3 Gluconeogenese	40
2.3.4 Diskussion	52
3 Kinetisches Modell	56
3.1 Einleitung	56
3.1.1 Glucosehomöostase	56
3.1.2 Rolle der Leber in der Glucosehomöostase	57
3.1.3 Regulationmechanismen	60

3.1.4	Störungen der Blutglucosehomöostase - Diabetes	66
3.1.5	Zielstellung kinetisches Modell und Hypothesen	67
3.2	Methoden	69
3.2.1	Netzwerkrekonstruktion	69
3.2.2	Sammlung kinetischer Parameter	69
3.2.3	Aufstellung der Ratengleichungen	70
3.2.4	Anfangswerte und Flusswerte	70
3.2.5	Optimierung der V_{max}	70
3.2.6	Simulationen	71
3.2.7	Visualisierung	72
3.3	Kinetisches Modell	73
3.3.1	Modellübersicht	73
3.3.2	Ratengleichungen	76
3.3.3	Insulin und Glucagon - Dose-Response Kurven	91
3.3.4	Signalfunktion γ	93
3.3.5	Interkonvertierbare Enzyme	97
3.4	Simulationen	103
3.4.1	Umschalten zwischen HGU und HGP	103
3.4.2	Glykogenspeicher - Glykogen als Puffer	124
3.4.3	Diabetes	124
3.4.4	Genexpression	128
3.4.5	Zusammenfassung	131
3.5	Diskussion	132
3.5.1	Vereinfachungen in dem Modell	132
3.5.2	Futile Cycles	135
3.5.3	Genexpression	135
3.5.4	Abweichungen vom Experiment	136
3.6	Ausblick	137
3.6.1	Zeitabhängigkeit der Hormonantwort	137
3.6.2	Optimierung der V_{max}	137
3.6.3	MCA	137
3.6.4	Erweiterung des Modells	138
3.6.5	Integration von Genexpressionsdaten	139
3.6.6	Zeitlich veränderliche Blutglucosekonzentrationen	139

Kapitel 1

Metabolische Netzwerkrekonstruktion

1.1 Einleitung

1.1.1 Netzwerkrekonstruktion

Die mathematische Modellierung metabolischer Reaktionsnetzwerke ist ein zentraler Bereich der Systembiologie. Ein erster Schritt ist hierfür, die Rekonstruktion des betrachteten Netzwerks und die Aufstellung der zugehörigen stöchiometrischen Matrix.

Die metabolische Netzwerkrekonstruktion besteht aus der Sammlung aller relevanten Prozesse (v.a. Reaktionen und Transporter) und der beteiligten Metabolite des Systems, sowie aus der Zuordnung zu den verschiedenen Kompartimenten. Im Zuge der Rekonstruktion werden Informationen zu Genen, Proteinen und die durch diese ermöglichten Prozesse in den Kontext eines biochemischen Netzwerks integriert.

Die Verfügbarkeit sequenziert und annotierter Genome, sowie der Fortschritt in Hochdurchsatzverfahren in Genomics, Metabolomics und Proteomics in Kombination mit einer enormen Menge an wissenschaftlicher Literatur hat die Rekonstruktion von metabolischen Netzwerken vieler Organismen ermöglicht [1, 2, 3, 4].

Mit dem rekonstruierten Netzwerk können mittels Methoden wie der Flussbilanzanalyse (FBA) Flussverteilungen simuliert und Einsichten in die Funktionalität des Netzwerks gewonnen werden [5] (Kap. 2). Basierend auf der topologischen Struktur können Netzwerkeigenschaften mit graphentheoretischen Methoden untersucht werden (Small World Eigenschaften [6, 7], Suche von Netzwerkmotiven und Regulationsstellen [8]) [9]. Weiterhin wird durch die Rekonstruktion eine Plattform geschaffen um 'omics' Daten zu analysieren und visualisieren.

1.1.2 Leber und Hepatozyt

Die menschliche Leber besitzt viele unterschiedliche Funktionen, die von Detoxifizierung, Synthese von Plasmaproteinen wie Albumin und Fibrinogen, Galleproduktion, Cholesterolsynthese bis zur Ammoniakentgiftung reichen. Die Leber hat eine wesentliche Rolle im Aminosäure-, Protein-, Lipid-, und Lipoprotein- und v.a. auch im Kohlenhydratstoffwechsel [10] und bildet eine zentrale metabolische Schaltstelle, die die Energieversorgung des Organismus sicherstellt (insbesondere die Glucoseversorgung).

Hepatozyten sind der Hauptzelltyp der Leber und machen 80 % des Lebervolumens und ungefähr 60-65 % der Gesamtzellzahl der Leber aus [10]. Die metabolische Leistung der Leber wird von den Hepatozyten erbracht.

1.1.3 Rekonstruktion Kernhepatozyt

Die Rekonstruktion konzentrierte sich daher auf die zentralen Stoffwechselwege und Funktionalität der Leber:

- Glykolyse und Gluconeogenese
- Glykogenstoffwechsel
- Pentosephosphatweg (PPP)
- Purin- und Pyrimidinstoffwechsel
- Citratzyklus (TCA)
- Fettsäuresynthese und β -Oxidation
- Aminosäuremetabolismus
- Glutathion und Folat Reaktionen
- NH₃ Fixierung und Detoxifizierung
- Ketonkörpersynthese

Die Rekonstruktion war eingebunden in die Rekonstruktion des gesamten humanen Hepatozytenmetabolismus [1].

1.2 Methoden

Ausgangspunkt der Netzwerkrekonstruktion war eine Reaktionsliste basierend auf KEGG pathway maps [11], welche das initiale Netzwerk bildete. Durch einen iterativen Prozess der Validierung, Beseitigung von Inkonsistenzen, Netzwerkerweiterung und Auswertung von FBA Simulationen wurde diese Reaktionsliste zu einem funktionellen Netzwerk (Abb. 1.1). Die Kuratierung erfolgte sowohl auf Ebene der isolierten Netzwerkobjekte, als auch durch Betrachtung der Einzelobjekte im Netzwerkkontext.

1.2.1 Validierung Netzwerkobjekte

Ausgehend von der anfänglichen Netzwerkrekonstruktion wurde eine systematische Validierung aller Netzwerkelemente mittels Literaturrecherche und Integration vorhandener Datenbankinformationen durchgeführt. Dabei wurden unter anderem KEGG [11], Reactome [12], MetaCyc (HumanCyc) [13], BRENDA [14], GeneDB [15] und UniProt [16] verwendet.

Reaktionen und Transporter, für die keine Evidenz im humanen Hepatozyten vorhanden ist, wurden entfernt. Prozesse, die nicht Teil des Netzwerks sind, für die aber Evidenz vorhanden war, wurden hinzugefügt. Inkonsistenzen wurden beseitigt und sichergestellt, dass alle Elemente des Netzwerks korrekt und akkurat annotiert sind.

Im Zuge dieser individuellen Überprüfung wurden auch die Reaktionsstöchiometrien und Massenbilanz aller Prozesse kontrolliert.

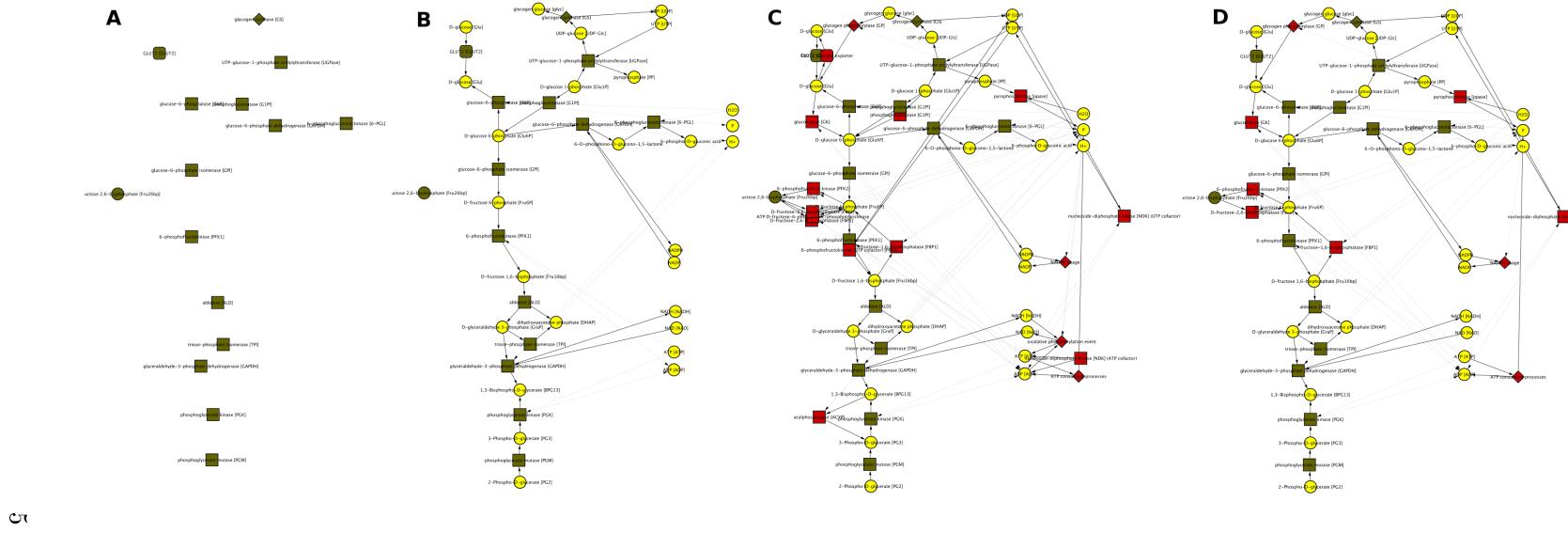
1.2.2 Validierung im Netzwerkkontext

Neben der Validierung auf Ebene der isolierten Netzwerkobjekte, wurde auch Validierung im Netzwerkkontext betrieben.

So wurden alle Dead End Metabolite (Metabolite, die nur an einem Prozess beteiligt sind) analysiert und in das Netzwerk integriert. Hierzu wurden unter anderem Reaktionen und Transporter, die die Dead End Metabolite mit dem übrigen Netzwerk verbinden kuratiert und bei vorhandener Evidenz in das Netzwerk aufgenommen.

Die in der Literatur beschriebenen Synthese- und Abbauwege von Aminosäuren, Purinen, Pyrimidinen, Glucose, Harnstoff müssen in dem Netzwerk realisierbar sein. Fehlende Reaktionen und Transporter wurden integriert, damit die beschriebenen Reaktionsfolgen in dem Netzwerk enthalten sind.

Weiterhin wurden in jedem Iterationsschritt der Rekonstruktion FBA Simulationen zur funktionalen Validierung durchgeführt. Hierdurch konnten Probleme, wie fehlende und falsche Reaktionen und Kompartimentzuordnung, beseitigt werden (Kap. 2).



5

Abbildung 1.1: Schrittweise Erweiterung der Reaktionsliste zu einem funktionellen Netzwerk. A) Liste von Objekten, die Bestandteil der Rekonstruktion sind (grün). B) Erweiterung über Inferenz (gelb) der beteiligten Metabolite C) Erweiterung des Netzwerks um mögliche Kandidatenprozesse und -metabolite (rot) D) Nur Kandidaten, mit ausreichender Evidenz werden dem Netzwerk hinzugefügt. Validierung erfolgt auf Ebene der Einzelobjekte und mittels netzwerkbasierten Methoden wie Dead End Analyse und FBA.

1.3 Ergebnis

Teil dieser Arbeit war die Rekonstruktion des humanen Hepatozyten Kernstoffwechsels. Das Netzwerk wurde funktionell mittels FBA Rechnungen validiert. Die abgeschlossene Rekonstruktion besteht aus 766 Netzwerkobjekten, die in Tab. 1.3 aufgeschlüsselt sind. Das Netzwerk ist in der Lage über 100 vorgegebene FBA Zielstellungen erfolgreich zu realisieren (Kap.2). Eine Netzwerkübersicht ist in Abb. 1.2 u. 1.3 dargestellt.

Das Gesamtnetzwerk wurde zur Untersuchung verschiedener Fragestellungen mittels FBA verwendet (Kap. 2) und das Teilnetzwerk der Glykolyse, Gluconeogenese und des Glykogenstoffwechsels kinetisch modelliert (Kap. 3).

<i>Netzwerkobjekte</i>	766	(100)
<i>Prozesse</i>	402	(52.5)
<i>Reaktionen</i>	296	(38.6)
Einmalige Reaktionen	274	
Zytosol	243	(31.7)
Mitochondrium	53	(6.9)
<i>BlackboxEvents</i>	24	(3.1)
Zytosol	7	(0.9)
Mitochondrium	14	(1.8)
Innere Mitochondrien Membran	3	(0.4)
<i>Transportreaktionen</i>	82	(10.7)
Zytosol \leftrightarrow Blut	48	(6.3)
Zytosol \leftrightarrow Mitochondrium	34	(4.4)
<i>Metabolite</i>	364	(47.5)
Einmalige Metabolite	199	
Zytosol	245	(32.0)
Mitochondrium	79	(10.3)
Blut	40	(5.2)

Tabelle 1.1: Übersicht der Netzwerkrekonstruktion des humanen Hepatozyten Kernmetabolismus. Aufschlüsselung der Netzwerkobjekte mit Angabe von absoluten Zahlen (prozentualen Anteil). Einmalige Metabolite und Reaktionen sind Netzwerkobjekte, die nur in einem der Kompartimente vorkommen. BlackboxEvents sind Zusammenfassung von Reaktionsschritten zu einem Ersatzprozess. Beispielsweise der Fettsäureabbau durch β -Oxidation, in dem die Fettsäure unter Bildung von NADH, FADH₂ und Acetyl-CoA schrittweise um 2C-Atome verkürzt wird. Der BlackboxEvent betrachtet nur den Gesamtabbau der Fettsäure zu Acetyl-CoA unter Speicherung eines Teils der Energie in Form reduzierter Reduktionsäquivalenten .

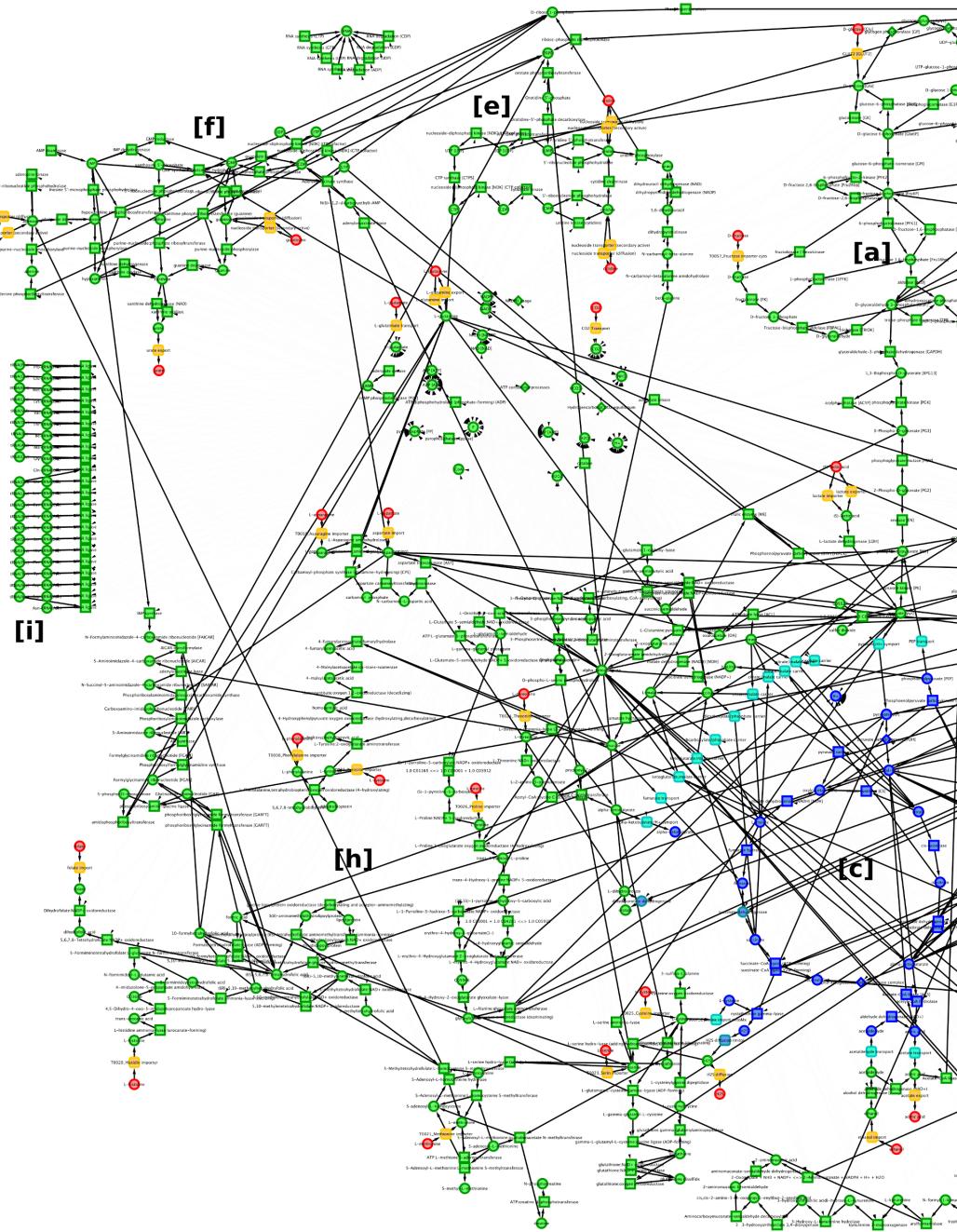


Abbildung 1.2: Übersicht des humanen Hepatozyten Kernstoffwechsels. [a] Glykolyse und Gluconeogenese, [b] Pentosephosphatweg, [c] TCA, [d] Harnstoffzyklus, [e] Purinmetabolismus, [f] Pyrimidinmetabolismus, [g] Ketonkörper [h] Aminosäuremetabolismus [i] Proteineinmetabolismus

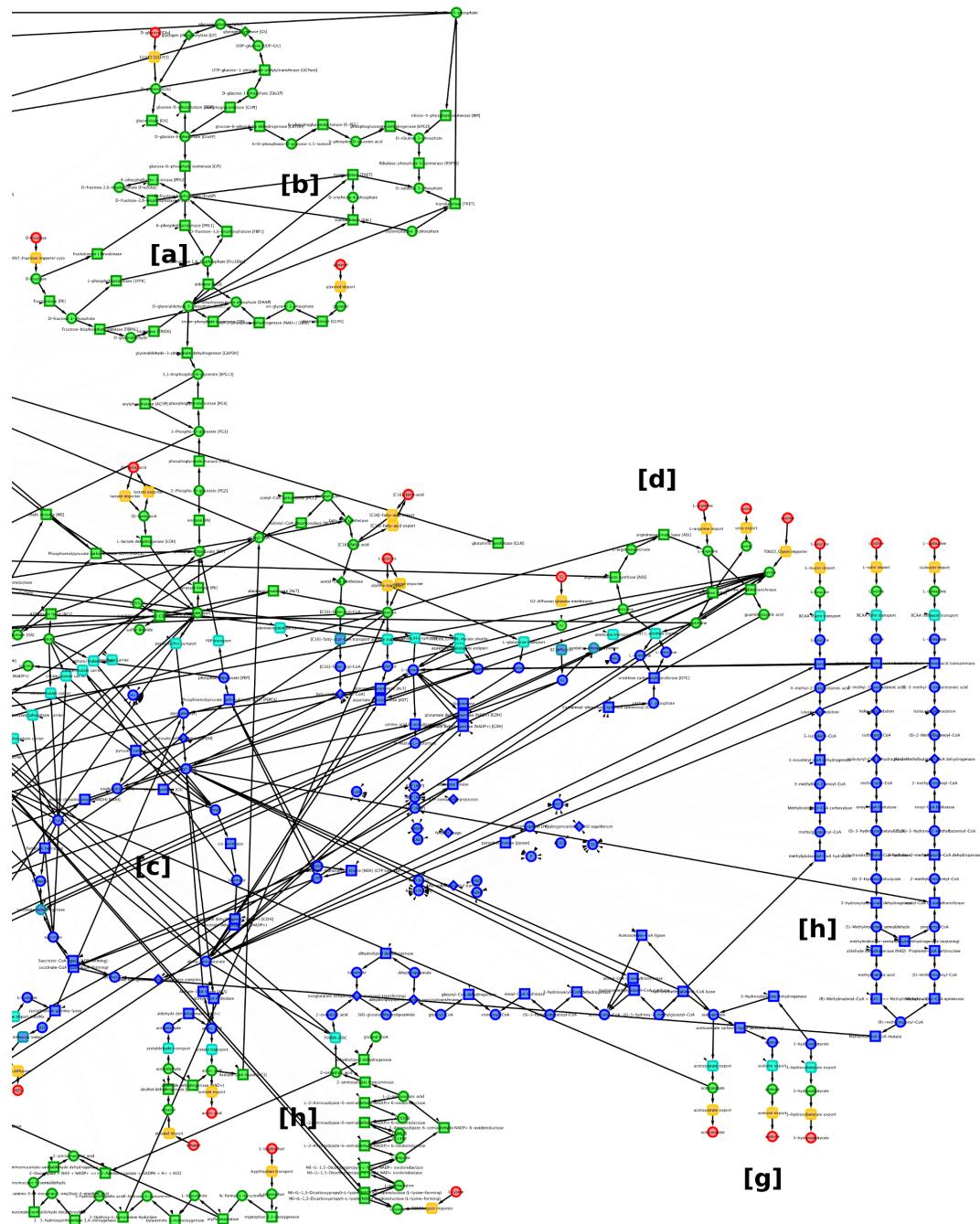


Abbildung 1.3: Zytosol [grün], Mitochondrium [blau], mitochondriale Membran [hellblau], Plasmamembran [orange], Blut [rot]; Metabolit [Kreis], Reaktion [Rechteck], Transport [abgerundetes Rechteck], BlackboxEvent [Raute]; Kanten zu den Kofaktoren sind nicht eingezeichnet. Abbildung in hoher Auflösung und Cytoscape Datei unter <http://www.charite.de/sysbio/people/koenig/diploma>.

Kapitel 2

Flussbilanzanalyse [FBA]

2.1 Einleitung

Modelle basierend auf gewöhnlichen Differentialgleichungen (ODE) ermöglichen es, dynamische Zustandsänderungen von Zellen zu untersuchen. Die Modellierung großer metabolischer Netzwerke mittels ODE gestaltet sich allerdings als schwierig, da die mechanistischen Details und die kinetischen Parameter der Einzelprozesse nur in seltenen Fällen bekannt sind [8]. Weiterhin sind die für die Modellierung benötigten experimentellen Metabolitprofile und Flussdaten noch nicht ausreichend genug vorhanden, um prediktive kinetische Modelle großer Netzwerke aufzustellen [17].

Daher werden alternative Methoden zur Analyse großer metabolischer Netzwerke benötigt. Die FBA ist eine solche Methode, die weder kinetischen Parameter noch Metabolitkonzentrationen benötigt, sondern zunächst mit der stöchiometrischen Matrix des Systems auskommt. Sie ist eine weit verbreitete Methode zur Berechnung stationärer Flüsse in großen Netzwerken und wurde bereits zur Untersuchung vieler metabolischer Netzwerke von der Größe des Genoms (genome-scale) verwendet [2, 4, 1]. Prediktive Aussagen mittels FBA sind für Prokaryoten wie *S. aureus* [3] oder *E. coli* [18] über Eukaryoten wie *S. cerevisiae* [2] bis hin zu humanen Zelltypen wie Erythrozyt [19] oder Hepatozyt [1] möglich.

Die FBA ist eine mathematische Methode um Flussverteilungen im Fliessgleichgewicht in Netzwerken zu berechnen, die zusätzliche an das System gestellte Bedingungen (constraint) erfüllen müssen. Die Flusslösungen werden dabei bezüglich einer vorgegebenen Zielfunktion optimiert.

Den möglichen Phänotypen eines biologischen Systems sind Bedingungen auferlegt [20, 21]. Diese Bedingungen sind physikalische Gesetze wie Massen- und Energieerhaltung, topologische Bedingungen wie die Beschränkung von Metaboliten auf bestimmte Kompartimente oder umweltbedingte Bedingungen wie die Verfügbarkeit von Ressourcen [17]. Durch diese Einschränkungen

wird der Raum der möglichen Flusslösungen begrenzt.

Dennoch existieren im Allgemeinen immer noch unendlich viele unterschiedliche Flusslösungen. Um eine eindeutige Lösung zu erhalten werden die mit den Nebenbedingungen verträglichen Flusslösungen bezüglich einer Zielfunktion optimiert. Beispiele für Zielfunktionen sind die Maximierung des Zellwachstum oder der Biomasseproduktion oder Minimierung des Gesamtflusses des Systems.

Die FBA ist auf der einen Seite ein effektives Werkzeug, um große biologische Netzwerke zu untersuchen und experimentell testbare Vorhersagen zu treffen [17]. So kann beispielsweise leicht die Auswirkung von Störungen auf die Flusslösungen untersucht werden. Die Folgen einer Gendelletion können simuliert werden, indem der Fluss durch die Reaktionen, die von dem Gen kodiert werden, verboten wird. Inhibitorstudien können auf ähnliche Weise durchgeführt werden, indem der Fluss durch die inhibierten Reaktionen auf einen Bruchteil des normalen Flusses beschränkt wird. Die veränderten Flusslösungen erlauben Vorhersagen über die Folgen der Systemveränderung.

Auf der anderen Seite sind die Ergebnisse in weitem Maße hypothetischer Natur, da die Methode auf plausiblen aber schwer überprüfbaren Optimalitätsprinzipien beruhen [22].

Gute Übersichten über die Methode der FBA sind Oberhardt et al. [23], Lee et al. [17] oder Kauffman et al [24].

2.2 Theorie und Methode

Um Flussverteilungen mittels FBA zu berechnen, werden die stöchiometrische Matrix S des zu untersuchenden Systems, zusätzliche Bedingungen und eine definierte Zielfunktion Z benötigt. Die FBA geht davon aus, dass das metabolische Netzwerk einen Zustand im Fließgleichgewicht erreicht, der durch die vorgegebenen Bedingungen beschränkt wird. Vorhersagen für die Flusswerte erhält man durch Optimierung der Zielfunktion Z bei gleichzeitiger Erfüllung der Bedingungen. Die Methodik der FBA lässt sich in vier Schritte zerlegen [24]:

- Modelldefinition
- Stöchiometrische Matrix und Bedingung des Fließgleichgewichts
- Definition zusätzlicher Bedingungen
- Zielfunktion

2.2.1 Modelldefinition

Als Ausgangspunkt der FBA muss das metabolische Netzwerk aufgestellt werden. Dies geschieht mittels metabolischer Netzwerkkonstruktion (s. 1) und Erzeugung eines zu untersuchende Mo-

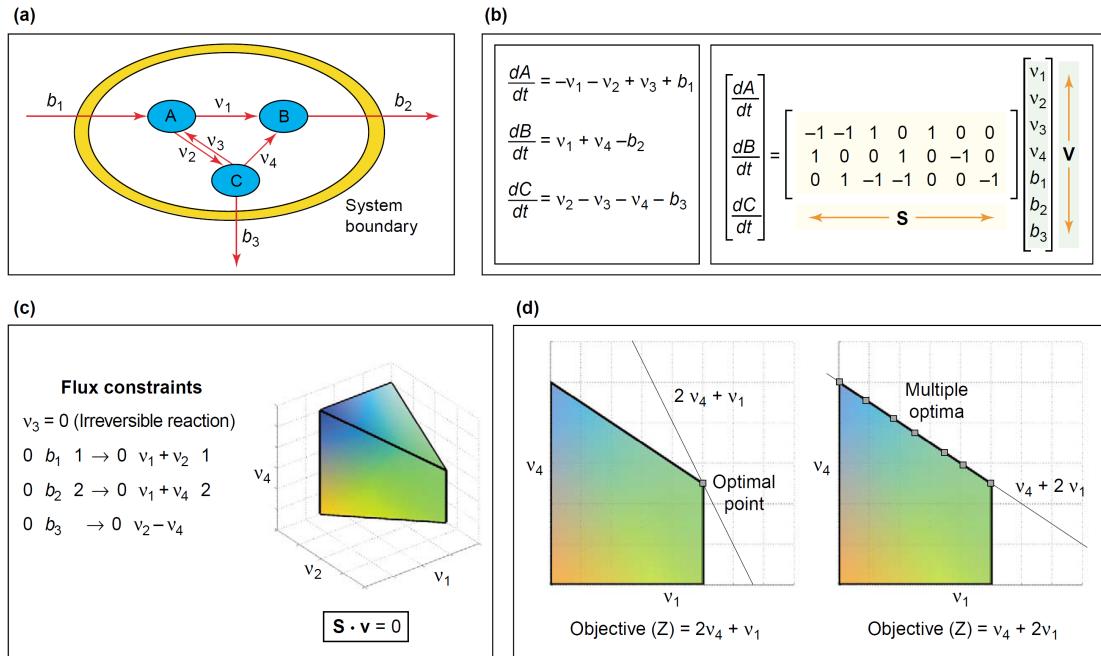


Abbildung 2.1: Methode der FBA (aus Kauffman et al. [24]) (a) Ein Modellsystem bestehend aus drei Metaboliten (A, B und C) mit drei Reaktionen (interne Flüsse, v_i , mit einer reversiblen Reaktion) und drei Austauschflüssen (b_i). (b) Zeitliche Änderung der Metabolitkonzentrationen in Abhängigkeit von den Flüssen durch Reaktionen und Transporter. Die Gleichungen können in Matrixform geschrieben werden. Im Fliessgleichgewicht vereinfacht sich dies zu $Sv = 0$. (c) Die Flüsse des Systems werden mittels Bedingungen beschränkt. Dies erzeugt einen Flusskegel [25, 26], der der metabolischen Kapazität des Systems entspricht. (d) Optimierung des Systems mit verschiedenen Zielfunktionen Z . Fall I liefert einen eindeutigen optimalen Lösung, dagegen liefert Fall II mehrere optimale Lösungen entlang einer Kante.

Modellsystems bestehend aus Metaboliten und Prozessen (Reaktionen und Transporter) basierend auf der Rekonstruktion (Abb. 2.1 a).

2.2.2 Stöchiometrische Matrix und Fliessgleichgewicht

Die zeitlichen Veränderungen der Metabolitkonzentrationen wird mittels der stöchiometrischen Matrix S und der Flüsse durch die Reaktionen und Transporter v beschrieben (Abb. 2.1 b). Dies führt auf ein System gekoppelter ODEs der Form:

$$\frac{dC}{dt} = Sv \quad (2.1)$$

C ist der Vektor der Metabolitkonzentrationen, v der Vektor der Reaktionsflüsse, t die Zeit. S ist die stöchiometrische Matrix, wobei die Zeilen den Metaboliten und die Spalten den Reaktionen des metabolischen Netzwerks entsprechen.

Die Annahme des Fliessgleichgewicht bildet die erste Menge grundlegender Bedingungen, die die Flusslösungen einschränkt. Sämtliche internen Metabolite sind im Fliessgleichgewicht bilanziert und dürfen sich weder anhäufen, noch verarmen. Die zeitlichen Änderungen der Konzentrationen verschwinden:

$$\frac{dC}{dt} = 0 \quad (2.2)$$

Als erlaubte Flussverteilungen ergibt sich die Menge der Flussvektoren v , die die Gleichung

$$Sv = 0 \quad (2.3)$$

erfüllt.

Bei exakter Betrachtung sind Zellen keine Systeme, die sich im Fliessgleichgewicht befinden. Die Annahme des Fliessgleichgewichts ist allerdings näherungsweise gültig, da die meisten intrazellulären Reaktionen typischerweise viel schneller ablaufen als sich der zellulären Phänotyp verändert [17].

2.2.3 Zusätzliche Bedingungen

Zusätzliche Bedingungen sind notwendig, um die Menge der Lösungen weiter einzuschränken. (Abb. 2.1 c). Diese können beispielsweise thermodynamischer oder experimenteller Natur sein. Bedingungen auf Basis experimentell bestimmter Flussdaten führen zu Gleichungen der Form

$$v_i^l \leq v_i \leq v_i^u \quad (2.4)$$

wobei v_i^l die experimentell bestimmte untere Grenze, v_i^u die experimentell bestimmte obere Grenze des Fluxes v_i ist.

Zwangsbedingungen auf Grund von Reaktionsirreversibilitäten führen auf Gleichungen der Form

$$0 \leq v_i < \infty \quad (2.5)$$

2.2.4 Zielfunktion

Die Bedingungen des Fliessgleichgewichts und die zusätzlichen Bedingungen bilden ein unterbestimmtes lineares Gleichungssystem, da im allgemeinen mehr Reaktionen als Metabolite in den Netzwerken existieren. Durch die Bedingungen wird ein Flusskegel möglicher Lösungsflüsse erzeugt, der der metabolischen Kapazität des Systems entspricht [25, 26]. Um eine eindeutige Lösung aus diesem Flusskegel zu selektieren, wird eine Optimierung bezüglich einer gegebenen Zielfunktion Z durchgeführt.

Das unterbestimmte System wird hierzu als Optimierungsproblem formuliert (Abb. 2.1 d). Im Falle linearer Zielfunktionen führt dies auf ein Problem der linearen Programmierung (LP). Die optimale Lösung kann für LP Probleme mit heutigen Standardverfahren in polynomialer Zeit

bestimmt werden. Für nichtlineare Zielfunktionen existieren entsprechende Verfahren, beispielsweise die quadratische Programmierung (QP) für quadratische Zielfunktionen. Für praktische Anwendungen existieren Algorithmen die LP und QP Probleme sehr schnell lösen, so dass die FBA ohne Probleme auch auf sehr große Netzwerke angewandt werden kann.

Die Ergebnisse der FBA sind sehr stark von der gewählten Zielfunktion abhängig und für die Untersuchung metabolischer Netzwerke wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Zielfunktionen verwendet. Zielfunktionen sind beispielsweise die Maximierung der Biomasse oder des Zellwachstums [18, 27], Maximierung von Reduktionskraft oder ATP [28], Maximierung der Syntheserate eines bestimmten Produktes [29] oder Flussminimierung [19]. Für mikrobielle Systeme konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung einer Wachstumsfunktion als Zielfunktion viele FBA Vorhersagen konsistent mit den experimentellen Daten sind [30, 31, 32]. Für einige Bedingungen stimmen die Vorhersagen allerdings nicht überein [30, 33, 31].

Flussminimierung als Zielfunktion Für diese Arbeit wurde die in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Methode der Flussminimierung zur Optimierung verwendet [19]. In der Flussminimierung werden die stationären metabolischen Flüsse für vorgegebene Zielflüsse und gegebene externe Metabolite, die mit dem System ausgetauscht werden können, minimiert.

Der Hepatozyt hat viele unterschiedliche Aufgaben, wie beispielsweise Homöostase des Blutglukosespiegels, Ammoniakentgiftung oder Ketonkörpersynthese. Zwischen diesen Aufgaben muss das System in Abhängigkeit von externen Ressourcen und Signalen umschalten.

Die verschiedenen Phänotypen beruhen letztendlich auf den metabolischen Flüssen durch die chemischen Reaktionen und Transportprozesse. Nahezu alle Reaktionen werden durch Enzyme in der Zelle katalysiert, die meisten der Transportprozesse durch Transportproteine ermöglicht. Die Aktivität dieser Proteine und damit der Fluss durch die zugehörigen metabolischen Prozesse kann durch Regulation auf unterschiedliche zelluläre Bedürfnisse angepasst werden, beispielsweise durch allosterische Effektoren, Proteinmodifikationen wie Phosphorylierungen oder Veränderung der Genexpression.

Da die Herstellung einer enzymatischen Kapazität für eine bestimmte zelluläre Funktionalität ein großer Aufwand für die Zelle ist wurde dieser Aufwand vermutlich evolutionär minimiert. D.h. die verschiedenen Aufgaben der Zelle werden jeweils mittels minimaler Flüsse realisiert.

Der zu minimierende Gesamtfluss wird als gewichtete Linearkombination aller Einzelflüsse gemessen, wobei die thermodynamischen Gleichgewichtskonstanten der Reaktionen K_{eq} als Gewichtungsfaktoren verwendet werden. Also je weiter das Gleichgewicht in Richtung der Produkte verschoben ist, desto größer wird der Gewichtungsfaktor für die Rückwärtsreaktion. Flüsse entgegen der durch die Gleichgewichtskonstante vorgegebene Richtung werden bestraft, da die Erhaltung der notwendigen Konzentrationsgradienten, um einen solchen Fluss zu ermöglichen einen zusätzlichen zellulären Aufwand bedeutet.

Die Flussraten, die durch die Flussminimierungsmethode vorhergesagt werden, zeigen gute

Korrelationen mit den Flussraten, die durch kinetische Modellierung oder durch direkte experimentelle Messungen erhalten werden [19].

Größere Abweichungen treten allerdings für Bereiche des Netzwerks auf, die redundante Wege darstellen, da hier die FBA immer die bezüglich der Flussminimierung günstigste Route wählt [19]. Diese Lösung muss so nicht in der Zelle realisiert sein. Stattdessen können in der Zelle Kombinationen unterschiedlicher Routen existieren oder durch Regulationen Reaktionspfade gewählt werden, die bezüglich der Flussminimierung nicht optimal sind.

Für eine detaillierte Herleitung und Beschreibung der Methodik siehe Holzhütter [19].

Thermodynamische Zusatzbedingungen Thermodynamische Eigenschaften als zusätzliche Bedingungen für die FBA wurden in den letzten Jahren in mehreren Arbeiten verwendet [4, 34, 35] und auch in unserer Arbeitsgruppe wurde eine Methode zur thermodynamischen Realisierbarkeit entwickelt [22]. Für die in dieser Arbeit durchgeföhrten FBA Simulationen mittels Flussminimierung wurden die thermodynamischen Daten von Feist et al. [4] verwendet. Die freien Gibbschen Reaktionsenthalpien $\Delta G_r^{\circ'}$ wurden mittels Gruppenübertragungs-Theorie [36] basierend auf der Methode von Mavrovouniotis [37, 38] berechnet. Die Umrechnung in die Gleichgewichtskonstanten erfolgte nach

$$\Delta G_r^{\circ'} = -RT \ln(K_{eq}) \quad (2.6)$$

mit $T = 310.15\text{ K}$ und $R = 8.314 \frac{\text{J}}{\text{mol}\text{K}}$.

2.2.5 Software

FBA ist nicht besonders rechenintensiv und kann auf Standard Desktop PCs durchgeführt werden. Für die Simulationen wurde die in dieser Arbeitsgruppe entwickelte FBA Simulationssoftware Fasimu verwendet, die auf dem linearen Solver ILOG CPLEX [39] aufbaut.

2.2.6 Simulationen

Sämtliche Simulationen wurden mit dem Modell des Kernhepatozyten basierend auf der abgeschlossenen Netzwerkrekonstruktion durchgeführt.

Einige wenige Metabolite mussten in den Simulationen die Fliessgleichgewichtsbedingungen nicht erfüllen. Dies war Wasser in allen Kompartimenten, sowie Phosphat im Zytosol. Wasser und Phosphat liegen in hohen Konzentration vor, Phosphat steht weiterhin über Puffersysteme im Zytosol für Reaktionen zur Verfügung.

In allen FBA Simulationen wurden neben den Bedingungen zum Fliessgleichgewicht zusätzliche Irreversibilitätsbedingungen eingeföhrt (s. Gleichung 2.5), hauptsächlich drei Kategorien zuzuordnen sind: Decarboxylierungen, Pyrophosphatreaktionen und Reaktionen mit energieabhängiger Umkehrreaktion.

Decarboxylierungen Decarboxylierungen sind in vielen Fällen irreversibel. Die Umkehrreaktion der Decarboxylierung, die Carboxylierung, benötigt meist spezielle Kofaktoren wie Biotin oder Vitamin K, um CO_2 in organische Moleküle einzubauen, wie beispielsweise die Pyruvat Carboxylase (PC), eine wichtige biotinabhängige Reaktion der Gluconeogenese und anaplerotische Reaktion des Citratzyklus [40].

Zwei Beispiele dieser irreversiblen Decarboxylierungen sind der Pyruvat Dehydrogenase Komplex (PDHc) und der α -Ketoglutarat Dehydrogenase Komplex (KGDHc) [41].

Die Irreversibilität der Gesamtreaktion des PDHc konnte durch Isotopenmarkierungsexperimente gezeigt werden: Der Komplex ist nicht in der Lage radioaktiv markiertes CO_2 an Acetyl-CoA zu binden [42]. Der KGDHc katalysiert die irreversible Decarboxylierung von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA. Ähnlich zur PDHc ist auch die KGDHc eine Multienzymkomplex bestehend aus mehreren Kopien von drei Proteinuntereinheiten und es wurde gezeigt, dass die Reaktion nur in Richtung der Decarboxylierung abläuft [41].

Für sämtliche Reaktionen in denen CO_2 oder HCO_3^- als Metabolit beteiligt ist, wurde bezüglich der Irreversibilität recherchiert und die gefundenen zusätzlichen Irreversibilitätsbedingungen für die Simulationen verwendet.

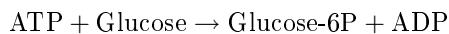
Pyrophosphat abhängige Reaktionen Pyrophosphat (PP_i) entsteht als Nebenprodukt in einigen enzymatischen Reaktionen. Dies sind beispielsweise Reaktionen der DNA und RNA Synthese, die Aktivierung von Fettsäuren, Aminosäuren und Zuckern oder die Synthese der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP.

PP_i kann nicht effizient über Membranen transportiert werden und die schnelle intrazelluläre Hydrolyse in anorganisches Phosphat durch Pyrophosphatasen (PPase) ist wichtig für den thermodynamischen Zug dieser Reaktionen [43]. Durch die geringe PP_i Konzentration wird das Gleichgewicht stark auf die Seite der PP_i Bildung verschoben.

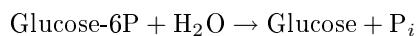
Alle PP_i abhängigen Reaktionen wurden in den Simulationen daher als irreversibel in Richtung der PP_i Produktion betrachtet (mit Ausnahme der PPase).

Reaktionen mit energieabhängiger Umkehrreaktion Die dritte Klasse irreversibler Reaktionen sind energieabhängige Reaktionen, für die eine energieunabhängige Umkehrreaktion zwischen Hauptsubstraten und -produkten existiert. In den Simulationen wurden die energieabhängige Reaktion samt Umkehrreaktion als irreversibel behandelt.

Ein solches Paar ist beispielsweise die Glucokinase (GK), die die ATP abhängige Phosphorylierung der Glucose katalysiert



und die energieunabhängige Umkehrreaktion der Glucose-6 Phosphatase (G6P)



Allein basierend auf der Thermodynamik der Reaktionen ist ein geringer Fluss in Umkehrrichtung möglich. In dieser Arbeit wird davon ausgegangen, dass diese Umkehrflüsse keinen wesentlichen Beitrag zu dem von der Zelle benötigten Fluss von Produkten zu Substraten leisten. Die so definierten Irreversibilitäten sind nur Näherungen und in der Zelle kann die Umkehrreaktion in sehr geringem Maße stattfinden. Falls die Reaktionsrichtungen nicht eingeschränkt werden, werden in den FBA Simulationen durch solche Reaktionspaare sehr kurze energieproduzierende Zyklen möglich. Die Kombination der Glucokinase und der Glucose-6 Phosphatase in jeweiliger Umkehrrichtung ermöglicht es in einem Zweierzyklus ATP zu erzeugen ($\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$). Diese kurzen Zyklen werden in der Flussminimierung bevorzugt ausgewählt, da Bereitstellung von ATP durch andere Stoffwechselwege im Vergleich dazu bezüglich des Flussminimierungskriteriums deutlich aufwendiger ist.

Da die energieunabhängigen Umkehrreaktionen zumeist eine hohen negative Standardreaktionsenthalpie haben (beispielsweise Hydrolyse von Glucose-6P durch G6P $\Delta G_r' = 13.8 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ [42]) sind diese Umkehrreaktionen in der Flussminimierung recht teuer. Die Bildung von ATP benötigt allerdings normalerweise viele Reaktionen (Glykolyse bzw. Citratzyklus mit oxidative Phosphorylierung), so dass diese kurzen ATP Zyklen dennoch in der Optimierung bevorzugt werden, auch wenn sie keinerlei Bedeutung für die Energieversorgung der Zelle besitzen.

Daher wurden solche Reaktionspaare in den Simulationen als irreversibel betrachtet. Weitere Beispiele neben GK und G6Pase sind Phosphofructokinase 1 und 2 (PFK1, PFK2) mit den zugehörigen Umkehrreaktionen Fructose-6 Phosphatase 1 und 2 (FBP1, FBP2).

Weitere irreversible Reaktionen Weiterhin führten Reaktionen, für die eindeutige experimentelle Daten zur Irreversibilität vorlagen, zu weiteren Irreversibilitätsbedingungen in den Simulationen.

2.2.7 Einzelsimulation

Eine einzelne FBA Simulation wird durch die in der Simulation austauschbaren Metabolite, die Zielflüsse der Simulation, sowie eventuell zusätzliche für die Simulation geltende Nebenbedingungen definiert.

Zielflüsse Zielflüsse sind Flüsse, die Bestandteil der Flusslösung sein müssen. In nahezu allen Simulationen wird nur ein einzelner Zielfluss vorgegeben. Der Zielfluss in der Simulation zur Glykogenproduktion ist beispielsweise die Glykogensynthase. Sämtliche Flusswerte in den Simulationen sind relative Flusswerte bezogen auf den angegebenen Zielfluss, der auf den Wert 1 normiert wurde.

Austauschbare Metabolite Für jede Simulation müssen die vom Hepatozytenmodell mit der Umgebung (Blut) austauschbaren Metabolite festgelegt werden. In der Simulation zum Abbau von Glucose zu Laktat wird beispielsweise nur der Import von Glucose und der Export von Laktat erlaubt.

In einem sog. minimalen Austauschset wird für das Hepatozytenmodell die Austauschkapazität mit dem Blut definiert. Dieses wird für einige Simulationen benötigt, wie beispielsweise in der Simulation zur Synthese von Proalbumin. Darin enthalten sind die Metabolite, die aus der Blutbahn aufgenommen werden können (Glucose, die essentiellen Aminosäuren Phenylalanin, Valin, Threonin, Tryptophan, Isoleucin, Methionin, Leucin und Lysin, sowie Folat und Sauerstoff) und die Metabolite, die vom Hepatozyten an das Blut abgegeben werden können (Urea, Urat, Glucose und die Ketonkörper Acetoacetat, Aceton und β -Hydroxybutyrat, sowie CO_2). Auch die Produktion von Glykogen ist in dem minimalen Austauschset erlaubt, dieses wird allerdings nicht an das Blut abgegeben, sondern im Hepatozyten gespeichert.

Zusätzliche Simulationsbedingungen Für die einzelnen Simulation gelten zum Teil Zusatzbedingungen, wie Einschränkung von Reaktionsrichtungen oder Verbot von Flüssen durch bestimmte Reaktionen.

Die Fettsäuresynthese und die β -Oxidation werden gegenläufig reguliert (v.a. über Malonyl-CoA). Daher wurde bei den Simulationen zur Fettsäuresynthese der Fluss durch die β -Oxidation verboten und umgekehrt bei den Simulationen zur β -Oxidation die Fettsäuresynthase.

Ein weiteres Beispiel ist die Ketonkörpersynthese, die nur stattfindet, wenn die Acetyl-CoA Konzentration hoch ist, aber im Mitochondrium kein Oxalacetat für die Citrat Synthase (CS) Reaktion zur Verfügung steht. Die CS Reaktion wurde daher für die Ketonkörpersimulationen ausgeschlossen. Interessant ist, dass die Simulationen zur Ketonkörpersynthese erst die erwarteten Ergebnisse lieferten (HMG-CoA Synthase zu Acetoacetat und dann gegebenenfalls Umwandlung zu β -Hydroxybutyrat oder Aceton und Export der Ketonkörper), wenn neben Acetyl-CoA als verfügbarer Metabolit auch die CS ausgeschaltet wurde. Ansonsten wurde in den Flusslösungen die Citrat Synthase verwendet, um das Acetyl-CoA im Citratzyklus zu oxidieren.

Flusseinheiten In allen durchgeföhrten FBA Simulation mittels Flussminimierung wird jeweils ein Zielfluss von $1 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$ durch eine bestimmte Reaktion vorgegeben. Alle in den Simulationen angegebenen Flüsse sind Relativflüsse zu diesem Zielfluss und daher einheitenlos.

2.3 Ergebnisse

Die FBA Simulationen waren ein wesentliches Hilfsmittel, die Rekonstruktion des Hepatozytennetzwerks in einem iterativen Prozess zu verbessern. Dabei lieferten die Simulationsergebnisse basierend auf einem Rekonstruktionsstand eine Fülle zusätzlicher Informationen, die wieder in die Rekonstruktion einflossen (Kap. 1).

Die Simulationen wurden weiterhin dazu verwendet, die abgeschlossene Rekonstruktion zu validieren und die funktionelle Kapazität des aufgestellten Modells des Hepatozytenstoffwechsels aufzuzeigen.

Die Ergebnisse der Simulationen gehen weit über eine reine Validierung hinaus, da die Flusslösungen nicht nur aufzeigen, dass das Hepatozytenmodell eine Aufgabe erfüllen kann, sondern auch die konkrete Flussverteilung für die untersuchte Aufgabe liefern. Das Modell besitzt prediktiven Charakter, da ausgehend von den getesteten Basisfunktionalitäten komplexere Aufgaben getestet werden können.

Während der Rekonstruktion und für die abschließende funktionelle Validierung wurden über 100 verschiedene Simulationen durchgeführt, die das komplette Spektrum der erwarteten Funktionalität des Kernhepatozyten umfassten (Kap. 1.1.3):

- Glykolyse ausgehend von unterschiedlichen Substraten (Glucose, Fructose, Glycerol, Glykogen)
- Gluconeogenese ausgehend von unterschiedlichen Substraten (Laktat, Alanin, Pyruvat, Oxalacetat, Glycerol)
- Glykogenspeicherung ausgehend von unterschiedlichen Substraten (Laktat, Glucose, Alanin, Glycerol, Oxalacetat)
- Glykogenabbau
- Pentosephosphatweg (Synthese von Ribose-5P und NADPH)
- Bereitstellung zytosolischer und mitochondrialer Energie in Form von ATP und Reduktionspotential (NADH und NADPH) ausgehend von unterschiedlichen Substraten
- Energieversorgung unter aeroben und anaeroben Bedingungen
- Synthese der nicht-essentiellen Aminosäuren aus minimalem Austauschset
- Katabolismus sämtlicher Aminosäuren mittels minimalem Austauschset
- Purin- und Pyrimidinsynthese (ATP, GTP, UTP, CTP) aus minimalem Austauschset
- Purin- und Pyrimidinabbau mittels minimalem Austauschset
- Fettsäuresynthese (C16 Palmitat) aus Acetyl-CoA
- β -Oxidation (C16 Palmitat)
- Ethanolabbau mit minimalem Austauschset
- Ammoniakentgiftung (Harnstoffzyklus, Glutaminsynthese) unter aeroben und anaeroben Bedingungen und verschiedenen Austauschsets
- Ketonkörpersynthese (Acetoacetat, β -Hydroxybutyrat, Aceton) ausgehend von Acetyl-CoA

- Synthese eines Beispielproteins (Proalbumin) aus verschiedenen Austauschsets

Eine detaillierte Auflistung sämtlicher Simulationen ist in Tab. A.1 angegeben.

Bei der Auswertung der Simulationen wurde zunächst getestet, ob die vorgegebene Aufgabe erfüllt werden konnte: Existieren also Flusslösungen, die die gestellten Zielflüsse mit den in der Simulation mit dem Blut austauschbaren Metaboliten erfüllen können. Im Fall von Negativsimulationen wurde das Gegenteil geprüft: Existieren gerade keine solche Flusslösungen. Negativsimulationen sind beispielsweise die Synthese der essentiellen Aminosäuren, die im Hepatozytenmodell nicht möglich sein sollten.

Falls eine Flusslösung existierte, erfolgte eine detaillierte Auswertung, wie die jeweilige Funktionalität mittels der optimalen Flusslösung realisiert wurde. Hierzu wurden sämtlicher Simulationen visualisiert und die anschließende Analyse umfasste:

- verwendete Reaktionen und Transporter
- Verteilung der Flüsse auf mögliche alternative Stoffwechselwege, Verhalten an Verzweigungspunkten im Netzwerk
- zwischen Kompartimenten und mit der Umgebung ausgetauschten Metabolite (Import, Export), Pfade, die importierte Metabolite mit exportierten Metaboliten verbinden
- Energiebilanz (ATP, NADH, NADPH)
- Plausibilität der Lösung (Übereinstimmung mit Literatur und beschriebenen Reaktionsfolgen für untersuchte Funktionalität)
- mögliche Artefakte der Flussminimierung

Während der Netzwerkkrekonstruktion führten die daraus gewonnenen Informationen zu Änderungen an dem Netzwerk, zu zusätzlichen ergänzenden Simulationen oder zur Einführung neuer Zusatzbedingungen für die FBA (insbesondere Irreversibilitäten).

In der abgeschlossenen Rekonstruktion werden sämtliche Simulationen auf dem Kernhepatozytenmodell erfolgreich durchgeführt. Die durch die Simulationen definierte Funktionalität kann vollständig erfüllt werden. Die auftreten Flusslösungen sind biochemisch plausibel und nahezu alle Reaktionsfolgen, die in den Lösungen verwendet wurden, um eine gegebene Funktionalität zu erfüllen, sind so in der Literatur beschrieben.

Im Folgenden werden einige dieser Simulationen auf dem rekonstruierten Kernhepatozytenmodell vorgestellt. Für die Diskussion wurden Simulationen ausgewählt, die inhaltlich stark mit dem kinetischen Modell von Glykolyse, Gluconeogenese und Glykogenstoffwechsel überlappen. Dies sind aerobe und anaerobe Verwendung der Glucose, die Untersuchung des Pentosephosphatwegs und die Analyse der Gluconeogenese ausgehend von unterschiedlichen Substraten.

In diesen Simulationen wird nur ein relativ kleiner Teil des rekonstruierten Modells für die Flusslösungen genutzt. In anderen Simulationen, wie der Synthese von Proalbumin, ist das Netzwerk

in weit größerem Umfang ausgelastet, da hier unter anderem zunächst die nicht-essentiellen Aminosäuren aus dem minimalen Austauschset synthetisiert werden müssen, bevor diese in der Proteinsynthese verwendet werden können.

2.3.1 Sauerstoffabhängige Glucoseverwertung

Abkürzungen **GK** Glucokinase, **PFK** Phosphofructokinase, **PGK** Phosphoglyceratkinase, **PK** Pyruvatkinase, **OXP** oxidative Phosphorylierung, **LDH** Laktat Dehydrogenase, **PDH** Pyruvat Dehydrogenase, **GAPDH** Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase, **MDH** Malat Dehydrogenase, **ANT** Adeninenucleotide Carrier

In der Glykolyse wird die aufgenommene Glucose zu Pyruvat oxidiert. Unter anaeroben Bedingungen ist der oxidative Abbau der Glucose damit abgeschlossen. Das entstehende Pyruvat kann weiter zu Laktat reduziert oder für andere pyruvatabhängige Reaktionen verwendet werden.

Unter aeroben Bedingungen kann die Glucose dagegen vollständig zu CO_2 und H_2O oxidiert werden. Pyruvat wird durch PDH zu Acetyl-CoA. Die Acetyl-Gruppe des Acetyl-CoA wird im Citratzyklus vollständig zu CO_2 oxidiert, die dabei entstehenden Energie wird in Form der reduzierten elektronenübertragenden Kofaktoren NADH und FADH_2 gespeichert. In der Atmungskette werden diese unter der Abgabe von Protonen und Elektronen wieder in die oxidierte Form überführt.

Durch den Elektronentransfer in der Atmungskette kann ein Großteil der Energie mittels oxidativer Phosphorylierung in Form von ATP gespeichert werden, wobei O_2 als terminaler Elektronenakzeptor in der Atmungskette benötigt wird.

Im Hepatozytenmodell wurde die oxidative Phosphorylierung mit festem P/O Quotienten implementiert. Dabei können durch den Protonen- und Elektronentransport können ausgehend vom NADH 2.3 ATP, ausgehend von FADH_2 (Succinat Dehydrogenase) 1.4 ATP erzeugt werden

¹.

Mit diesen Stöchiometrien liefert die vollständige Oxidation eines Glucosemoleküls theoretisch maximal 29.8 ATP pro Glucose [42], da in der Glykolyse eines Glucosemoleküls zu Pyruvat 2 ATP und 2 NADH entstehen und weitere 2 ATP (bzw. GTP), 8 NADH und 2 FADH₂ bei der vollständigen Oxidation der 2 Pyruvatmoleküle im Citratzyklus gebildet werden.

Pasteureffekt Der Pasteureffekt ist zu beobachten, wenn eine fakultativ anaerobe Zelle mit Sauerstoff versorgt wird. Als Folge wird der Durchsatz durch die Glykolyse deutlich gedrosselt. Die Zelle kann mit Hilfe des Sauerstoffs weit mehr Energie aus der Glucose gewinnen, als ohne Sauerstoff. Durch die vollständige Oxidation von Glucose wird deutlich mehr ATP pro Glucose produziert, deutlich weniger Glucose ist daher für die Energieversorgung unter aeroben Bedingungen notwendig. Neben dem geringeren Fluss durch die Glykolyse wird zusätzlich die Produktion von Laktat gestoppt.

Simulationen In den FBA Simulationen wurde der Glucoseabbau zur Energieversorgung in Abhängigkeit vom vorhandenen Sauerstoff untersucht. Als Zielfluss wurde in allen Simulationen die Bereitstellung zytosolischen ATPs definiert. Glucose konnte aus dem Blut importiert werden, Laktat und CO₂ konnten an das Blut abgegeben werden.

Zunächst wurden eine anaerobe Simulation (keine Sauerstoffaufnahme aus dem Blut möglich, $v_{O_2} = 0$) und eine Simulation unter aeroben Bedingungen (Sauerstoff konnte unbegrenzt aufgenommen werden) durchgeführt. Der Sauerstofffluss ² der aeroben Flusslösung betrug dabei $v_{O_2} = 0.201$.

In zusätzlichen Simulationen wurde der Sauerstofffluss v_{O_2} anschließend schrittweise zwischen der anaeroben und vollständig aeroben Flusslösung variiert.

¹ Der P/O Quotient bzw. P/2e⁻ Quotient x gibt an, wie viel ATP pro Sauerstoffatom bei der Einspeisung der Elektronen in die Atmungskette erzeugt werden kann:



Die Messung von Protonenflüssen ist auf Grund der Pufferkapazität für Protonen im Mitochondrium, nichtproduktiver Leckströme über die innere Membran und die Verwendung des Protonengradienten für alternative Funktionen, wie beispielsweise den sekundär aktiven Transport von Substraten, schwierig [42].

Der zumeist verwendete Wert für die Anzahl an gepumpten Protonen pro Elektronenpaar ist 10 für NADH und 6 für Succinat. Der am weitesten akzeptierte Wert für die Anzahl an Protonen, die für die Synthese eines ATP Moleküls benötigt werden ist 4, wovon ein Proton für den Transport von P_i, ATP und ADP über die innere Mitochondrienmembran verwendet wird [42]. Wenn 10 Protonen pro NADH gepumpt werden und 4 Protonen in die Matrix fließen müssen, um ein ATP zu erzeugen, dann ergibt sich ein protonenbasierte P/O Quotient von 2.5 für NADH und 1.5 (6/4) für Succinat [42].

In den Simulationen wurden die P/O Werte etwas niedriger mit 2.3 für NADH und 1.4 für FADH₂ angesetzt, da unter zellulären Bedingungen sicher nicht die optimale Kopplung von Reduktionsenergie an die ATP Synthese möglich ist. Weiterhin existieren Leckströme und Transportprozesse, die in dem Modell nicht berücksichtigt sind.

² Alle angegebenen Flüsse sind Relativflüsse zum jeweiligen Zielfluss der Simulation von 1 μmol/min/kg und daher einheitenlos. Fluss ist bezogen auf Gesamtleber und kg Körpergewicht.

Eine Übersicht der durchgeföhrten Simulationen, der ATP Bilanz und wichtiger Flüsse ist in Tabelle 2.1 angegeben.

	Anaerob [0]	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.12	0.14	0.16	0.18	0.2	Aerob [0.201]
ATP Zielfluss	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ATP / Glucose	2	2.2	2.45	2.77	3.18	3.73	4.5	5.69	7.73	12.05	27.27	29.8
<i>ATP Erzeugung Mitochondrium</i>												
Oxidative Phosphorylierung [OXP]	0	0.086	0.172	0.258	0.344	0.430	0.516	0.602	0.688	0.774	0.860	0.866
Succinat CoA Ligase (ATP)	0	0.007	0.013	0.020	0.027	0.033	0.040	0.047	0.053	0.060	0.067	0.067
<i>ATP Transport [Mitochondrium → Zytosol]</i>												
Adeninenucleotide Carrier [ANT]	0	0.093	0.185	0.278	0.371	0.463	0.556	0.649	0.741	0.834	0.927	0.933
<i>ATP Erzeugung Zytosol</i>												
Phosphoglycerokinase [PGK]	1	0.907	0.815	0.722	0.629	0.537	0.444	0.351	0.259	0.166	0.073	0.067
Pyruvatkinase [PK]	1	0.907	0.815	0.722	0.629	0.537	0.444	0.351	0.259	0.166	0.073	0.067
<i>ATP Verbrauch Zytosol</i>												
Glucokinase [GK]	0.5	0.454	0.407	0.361	0.315	0.268	0.222	0.176	0.129	0.083	0.037	0.034
Phosphofructokinase [PFK]	0.5	0.454	0.407	0.361	0.315	0.268	0.222	0.176	0.129	0.083	0.037	0.034
<i>Wichtige Flüsse</i>												
Malat Dehydrogenase [MDH] Mitochondrium	0	0.013	0.027	0.040	0.053	0.067	0.080	0.093	0.107	0.120	0.133	0.134
Malat Dehydrogenase [MDH] Zytosol	0	0.007	0.013	0.020	0.027	0.033	0.040	0.047	0.053	0.060	0.067	0.067
Glucoseimport [GLUT2]	0.5	0.454	0.407	0.361	0.315	0.268	0.222	0.176	0.129	0.083	0.037	0.034
O ₂ Verbrauch	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.12	0.14	0.16	0.18	0.20	0.201
Laktat Export	1	0.901	0.801	0.702	0.603	0.503	0.404	0.305	0.205	0.106	0.007	0.000
Pyruvat Dehydrogenase [PDH]	0	0.007	0.013	0.020	0.027	0.033	0.040	0.047	0.053	0.060	0.067	0.067

Tabelle 2.1: Glucose zur Energieversorgung unter unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen: Synthese zytosolischen ATPs ausgehend von Glucose als Substrate unter verschiedenen Sauerstoffflüssen von anaerob (kein Sauerstoffimport möglich, $v_{O_2} = 0$ bis vollständig aerob (Sauerstoffimport unbegrenzt möglich, $v_{O_2} = 0.201$). Sämtliche Flüsse sind Relativflüsse bezüglich des ATP Zielflusses.

anaerober Glucoseabbau Die optimale Flusslösung zum anaeroben Glucoseabbau ist in Abb. 2.2 dargestellt. In der Lösung werden nur die Reaktionen der Glykolyse, sowie LDH verwendet. Mitochondriale Reaktionen oder Transporter sind nicht Teil der Flusslösung. Das als Zielfluss vorgegebene ATP wird vollständig durch die beiden ATP erzeugenden Reaktionen der Glykolyse bereitgestellt, jeweils zu gleichen Teilen von PGK und PK.

Das Pyruvat wird vollständig mittels LDH in Laktat umgewandelt und anschließend ins Blut exportiert. Die für die LDH benötigte Reduktionsenergie in Form von NADH wird in der GAPDH Reaktion bereitgestellt. Die LDH reoxidiert das reduzierte NAD^+ , so dass die Glykolyse weiter ablaufen kann.

Da ein Glucosemolekül beim anaerobem Abbau exakt 2 ATP erzeugt, müssen 0.5 Glucosemoleküle aufgenommen werden, um den ATP Zielfluss zu erfüllen.

aerober Glucoseabbau Die optimale Flusslösung zum aeroben Glucoseabbau ist in Abb. 2.4 dargestellt. Die Reaktionen der Glykolyse werden verwendet, um die aufgenommene Glucose vollständig in Pyruvat umzusetzen. Das Pyruvat wird dann allerdings nicht zu Laktat wie im anaeroben Fall, sondern ins Mitochondrium transportiert und dort durch PDH zu Acetyl-CoA. Die Acetyl-Gruppe des Acetyl-CoA wird anschließend im Citratzyklus vollständig zu CO_2 und H_2O oxidiert. Der aufgenommene Sauerstoff wird komplett für die oxidative Phosphorylierung in der Flusslösung verwendet.

Beim aeroben Abbau der Glucose wird deutlich weniger Glucose (0.034) als im aeroben Fall (0.5) benötigt, um das ATP für den Zielfluss zu erzeugen. Mehr als 10 mal soviel Glucose muss bei fehlendem Sauerstoff aufgenommen werden.

Aus einem Glucosemolekül können im aeroben Fall deutlich mehr ATP erzeugt werden, bei den in den Simulationen verwendeten P/O Quotienten maximal 29.8 ATP pro Glucosemolekül. Diese maximale ATP Produktion pro Glucose wird im aeroben Fall realisiert.

Laktat wird im aeroben Fall nicht produziert. Unter anaeroben Bedingungen wird das Pyruvat zu Laktat reduziert, um NADH zu oxidieren, damit die Glykolyse weiter ablaufen kann. Die NAD^+ Menge der Zelle ist begrenzt, NADH muss reoxidiert werden, damit die GAPDH Reaktion weiter ablaufen kann. Im aeroben Fall ist dies nicht notwendig, da die Oxidation des NADH im Mitochondrium über die Atmungskette erfolgt. Daher wird auch kein Laktat produziert.

Da keine Transporter für NADH in die mitochondriale Matrix existieren, muss das Reduktionspotential auf anderem Wege in das Mitochondrium gelangen. Dazu wird das Reduktionspotential von NADH auf Oxalacetat übertragen (MDH) und über den Malatshuttle ins Mitochondrium transportiert. Hier katalysiert die mitochondriale MDH die Umkehrreaktion und überträgt die Elektronen auf mitochondriales NAD^+ , welches in der Atmungskette zur Erzeugung von ATP verwendet werden kann. Das entstehende ATP wird über ANT ins Zytosol transportiert.

Die deutlich höhere ATP Ausbeute pro Substrat beruht zum Großteil auf der vollständigen Oxidation des Pyruvats, wobei ein Teil der Energie in Form von ATP mittels oxidativer Phos-

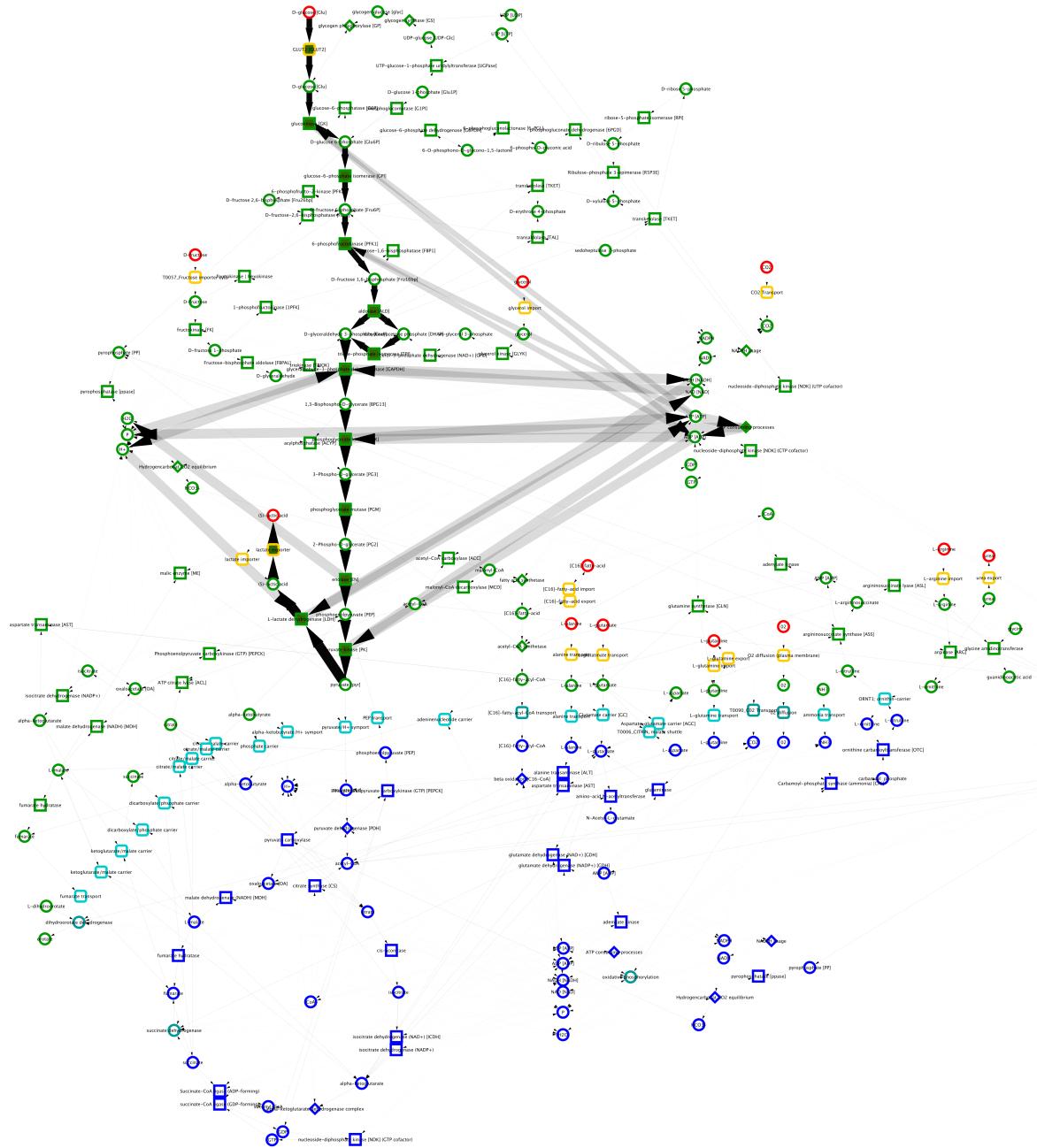


Abbildung 2.2: Anaerobe Erzeugung von ATP aus Glucose ($v_{O_2} = 0$): Die Glucose wird über die Glykolyse vollständig in Pyruvat umgewandelt. Pyruvat wird durch LDH vollständig in Laktat reduziert und anschließend exportiert. Nur die Reaktionen der Glykolyse und die LDH werden in der Flusslösung verwendet. Mitochondriale Reaktionen sind nicht Bestandteil der Flusslösung. Deutlich mehr Glucose als im aeroben Fall wird aufgenommen. Metabolit (Kreis), Reaktion (Rechteck), Transport (abgerundetes Rechteck); Blut (Rand rot), Plasmamembran (Rand orange), Zytosol (Rand grün), Mitochondrium (Rand blau), Mitochondrienmembran (Rand hellblau). Fluss tragende Reaktionen grün. Kanten zu Kofaktoren leicht transparent, Kanten ohne Fluss nur schwach eingezeichnet.

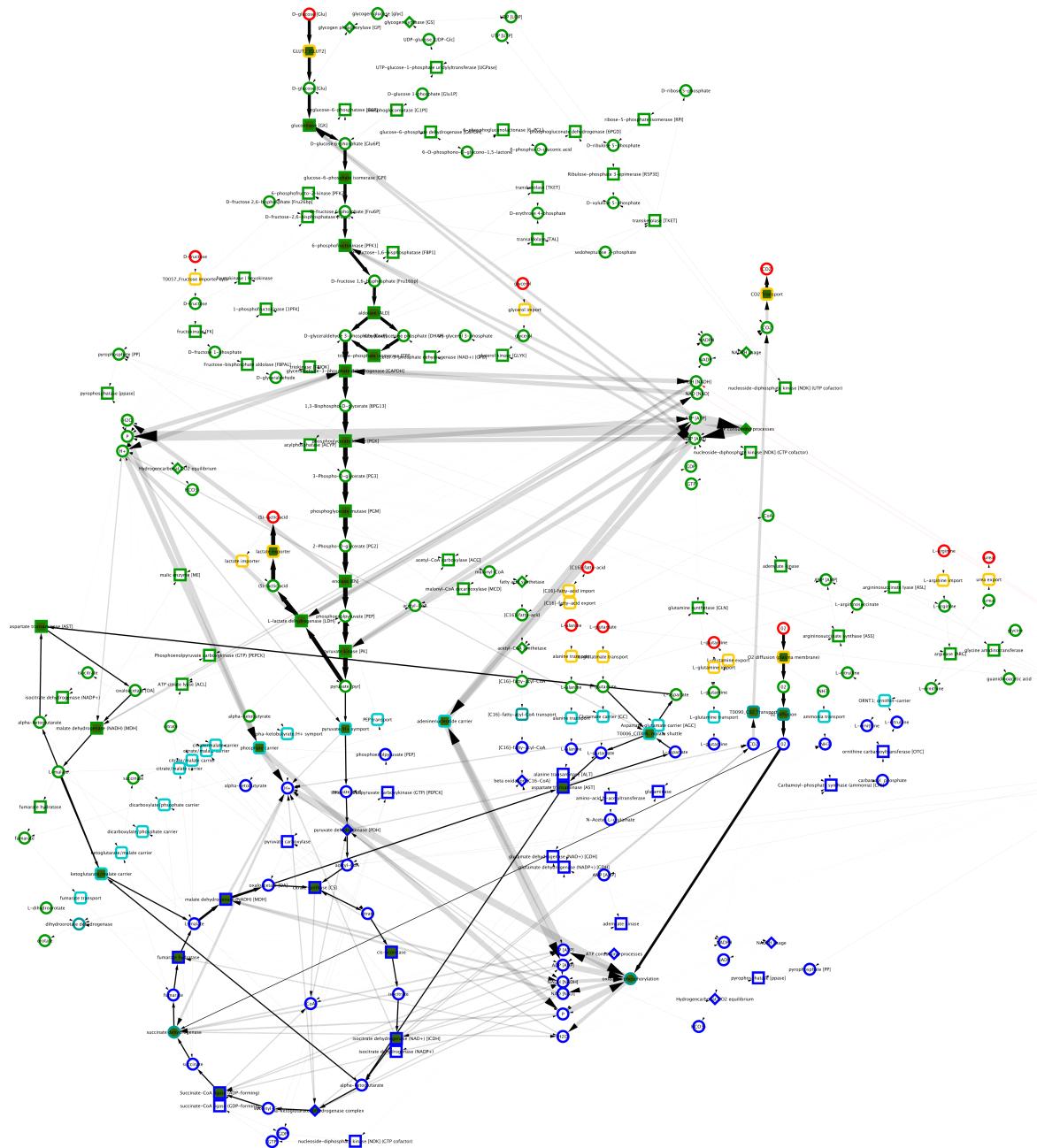


Abbildung 2.3: Erzeugung von ATP aus Glucose bei beschränktem Sauerstofffluss ($v_{O_2} = 0.14$): Der verfügbare Sauerstoff wird vollständig für die oxidative Phosphorylierung verwendet. Die Lösung ist eine Kombination aus anaerober und aerober Flusslösung. Der Großteil des in der Glykolyse gebildeten Pyruvats wird durch LDH zu Laktat reduziert und ins Blut abgegeben. Das restliche Pyruvat wird zu Acetyl-CoA und dient mittels Citratzyklus und oxidativer Phosphorylierung zur ATP Synthese. ATP wird mittels ANT ins Zytosol transportiert. Das in der GAPDH entstehende NADH wird z.T. für die LDH verwendet, der Rest mittels Malatshuttle ins Mitochondrium transportiert. Farbkodierung entsprechend Abb. 2.2.

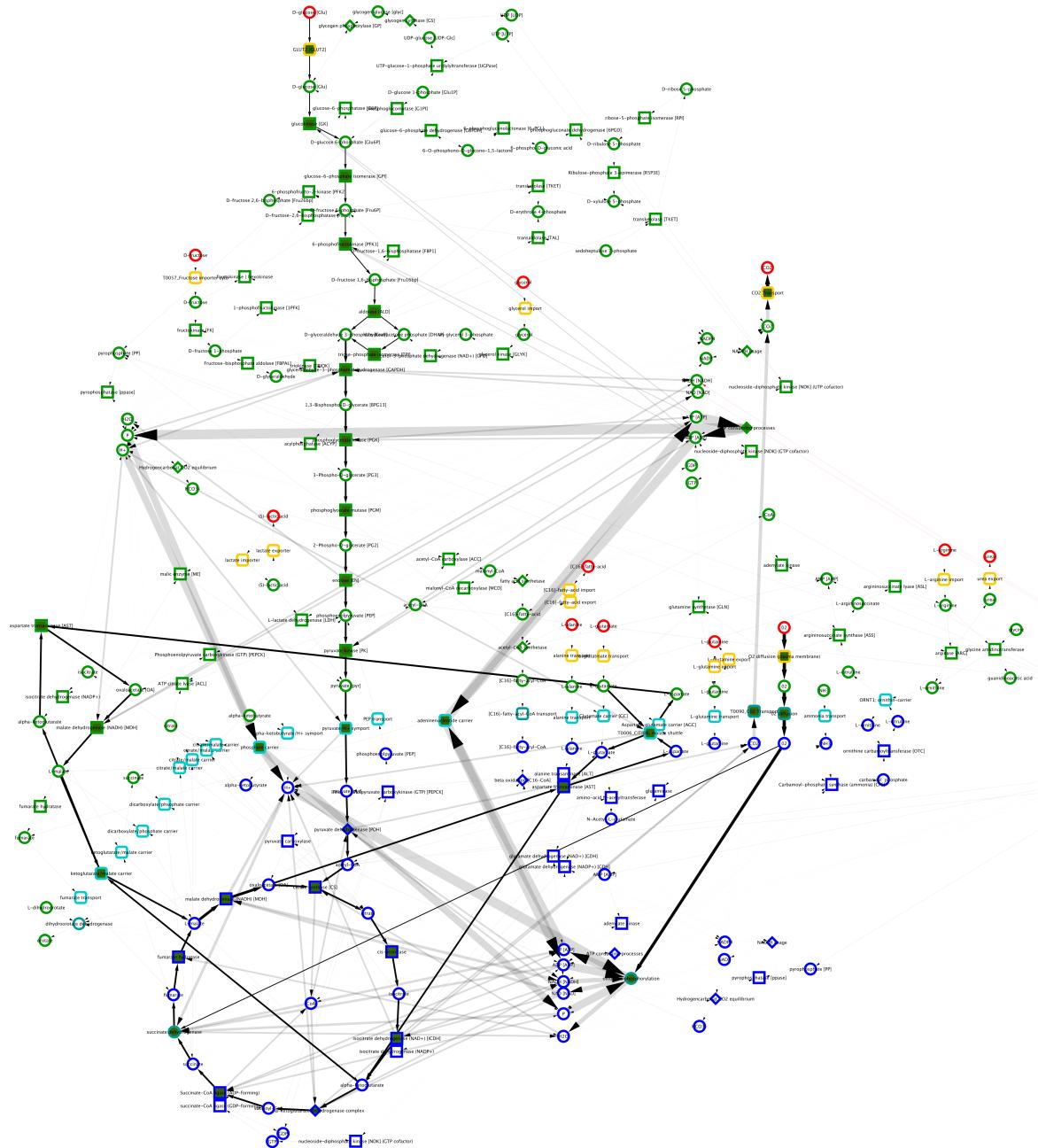


Abbildung 2.4: Aerobe Erzeugung von ATP aus Glucose ($v_{O_2} = 0.201$): Die aufgenommene Glucose wird vollständig zu Pyruvat, das im Citratzyklus vollständig zu CO_2 und H_2O oxidiert wird. Laktat wird nicht gebildet. Das in der Glykolyse entstehende NADH (GAPDH) wird über den Malatshuttle in das Mitochondrium transportiert und in der oxidativen Phosphorylierung vollständig zur Erzeugung von ATP verwendet. Deutlich weniger Glucose als im anaeroben Fall muss aufgenommen werden. Farbkodierung entsprechend Abb. 2.2.

phorylierung gespeichert werden kann. Einen weiteren Beitrag leistet das zytosolisch erzeugte NADH im aeroben Fall, da dieses ebenfalls ATP in der oxidativen Phosphorylierung erzeugen kann und nicht unter Laktatbildung im Zytosol regeneriert werden muss.

Deutlich sind die Unterschiede zwischen anaerober und aerober ATP Erzeugung basierend auf Glucose zu erkennen. Dabei unterscheiden sich v.a. das Schicksal des Pyruvat und damit verbunden auch die maximal pro Glucosemolekül erzeugbaren ATP. Alle im Pasteur Effekt beschriebenen Unterschiede zwischen aeroben und anaeroben Glucoseverwertung sind deutlich erkennbar: Der mehr als 10 mal größere Glucosebedarf im anaeroben Fall und der damit verbundene deutlich größere Fluss durch die Glykolyse. Laktat wird nur im anaeroben Fall abgegeben, im aeroben wird kein Laktat produziert.

Variation des Sauerstoffflusses Bei Variation des Sauerstoffflusses zwischen den aeroben und anaeroben Bedingungen wird in den Flusslösungen eine Kombination aus der beschriebenen aeroben und anaeroben Flusslösung realisiert (Abb. 2.3). Je weniger Sauerstoff aufgenommen werden kann, desto mehr dominiert der anaeroben Lösungsanteil, je näher man dem maximalen Sauerstofffluss im aeroben Fall kommt, desto mehr ähnelt die Lösung der aeroben Lösung.

In Abb. 2.5 sind die Flussdaten aus Tab. 2.1 graphisch dargestellt. Die Flüsse durch die Reaktionen hängen linear vom möglichen Sauerstofffluss ab.

Der Sauerstofffluss korreliert positiv mit der oxidativen Phosphorylierung, der Succinat Dehydrogenase, dem Fluss durch die mitochondriale MDH und PDH, sowie dem Transport von ATP mittels ANT aus dem Mitochondrium ins Zytosol.

Eine negative Korrelation besteht zwischen Sauerstofffluss und der aufgenommenen Glucose durch GLUT2, dem an die Blutbahn abgegebenen Laktat, dem Fluss durch die Pyruvatkinase sowie der zytosolischen MDH.

Je mehr Sauerstoff zur Verfügung steht, desto größer ist der Fluss durch die oxidative Phosphorylierung. Durch die vollständige Oxidation der Glucose kann dadurch deutlich mehr ATP pro Glucose erzeugt werden. Diese wird zusammen mit dem in der Succinat CoA Ligase entstehenden ATP mittels ANT ins Zytosol transportiert. Um die identische zytosolsche ATP Last zu bewältigen, muss daher deutlich weniger Glucose aufgenommen werden. Je mehr Sauerstoff vorhanden ist, desto weniger Laktat wird ausgeschieden, da einerseits deutlich weniger Glucose für die Energieversorgung abgebaut werden muss, also weniger Pyruvat produziert wird, andererseits ein größerer Anteil der Glucose vollständig zu CO_2 oxidiert wird.

Die MDH (zytosolisch und mitochondrial) sind für den Transport der in der GAPDH erzeugten Reduktionsenergie (NADH) ins Mitochondrium als Teil des Malatshuttle Systems verantwortlich. Die negative Korrelation für das zytosolische Enzym erklärt sich dadurch, dass je mehr oxidative Phosphorylierung betrieben wird, desto weniger Glucose wird durch die Glykolyse geschleust und desto weniger zytosolisches NADH entsteht in der GAPDH. Daher muss auch weniger NADH über MDH und Malatshuttle ins Mitochondrium transportiert werden.

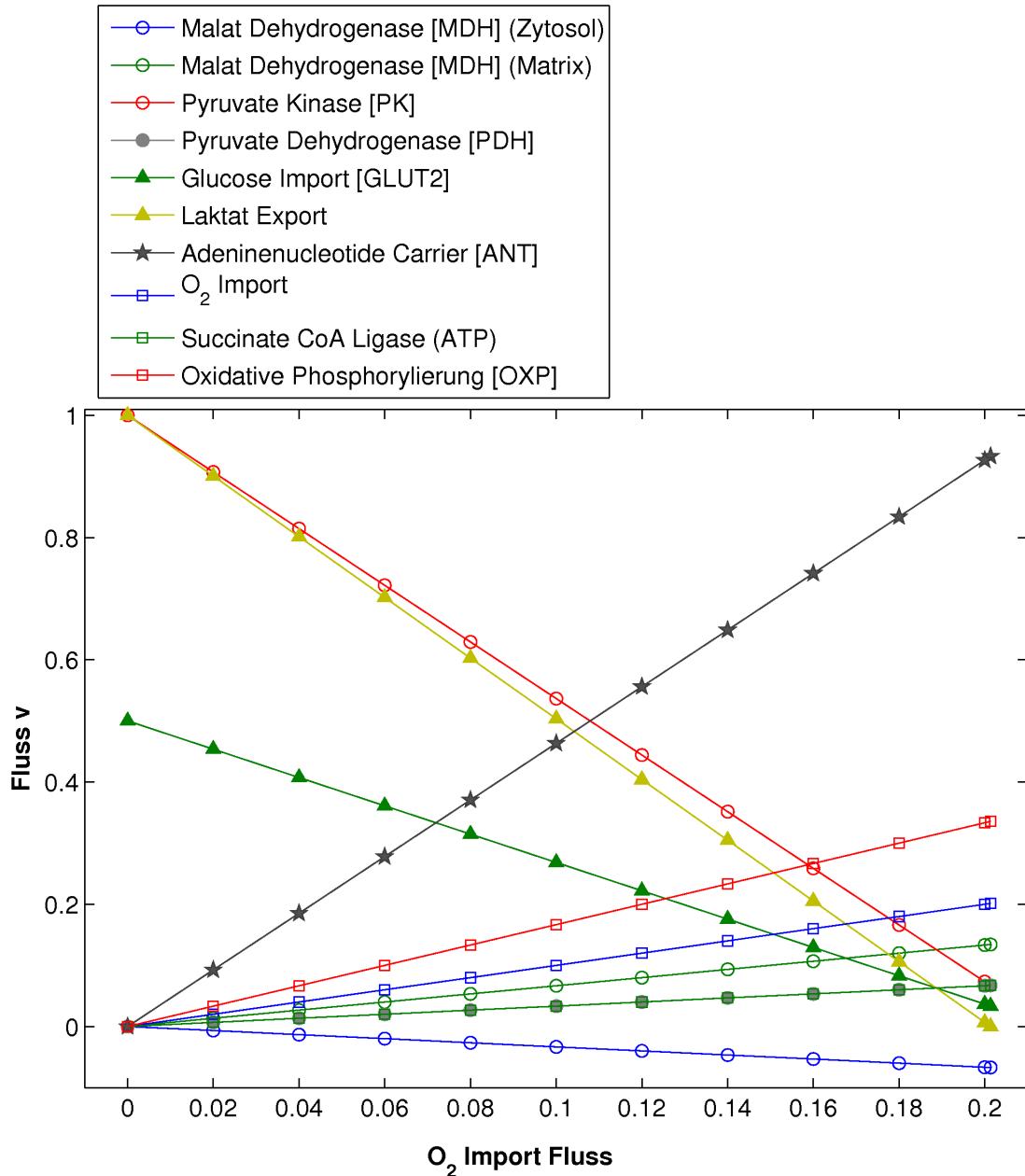


Abbildung 2.5: Abhängigkeit der Flüsse wichtiger Reaktionen vom aufgenommenen Sauerstoff: Die abgebildeten Flüsse hängen linear von der Sauerstoffsaueraufnahme ab. Positive Korrelation besteht zwischen Sauerstofffluss und ANT, OXP, MDH (mitochondriale Matrix), SDH und PDH. Negative Korrelation zwischen Sauerstofffluss und PK, Laktat Export, GLUT2 und MDH (Zytosol).

Die linearen Abhängigkeiten der Flüsse vom Sauerstofffluss sind eine Folge der verwendeten

FBA Methodik. Linearkombinationen von FBA Lösungen können wieder Lösungen sein, solange die Linearkombination der Lösungen mit allen FBA Bedingungen verträglich sind. Die Linearkombination erfüllt auf jeden Fall die Fliessgleichgewichtsbedingungen, aber auch die zusätzlichen Nebenbedingungen, wie obere Grenzen für Flüsse müssen erfüllt sein.

Zwei alternative optimale Lösungen, um ATP von Glucose aus bereitzustellen sind mit den vorgegebenen Bedingungen realisierbar, eine optimal Lösung im anaeroben Fall und eine optimale Lösung im aeroben Fall. In der aeroben Lösung werden Sauerstoff und die oxidative Phosphorylierung zur ATP Erzeugung verwendet, in der anaeroben wird Glucose zu Laktat abgebaut.

Die Sauerstoff abhängige Lösung ist bezüglich des Flussminimierungskriteriums besser, da für den Zielfluss ATP-Produktion deutlich geringere Glucoseflüsse in das System und durch die Glykolyse notwendig sind. Obwohl der vollständige Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung für die vollständige Oxidation von Glucose verwendet werden müssen und zusätzliche Transporter für ATP und Transport des NADH Reduktionspotentials notwendig sind, so ist diese Lösung immer noch bezüglich der Flussminimierung deutlich günstiger, da sehr viel ATP in der oxidativen Phosphorylierung entsteht.

Die jeweilige Flusslösung in Abhängigkeit vom Sauerstofffluss ist eine Linearkombination dieser beiden Einzellösungen. Der vorhandene Sauerstoff wird vollständig für die ATP Erzeugung mittels oxidativer Phosphorylierung verwendet, da dies die bezüglich der gewählten Zielfunktion der Flussminimierung bessere Lösung ist. Das restliche ATP muss dann über den aufwändigeren anaeroben Lösungsanteil bereitgestellt werden.

ATP pro Glucosemolekül In Abb. 2.6 ist die Abhängigkeit der ATP Produktion pro Glucosemolekül vom möglichen Sauerstofffluss dargestellt. Die pro aufgenommenem Glucosemolekül erzeugt ATP Menge hängt hyperbolisch vom erlaubten Sauerstofffluss ab. Je mehr Sauerstoff für die oxidative Phosphorylierung vorhanden ist, desto weniger Glucose muss aufgenommen werden, um den selben ATP Bedarf zu decken. Aus den Simulationen ergibt sich:

$$\text{ATP/Glucose} = (m_{GLUT2}v_{O_2} + c_{GLUT2})^{-1} = (-2.317v_{O_2} + 0.5)^{-1} \quad (2.7)$$

für $v_{O_2} \in [0, 0.201]$.

Bereits geringer Sauerstoffmangel führt zu einem deutlichen Abfall der gewinnbaren Energie aus Glucose. Ein Abfall um nur 7 % des Sauerstoffflusses im Vergleich zur Optimalversorgung im aeroben Fall ($v_{O_2} = 0.201$) führt zu einer Halbierung des erzeugten ATP ($v_{O_2,0.5} = 0.187$). Bereits geringer Sauerstoffmangel kann zu einer extremen Belastung für Energiemetabolismus werden.

Fazit Deutlich sind in den Lösungen die Unterschiede im aeroben und anaeroben Abbau der Glucose zur ATP Versorgung der Zelle zu erkennen. Bei hypoxischen Bedingungen setzt sich die Flusslösung aus einer aeroben Flusslösungskomponente und einer anaeroben zusammen. Dabei

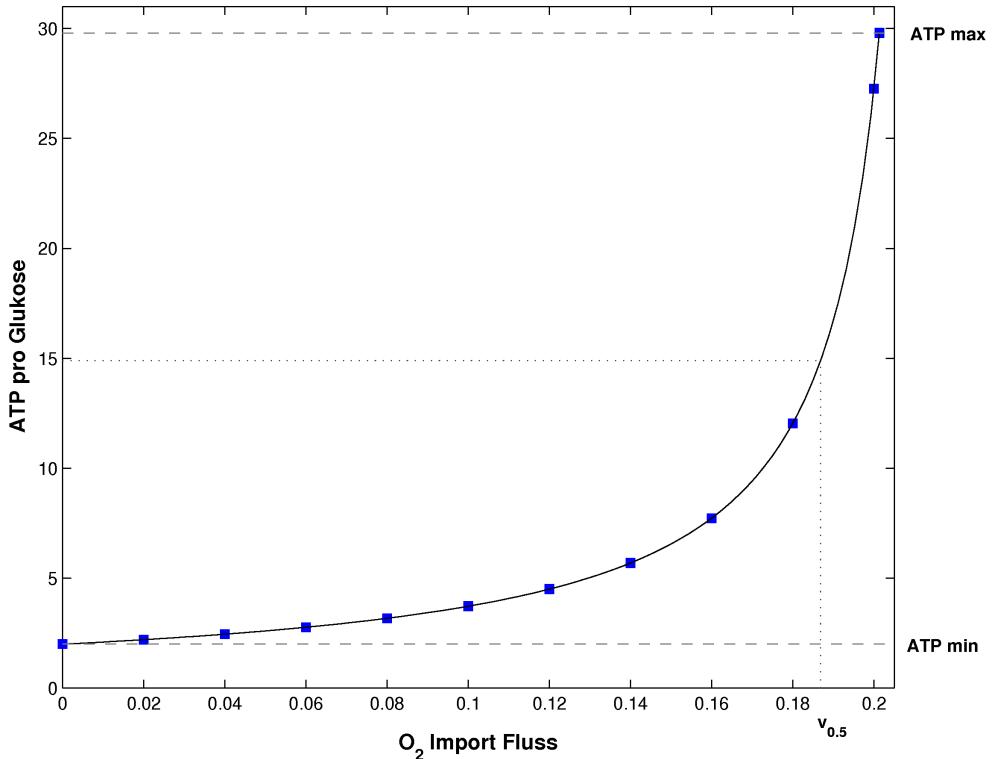


Abbildung 2.6: ATP Produktion pro aufgenommener Glucose in Abhängigkeit von der Sauerstoffaufnahme aus dem Blut: Abgebildet sind die aus den Simulationen gewonnenen Daten, sowie Gleichung 2.7. Je mehr Sauerstoff vorhanden ist, desto mehr ATP kann pro Glucosemolekül erzeugt werden. Unter anaeroben Bedingungen können 2 ATP pro aufgenommenem Molekül Glucose erzeugt werden. Bei vollständig aeroben Bedingungen, wenn das in der Glykolyse entstehende Pyruvat vollständig durch PDH und im Citratzyklus zu CO₂ und H₂O oxidiert wird, werden durch oxidative Phosphorylierung fast 30 ATP pro Glucose erzeugt. Die Abhängigkeit vom Sauerstofffluss ist hyperbolisch. Die maximale ATP Menge bei vollständiger Oxidation der Glucose sind 29.8 ATP pro Glucose. Dieses Maximum wird bei vollständige aeroben Bedingungen ($v_{O_2} = 0.201$) erreicht. Der Halbmaximalwert der ATP Produktion pro Glucose ist $v_{O_2,0.5} = 0.187$.

sind die von bereits von Pasteur in Hefe beobachteten Effekte bei der Umstellung von aerober zu anaerober Glucoseverwertung deutlich erkennbar: Mehr als 10 mal mehr Glucose ist für die Energieversorgung der Zelle notwendig, weiterhin wird Laktat gebildet.

Da über die vollständige Oxidation der Glucose in Kombination mit der oxidative Phosphorylierung deutlich mehr ATP pro Glucose erzeugt werden kann, als beim anaeroben Abbau der Glucose, kann bereits geringer Sauerstoffmangel zu einer großen Belastung für die Zelle werden.

Deutlich mehr Glucose ist notwendig, um den identischen Energiebedarf zu decken.

Die Lösungen sind biologisch und biochemisch plausibel. Sämtliche Teilaufgaben der Lösungen wurden so in der biochemischen Standardliteratur bereits beschrieben.

2.3.2 Pentosephosphatweg [PPP]

Abkürzungen **GK** Glucokinase, **PFK** Phosphofructokinase, **PGK** Phosphoglycerokinase, **PK** Pyruvakinase, **PDH** Pyruvat Dehydrogenase, **GAPDH** Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase, **MDH** Malat Dehydrogenase, **ANT** Adeninenucleotide Carrier **RPI** Ribulose-5 Phosphate Isomerase **TKET** Transketolase **TAL** Transaldolase **G6PHD** Glucose-6P Dehydrogenase **6PGD** Phosphogluconate Dehydrogenase **ICDH** Isocitrat Dehydrogenase **FBP** Fructose-1,6 Bisphosphatase

Der PPP wird in zwei Teilbereiche unterschieden [44, 42]:

1. Ein oxidativer, irreversibler Teil, der Reduktionsenergie in Form von NADPH erzeugt, wobei Glucose-6P in Ribulose-5P und CO₂ umgewandelt wird.
2. Ein nicht-oxidativer reversibler Teil, der Zwischenprodukte der Glykolyse mit Pentosephosphaten verbindet.

Einerseits hat der PPP die Aufgabe Ribose-5P für anabole Prozesse wie die Synthese von Purinen und Pyrimidinen bereitzustellen. Andererseits wird der PPP auch dazu genutzt, die hauptsächlich für reduktive Biosynthesen und oxidative Stressabwehr benötigte Reduktionsenergie in Form von NADPH bereitzustellen [42, 45].

In den Simulationen wurde getestet, ob das Hepatozytenmodell in der Lage ist ausgehend von Glucose diese unterschiedlichen Aufgaben zu erfüllen und wie diese unterschiedlichen Aufgaben realisiert wurden.

Synthese von Ribose-5P Für die Simulation zur Synthese von Ribose-5P wurde der Import von Glucose aus dem Blut erlaubt und Ribose-5P als Zielfluss aus dem System abgezogen. Weiterhin sind die Aufnahme von O₂ aus dem Blut und der Export von Laktat, Urea und CO₂ in die Umgebung möglich. Die Aufnahme von O₂ ist unbeschränkt möglich, die Simulationen finden unter aeroben Bedingungen statt.

Die optimale Flusslösung ist in Abb. 2.7 dargestellt. Die in der Analyse verwendeten Flusswerte und prozentualen Angaben sind in Tab. 2.3.2 angegeben.

In der Flusslösung wird Ribose-5P ausschließlich über den PPP erzeugt. Alternative Wege zur Ribose-5P, wie der Abbau von Purinen und Pyrimidinen, werden nicht verwendet. Die Lösung beschränkt sich auf den nicht-oxidativen Teil des PPP, die Reaktionen des oxidativen Teils werden nicht verwendet.

Zwei Drittel (67 %) des Ribose-5P werden durch die RPI ausgehend von Ribulose-5P bereitgestellt. Das restliche Drittel (33 %) stammt aus der TKET Reaktion.

Die aufgenommenen Glucose wird nahezu vollständig (96.13 %) zu Ribose-5P umgewandelt. Die restliche Glucose (3.87 %) wird in der Glykolyse in Pyruvat umgewandelt, fließt anschließend als Acetyl-CoA in den Citratzyklus und wird vollständig zu CO₂ und H₂O oxidiert. Mittels oxidativer Phosphorylierung wird ATP aus den reduzierten Reduktionsäquivalenten erzeugt. Nur

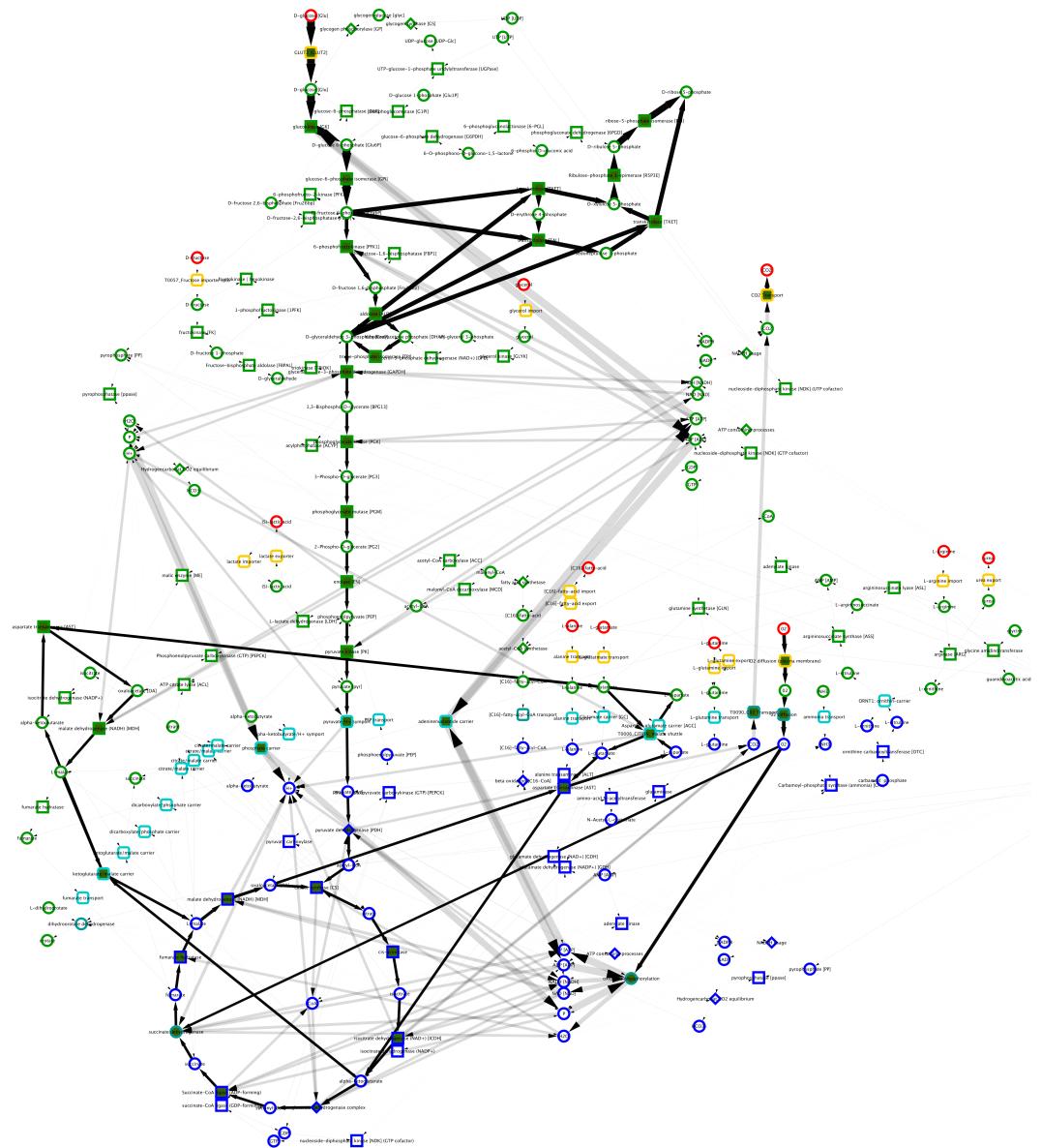


Abbildung 2.7: Synthese von Ribose-5P im PPP: Der Großteil der aufgenommenen Glucose wird zu Ribose-5P umgewandelt. Ein kleiner Teil dient der Energieversorgung durch Umwandlung in Pyruvat und Einspeisung als Acetyl-CoA in den Citratzyklus. Der Hauptteil des benötigten zytosolischen ATP wird in der oxidativen Phosphorylierung erzeugt und über ANT ins Zytosol transportiert. Farbkodierung entsprechend Abb. 2.2.

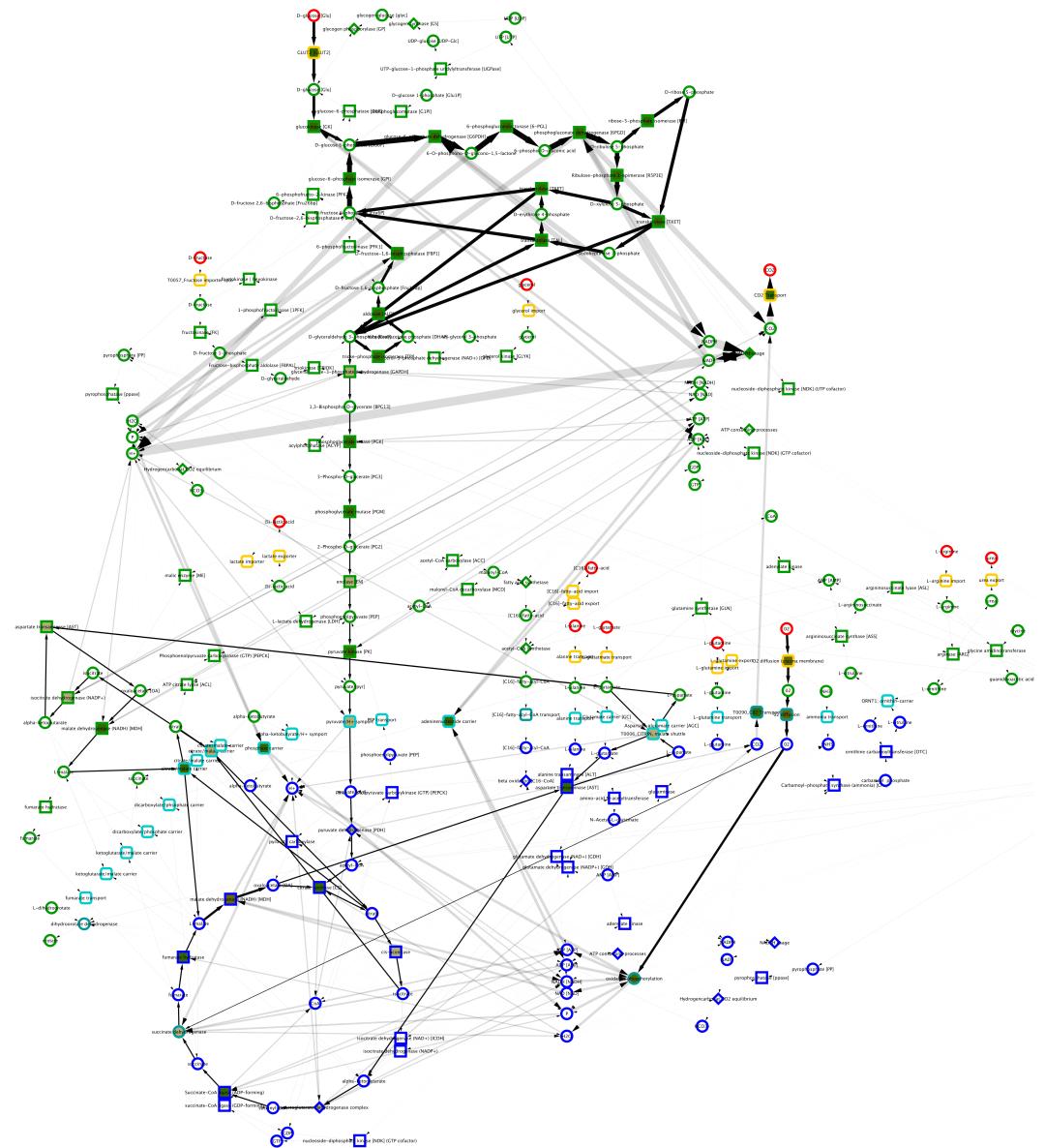


Abbildung 2.8: Erzeugung von NADPH Reduktionspotential im PPP: Der Große Teil der aufgenommenen Glucose wird im oxidativen Teil des PPP zu CO_2 oxidiert. Ein kleiner Teil der Glucose dient der Energieversorgung durch Umwandlung in Pyruvat und Einspeisung als Acetyl-CoA in den Citratzyklus. Der Hauptteil des ATP wird in der oxidativen Phosphorylierung erzeugt und über ANT ins Zytosol transportiert. Farbkodierung entsprechend Abb. 2.2.

ein sehr geringer Teil der Glucose muss unter aeroben Bedingungen für die Energieversorgung der Ribose-5P Synthese verwendet werden.

Die in der oxidativen Phosphorylierung erzeugte Energie in Form von ATP ist notwendig für die aktivierenden Reaktionen des oberen Teils der Glykolyse. Die GK benötigt 81.24 % des verbrauchten ATP, die PFK die restlichen 18.76 %.

In der PFK wird nur ein Viertel des ATP der GK verbraucht, da Fructose-6P durch TKET und die TAL aus der Glykolyse abgezogen wird. Der verbleibende Fluss durch die PFK ist einerseits notwendig, um Glycerinaldehyd-3P für den PPP zu synthetisieren, andererseits für den Glykolysefluss zum Pyruvat.

Das für die Ribose-5P Synthese notwendige ATP stammt nur zu einem sehr kleinen Teil aus dem zweiten Teil der Glykolyse (PGK und PK jeweils 6.29 %), der Großteil der notwendigen ATP Energie kommt aus Citratzyklus und oxidativer Phosphorylierung (87.42 %).

Die Reaktionen des Malatshuttels transportieren die in der Glykolyse produzierte Reduktionsenergie (NADH in der GAPDH) in das Mitochondrium, wo dieses über die oxidative Phosphorylierung ATP erzeugt. Der Austausch von ATP und ADP zwischen Mitochondrium und Zytosol erfolgt über ANT.

Ribose-5P kann sehr einfach aus Glucose-6P im PPP synthetisiert werden. Der notwendige Energiebedarf wird dabei im aeroben Fall über die ATP Erzeugung mittels oxidative Phosphorylierung aus einem kleinen Teil der aufgenommenen Glucose gedeckt.

NADPH Reduktionsenergie Der Bedarf an Reduktionsenergie in Form von NADPH wurde über einen Ersatzprozess, der Reduktionsenergie in Form von NADPH verwendet, modelliert. Als Zielfluss wurde der Fluss durch diesen Ersatzprozess auf 1 gesetzt. Die identischen Metabolite, wie in der Ribose-5P Simulation, konnten mit dem Blut ausgetauscht werden.

Die optimale Flusslösung mittels Flussminimierung ist in Abb. 2.8 dargestellt. Die in der Diskussion verwendeten Flusswerte und prozentualen Angaben sind in Tab. 2.3.2 angegeben.

In der Flusslösung wird in drei Reaktionen NADP^+ zu NADPH und H^+ reduziert. NADPH wird nahezu vollständig (99.34 %) im oxidativen Teil des PPP synthetisiert. Die G6PDH und 6PGD sind dabei für jeweils 49.68 % des gebildeten NADPH verantwortlich.

Der minimale Rest wird von einem zytosolischen Isoenzym der ICDH bereitgestellt (0.64 %). Die mitochondriale ICDH ist Teil des Citratzyklus und durch die Verwendung des zytosolischen Isoenzymes verläuft der Citratzyklus nicht vollständig im Mitochondrium, sondern eine der Reaktionen im Zytosol.

Andere NADPH produzierenden Reaktionen wie beispielsweise das zytosolische Malic Enzyme sind nicht Teil der Lösung.

Die aufgenommene Glucose wird nahezu vollständig (96.32 %) im oxidativen Teil des PPP zu CO_2 oxidiert, wobei Reduktionsenergie in Form von NADPH gespeichert wird. Analog zur Ribose-5P Simulation, gelangt nur ein sehr geringer Teil der Glucose in den unteren Teil der

	Ribose-5P		NADPH	
	Fluss	Fluss [%]	Fluss	Fluss [%]
ATP Bilanz				
ATP Verbrauch Zytosol	-1.07	-100	-0.09	-100
Glucokinase [GK]	-0.867	-81.24	-0.0860	-100
Phosphofructokinase [PFK]	-0.200	-18.76	0	0
Phosphoglyceratkinase [PGK]	0.067	6.29	0.0063	7.35
Pyruvatkinase [PK]	0.067	6.29	0.0063	7.35
Oxidative Phosphorylierung [OXP]	0.9329	87.42	0.073	85.29
Glucose Flüsse				
Glucoseimport [GLUT2]	0.867	100	0.086	100
Glucoseverbrauch PPP	0.833	96.13	0.083	96.32
Glucose zu Pyruvat	0.034	3.87	0.003	3.68
Pyruvat Dehydrogenase [PDH]	0.067	7.74	0.006	7.35
Wichtige Flüsse				
Transaldolase [TALD]	-0.33		0.17	
Transketolase [TKET]	0.33		-0.17	
Ribose-5 Phosphate Isomerase [RPI]	-0.67		-0.17	
Glucose-6 Phosphate Dehydrogenase [G6PDH]	0		0.497	
Phosphogluconate Dehydrogenase [6PGD]	0		0.497	
Isocitrat Dehydrogenase (NADPH)	0		0.006	
Malic Enzyme	0		0	

Tabelle 2.2: FBA Simulationen zum Pentosephosphatweg: ATP Bilanz und wichtige Flüsse der Simulationen mit Zielstellung Ribose-5P Synthese (s. Abb. 2.7) und Bereitstellung von Reduktionspotential in Form von NADPH (s. Abb. 2.8). In der ATP Bilanz werden die prozentualen Flüsse relativ zum jeweiligen ATP Verbrauch im Zytosol berechnet. ATP verbrauchende prozentuale Flüsse haben negative Vorzeichen, ATP produzierende positive. Die prozentualen Flüsse bei den Glucose Flüssen werden auf den jeweiligen Glucoseimport bezogen.

Glykolyse (3.68 %).

Energie in Form von ATP wird nur für die GK zur Phosphorylierung der Glucose benötigt. Die PFK ist nicht Teil der Flusslösung und verbraucht daher auch keine Energie.

Die ATP Energie stammt wie in der Ribose-5P Simulation nur zu einem geringen Teil aus den ATP erzeugenden Reaktionen der Glykolyse (14.7 %). Der Hauptteil der Energie wird durch oxidative Phosphorylierung bereitgestellt (85.29%).

Die Reduktionsenergie des NADH, die in der Glykolyse anfällt (GAPDH) wird ins Mitochondrium transferiert. Dafür wird allerdings eine andere Transporterkombination in der inneren Mitochondrienmembran verwendet als in der Ribose-5P Simulation. Malat wird nicht im direkten Antiport gegen α -Ketoglutarat ausgetauscht, sondern indirekt gegen Isocitrat. Dadurch ist ein geringer Fluss durch die zytosolische Isocitrat Dehydrogenase möglich, der einen Beitrag zur Bereitstellung von Reduktionsenergie in Form von NADPH hat.

Das in der oxidativen Phosphorylierung entstehende ATP wird wiederum über ANT ins Zytosol transportiert.

Auffälligster Unterschied zur Ribose-5P Simulation ist, dass ein Teil der Glykolyse in Richtung Gluconeogenese abläuft. Die PFK Reaktion findet nicht statt, dafür ist die FBP Teil der Lösung. Hierdurch entsteht ein Zyklus, der FBP, G6PDH und 6PGD enthält. Dieser Zyklus ermöglicht

durch mehrmaliges Durchlaufen, Glucose vollständig zu CO₂ zu oxidieren.

Vergleich Ribose-5P und NADPH Die Glucoseflüsse in beiden Simulationen sind nahezu identisch, obwohl der PPP für vollkommen unterschiedliche Ziele verwendet wird. In beiden Fällen kann der Großteil der Glucose im PPP zur Erfüllung des jeweiligen Zielflusses verwendet werden. Entweder zur Erzeugung von NADPH (96.32 %) oder zur Synthese von Ribose-5P (96.13 %). Die restliche Glucose wird in beiden Fällen zur Energieversorgung der Aktivierungsreaktionen der Glucose verwendet. Der Großteil der Energie wird dabei über oxidative Phosphorylierung eines kleinen Teils der Glucose bereitgestellt. Im Falle des Ribose-5P liefern 3.87 % der Glucose 87.42 % der Energie, im Fall von NADPH 3.68 % der Glucose 85.29 % der Energie. Die Reduktionsenergie die auf Höhe der GAPDH Reaktion anfällt wird jeweils über Transporter in das Mitochondrium transportiert und dort ebenfalls zur oxidativen Phosphorylierung verwendet.

Durch zwei einfache Stellgrößen kann reguliert werden, wie sich der Fluss auf den PPP verteilt und die Glucose verbraucht wird. Einerseits über den Abfluss von Ribose-5P, andererseits über den Bedarf an NADPH, der den Fluss durch die erste Reaktion des oxidativen Wegs des PPP entscheidet (G6PDH). Die beiden Lösungen sind abgesehen von den PPP Reaktionen und der PFK und FBP nahezu identisch. Zwei sehr unterschiedliche Ziele können mit nahezu identischer Belastung der Glykolyse erzielt werden.

Im Falle der Reduktionsenergie in Form von NADPH wird ein minimaler Teil des Lösungsfusses über die zytosolische ICDH realisiert. Hier stellt sich die Frage, ob dies in der Realität der Fall ist, oder ob dies nur ein Artefakt der verwendeten Flussminimierung ist.

2.3.3 Gluconeogenese

Abkürzungen **GK** Glucokinase, **PFK** Phosphofructokinase, **FBP** Fructose-1,6 Bisphosphatase **PGK** Phosphoglycerokinase, **PK** Pyruvokinase, **PDH** Pyruvat Dehydrogenase, **GAPDH** Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase, **MDH** Malat Dehydrogenase, **ANT** Adeninenucleotide Carrier **G6P** Glucose-6 Phosphatase **TPI** Triosephosphat Isomerase **ALT** Alanintransaminase **PC** Pyruvat Carboxylase **PEP-CK** PEP Carboxykinase

Einleitung Die Gluconeogenese, die Synthese von Glucose aus glucogenen Vorstufen, ist ein zentraler Stoffwechselweg der Leber und von entscheidender Bedeutung bei der Aufgabe der Leber den Blutglucosespiegel konstant zu halten. Eine detaillierte Einleitung zur Gluconeogenese und zur Bedeutung v.a. auch im Cori- und Glucose-Alanin-Zyklus wird in der Einleitung zum kinetischen Modell der Glykolyse, Gluconeogenese und Glykogenstoffwechsel gegeben (ref Kap.?).

Alle Metabolite, die zu Oxalacetat oder zu Zwischenprodukten der Glykolyse umgewandelt werden können, können als Ausgangspunkt der Gluconeogenese. Die wichtigsten Vorstufen sind organische Moleküle mit drei Kohlenstoffatomen wie Laktat, Pyruvat und Glycerol, sowie die glucogenen Aminosäuren [42].

Glycerol kann in DHAP umgewandelt werden und steht damit als Glycolyseintermediat für die Gluconeogenese zur Verfügung. Laktat wird mittels LDH zu Pyruvat oxidiert. Alanin kann über die ALT in Pyruvat umgewandelt werden. Der erste Gluconeogeneseschritt, ausgehend von Pyruvat, ist die ATP-abhängige Carboxylierung zu Oxalacetat mittels PC. Die glucogenen Aminosäuren werden zu Intermediaten des Citratzyklus umgewandelt und stehen schlussendlich ebenfalls als Oxalacetat für die Gluconeogenese zur Verfügung. Oxalacetat wird über die PEPCK zu PEP, einem Glycolyseintermediat.

Simulationen In den Simulationen zur Gluconeogenese wurde als Zielfluss der Glucoseexport ins Blut vorgegeben. Die Gluconeogenese wurde ausgehend von unterschiedlichen Substraten getestet. Laktat (s. Abb. 2.9), Alanin (s. Abb. 2.10), Pyruvat (s. Abb. 2.11), Oxalacetat (s. Abb. 2.12) und Glycerol (s. Abb. 2.13) wurden als verschiedene Vorstufen verwendet. Diese konnten jeweils unbegrenzt aus dem Blut aufgenommen werden. Weiterhin war der Export von CO₂ und Urea sowie der Import von O₂ und Arginin für die Harnstoffsynthese in allen Simulationen erlaubt.

Die Simulationen wurden ohne Einschränkung des Sauerstoffflusses durchgeführt, sind also vollständig aerob. Die verwendeten Flusswerte und prozentualen Angaben sind in Übersichtstabelle 2.3.3 angegeben.

	Laktat		Alanin		Pyruvat		Oxalacetat		Glycerol	
	Fluss	Fluss [%]	Fluss	Fluss [%]	Fluss	Fluss [%]	Fluss	Fluss [%]	Fluss	Fluss [%]
<i>Import Substrat</i>	2.4		2.84		2.91		2.93		2	
<i>ATP Erzeugung Mitochondrium</i>	5.6	100	11.68	100	6	100	4	100	2	100
Oxidative Phosphorylierung [OXP]	5.19	92.81	10.84	92.81	5.09	84.77	3.08	76.88	2	100
Succinat CoA Ligase (ATP)	0	0	0	0	0.91	15.23	0.92	23.12	0	0
Succinat CoA Ligase (GTP)	0.4	7.19	0.84	7.19	0	0	0	0	0	0
<i>ATP Verbrauch Mitochondrium</i>	-3.6	-64.27	-6.68	-57.19	-2	-33.33	0	0	0	0
PEP Carboxykinase [PEPCK]	-2	-35.73	-1	-8.56	0	0	0	0	0	0
Pyruvat Carboxylase [PC]	-1.6	-28.54	-2	-17.12	-2	-33.33	0	0	0	0
Carbamoylphosphat Synthase [CPS]	0	0	-3.68	-31.51	0	0	0	0	0	0
<i>ATP Transport [Mitochondrium → Zytosol]</i>										
Adeninenucleotide Carrier [ANT]	2	35.73	5	42.81	4	66.67	4	100	2	100
<i>ATP Verbrauch Zytosol</i>	-2	-35.73	-5	-42.81	-4	-66.67	-4	-100	-2	-100
Glucokinase [GK]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phosphofructokinase [PFK1]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phosphoglyceratkinaise [PGK]	-2	-35.73	-2	-17.12	-2	-33.33	-2	-50	0	0
Pyruvatkinase [PK]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glycerolkinase	0	0	0	0	0	0	0	0	-2	-100
PEP Carboxykinase [PEPCK]	0	0	-1	-8.56	-2	-33.33	-2	50	0	0
Arginosuccinat Synthase [ASS]	0	0	-1	-8.56	0	0	0	0	0	0
Adenylyltransferase	0	0	-1	-8.56	0	0	0	0	0	0
<i>Wichtige Flüsse</i>										
O ₂ Verbrauch	1.21		2.52		1.28		0.85		0.43	
CO ₂ Erzeugung	1.21		0.68		2.74		5.7		0	
Fructose-1,6 bisphosphatase [FBP1]	2		2		2		2		2	
Enolase [EN]	2		2		2		2		0	
Pyruvat Dehydrogenase [PDH]	0.4		0.84		0.91		0.92		0	
Malat Dehydrogenase [MDH] Zytosol	-0.4		2		-2		2		-2	
Malat Dehydrogenase [MDH] Mitochondrium	1.21		-0.16		-1.09		-2		2	
Fumarat Hydratase [FH] Mitochondrium	0.4		0.84		0		0		0	
Fumarat Hydratase [FH] Zytosol	0		1		0.91		0.92		0	
Malic Enzyme [ME]	0.4		0		0		0.92		0	

Tabelle 2.3: Gluconeogenese ausgehend von unterschiedlichen Substraten (FBA Simulationen): Sämtliche Flusswerte sind Relativwerte bezüglich des Zielflusses Glucoseexport, der auf 1 normiert ist. Die prozentualen ATP Flüsse beziehen sich auf die mitochondriale ATP Erzeugung bestehend aus oxidativer Phosphorylierung und Succinat CoA Ligase. In der oxidativen Phosphorylierung sind die ATP Erzeugung durch Einspeisung von NADH mit P/O 2.3 und FADH₂ durch die Succinat Dehydrogenase mit P/O 1.4 zusammengefasst. Fluss durch Enzyme des Citratzyklus sind in Standardrichtung positiv. Fluss durch ATP erzeugende Reaktionen ist positiv, durch ATP verbrauchende Reaktionen negativ. Fluss durch Enolase in Richtung Gluconeogenese positiv.

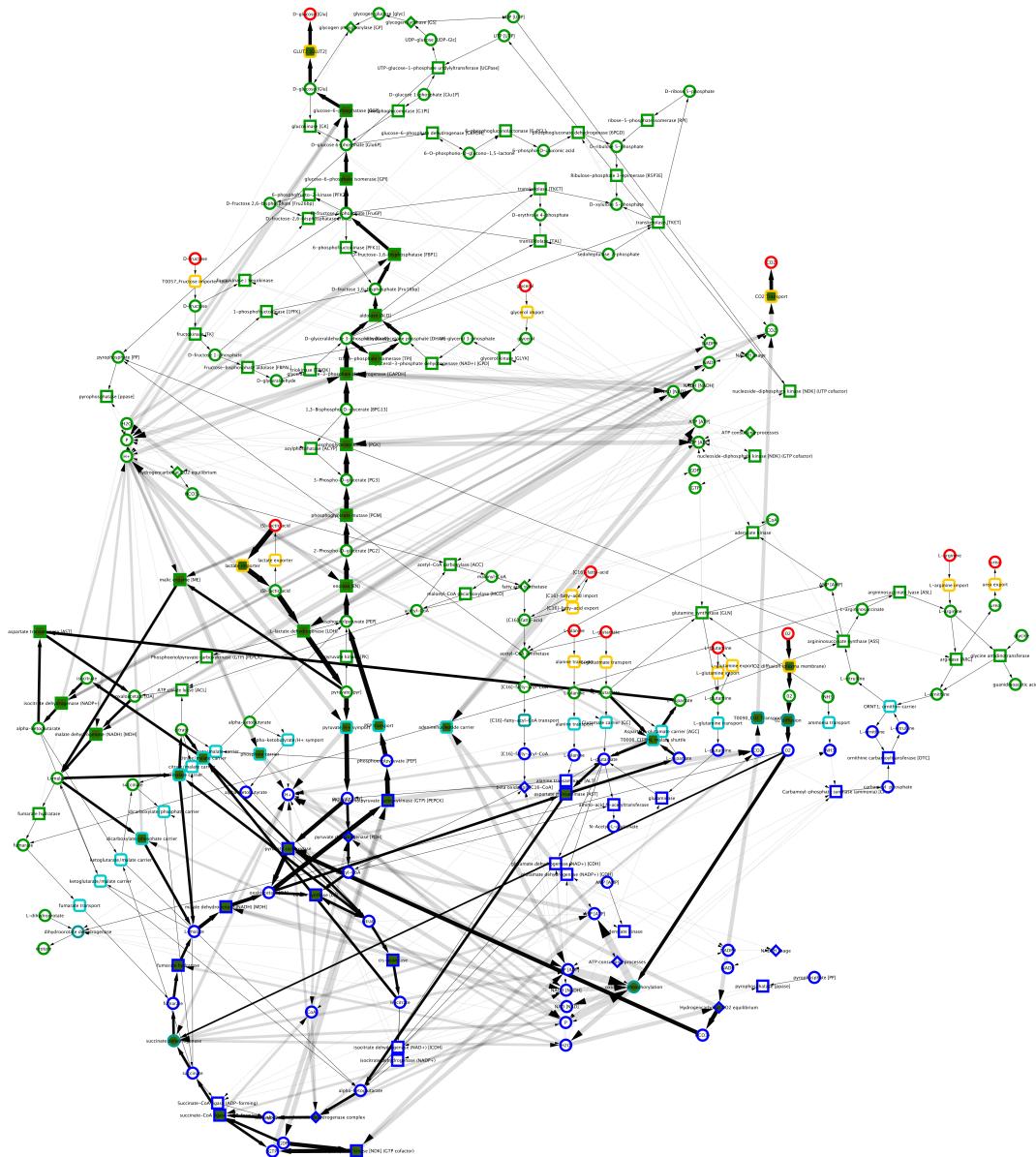


Abbildung 2.9: Gluconeogenese ausgehend von Laktat: Laktat wird durch LDH zu Pyruvat. Das dabei entstehende NADH wird zum Teil in der GAPDH Reaktion verwendet, zum anderen Teil über Malats-huttle ins Mitochondrium transportiert. Das Pyruvat wird teilweise mittels PC zu Oxalacetat, teilweise zu Acetyl-CoA für die Oxidation im Citratzyklus. Mitochondriale PEPCK erzeugt die 2 PEP aus denen 1 Glucosemolekül synthetisiert wird. Energieversorgung erfolgt über die oxidative Phosphorylierung. ATP wird über ANT ins Zytosol transportiert. Farbkodierung entsprechend Abb. 2.2.

Das Modell des Kernhepatozyten ist ausgehend von allen getesteten Substraten in der Lage,

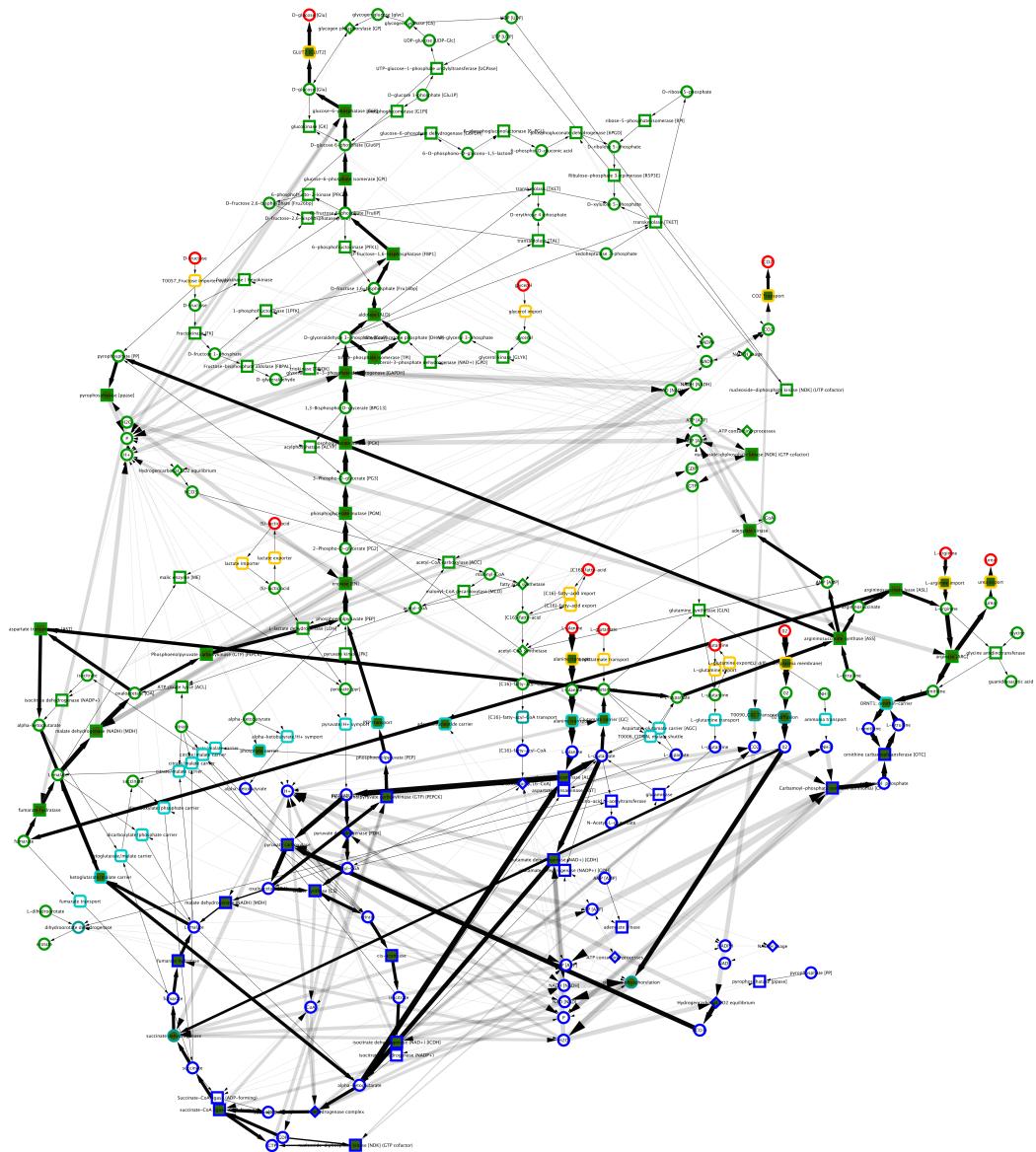


Abbildung 2.10: Gluconeogenese ausgehend von Alanin: Alanin wird über ALT zu Pyruvat, die NH_3 -Gruppe wird dabei auf α -Ketoglutarat übertragen. Das Pyruvat wird teilweise mittels PC zu Oxalacetat, teilweise zu Acetyl-CoA für die Oxidation im Citratzyklus. Die 2 benötigten PEP für 1 Glucosemolekül wird zu gleichen Teilen von zytosolischer und mitochondrialer PEPCK synthetisiert. Energieversorgung der Gluconeogenese über die oxidative Phosphorylierung. ATP Transport ins Zytosol über ANT. Der Harnstoffzyklus wird für die Entgiftung des NH_3 verwendet. Farbkodierung entsprechend Abb. 2.2.

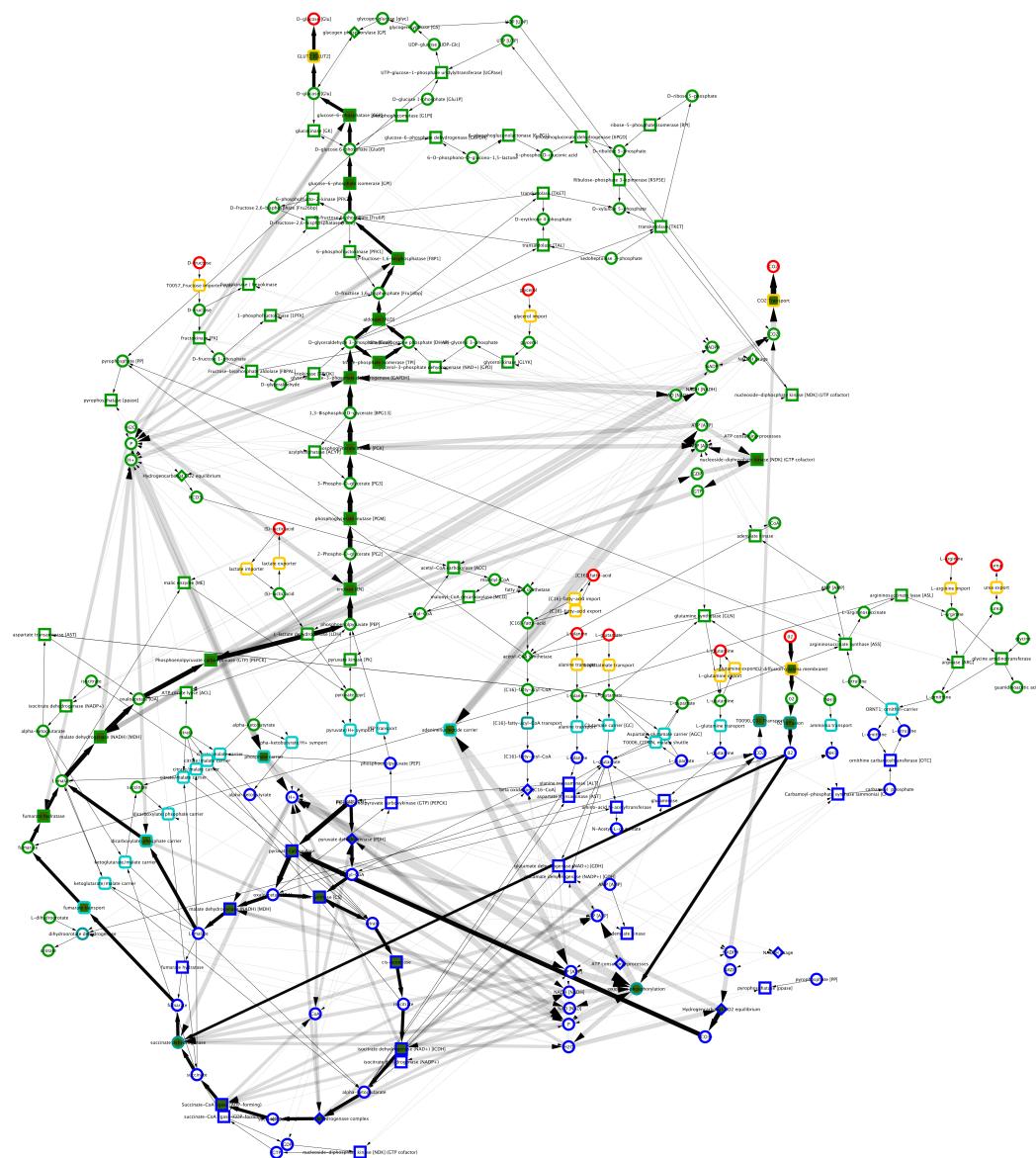


Abbildung 2.11: Gluconeogenese ausgehend von Pyruvat: Pyruvat wird teilweise durch PC zu Oxalacetat, teilweise zu Acetyl-CoA für die Oxidation im Citratzyklus. Zytosolische PEPCK erzeugt die 2 PEP aus denen 1 Glucosemolekül synthetisiert wird. Energieversorgung über die oxidative Phosphorylierung. Transport von ATP über ANT ins Zytosol. NADH für die GAPDH wird mittels Malatshuttle aus dem Mitochondrium ins Zytosol transportiert. Farbkodierung entsprechend Abb. 2.2.

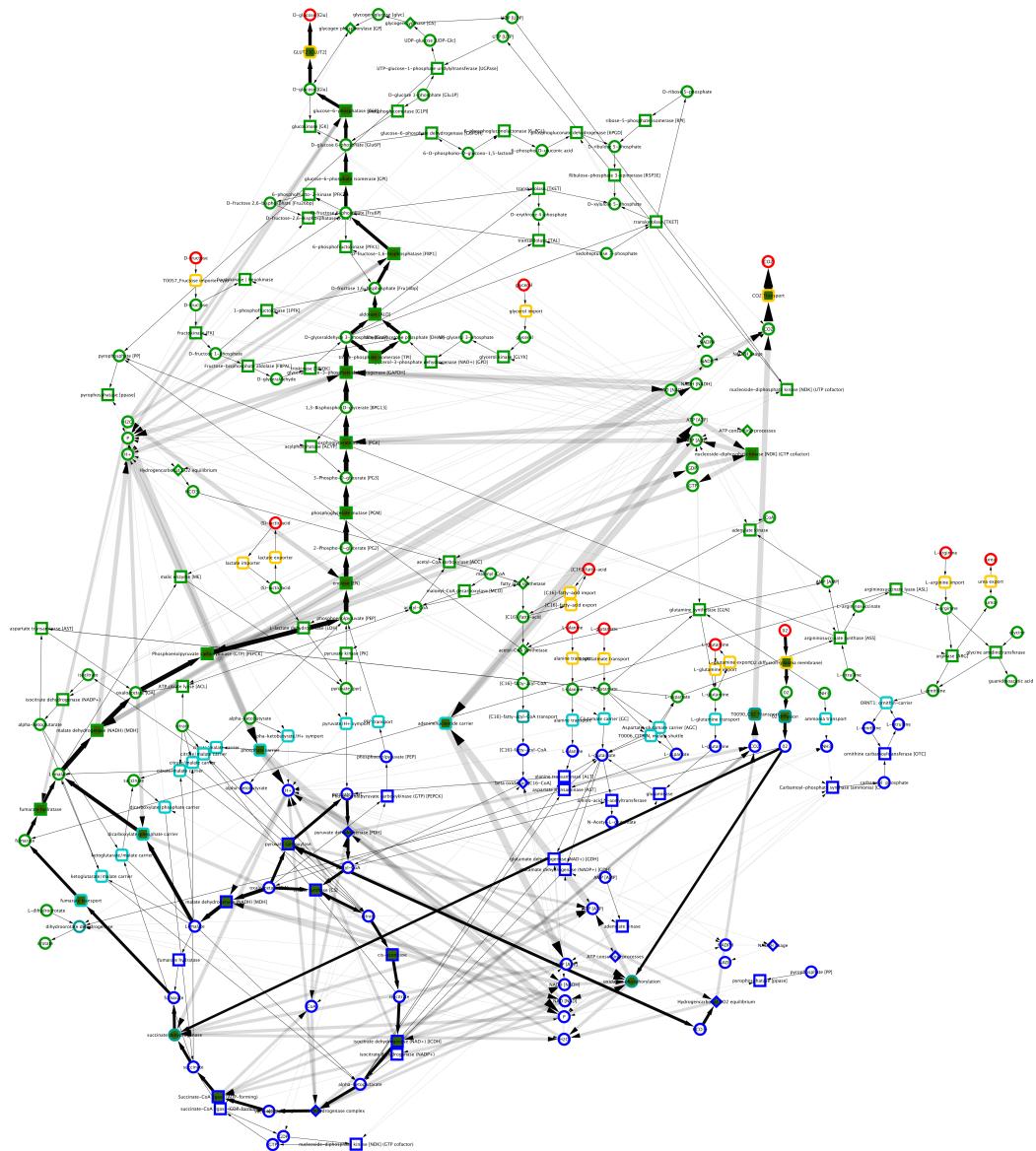


Abbildung 2.12: Gluconeogenese ausgehend von Oxalacetat: Das für den Citratzyklus benötigte Acetyl-CoA erzeugt die PDH aus Pyruvat, welches aus Oxalacetat mittels ME im Zytosol erzeugt wird. Hierzu wird das Oxalacetat zum Teil zu Malat, welches über den Malatshuttle ins Zytosol transportiert wird. Energieversorgung über die oxidative Phosphorylierung. ATP Transport ins Zytosol über ANT. NADH für die GAPDH wird mittels Malatshuttle aus dem Mitochondrium ins Zytosol transportiert. Farbkodierung entsprechend Abb. 2.2.

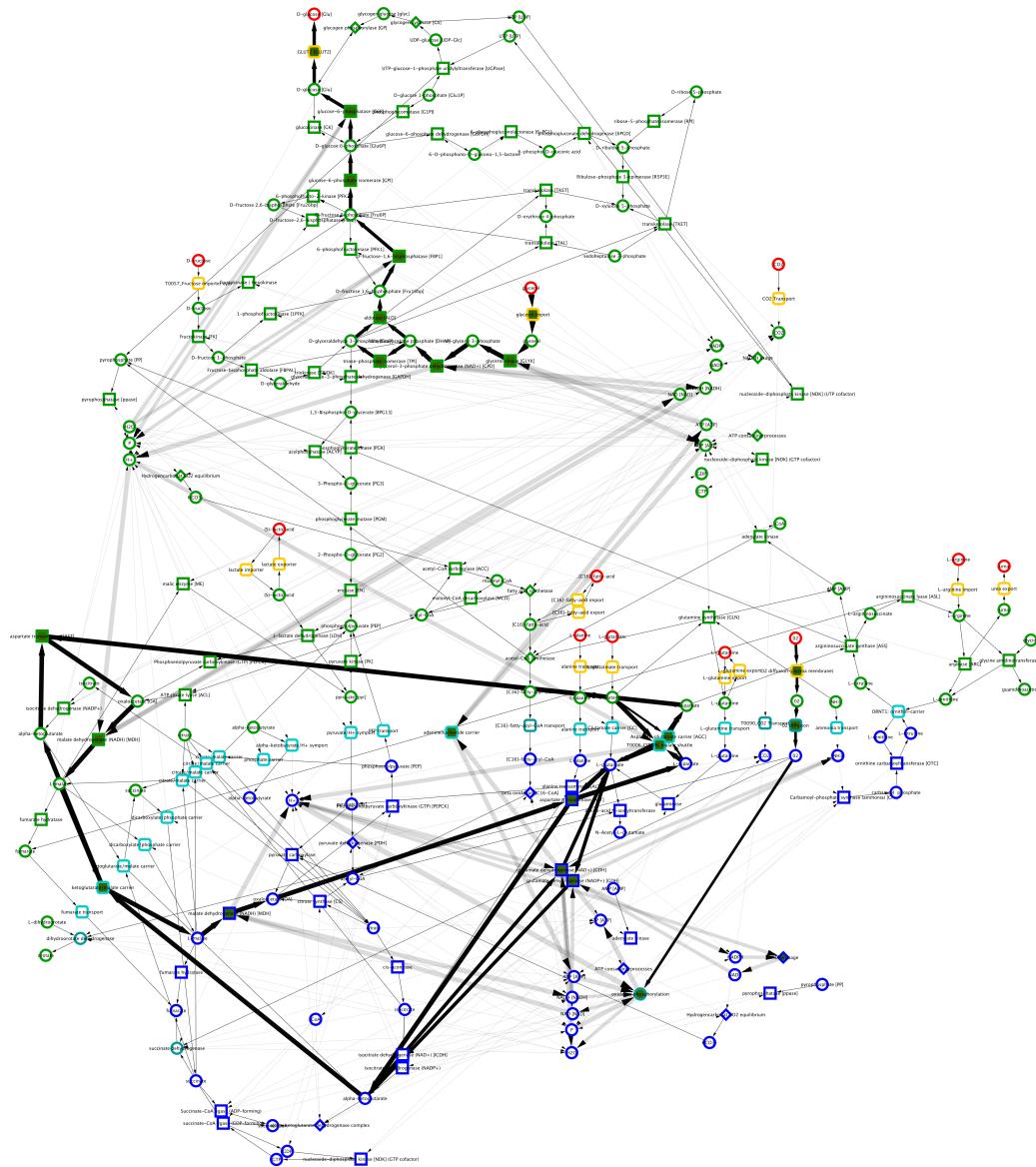


Abbildung 2.13: Gluconeogenese ausgehend von Glycerol: Die Gluconeogenese ausgehend von Glycerol unterscheidet sich sehr stark von den anderen getesteten Substraten. Glycerol wird über GLYK und GPD zu DHAP. Das entstehende NADH in der GPD Reaktion wird über den Malatshuttle ins Mitochondrium transportiert und kann dort die notwendige Energie über oxidative Phosphorylierung für die Gluconeogenese bereitstellen. Die Flusslösung unterteilt sich in zwei Bereiche. Einerseits die Synthese von Glucose, andererseits die Bereitstellung der für die Synthese notwendige Energie. Farbkodierung entsprechend Abb. 2.2.

Gluconeogenese zu betreiben. Die Flusslösungen verwendeten jeweils die Umgehungsreaktionen der Glykolyse (G6P, FBP und PEPCK). Die GK, PFK und PK Reaktionen wurde in keiner der Flusslösungen verwendet.

In den FBA Simulationen mit Laktat, Alanin, Pyruvat und Oxalacetat werden jeweils zwei Moleküle PEP zur Gluconeogenese von einem Glucosemolekül verwendet. Dabei verläuft die Glucosesynthese ausgehend von PEP unter Umgehung der PFK durch die FBP und der GK durch die G6P.

Glycerol wird dagegen durch die Glycerokinase und die Glycerol-3 Phosphat Dehydrogenase zu DHAP und anschließend durch die Aldolase in die Gluconeogenese eingeschleust. DHAP wird dazu teilweise über die TPI in Glycerinaldehyd-3 Phosphat umgewandelt, welches mit DHAP zu Fructose-1,6 Bisphosphat reagiert. Analog zu den anderen Substraten verläuft dann die Bildung der Glucose über FBP, G6PI und G6P.

Die synthetisierte Glucose wird in allen Fällen vollständig über GLUT2 exportiert.

Alle Substrate waren in der Lage den Energiebedarf für die Gluconeogenese vollständig selbst zu decken, d.h für die Simulationen musste keine zusätzliche Energie in Form von ATP oder reduzierten Reduktionsäquivalenten vorgegeben werden.

Für die Bildung eines Moleküls Glucose wurde in Abhängigkeit von der verwendeten Vorstufe unterschiedliche Mengen an Substrat benötigt. Die geringste Menge wird bei der Umsetzung von Glycerol in Glucose benötigt. Aus 2 Glycerolmolekülen kann ein Glucosemolekül synthetisiert werden. Weniger effizient sind Laktat (2.4), Alanin (2.84), Pyruvat (2.91) und Oxalacetat (2.93). Glycerol kann den Energiebedarf für die Gluconeogenese vollständig über die Vorbereitungsreaktionen zur Umwandlung in DHAP decken, daher sind nur 2 Glycerolmoleküle für die Erzeugung eines Glucosemoleküls notwendig. Bei den anderen Glucosevorstufen muss dagegen durch oxidativen Abbau eines Teils des Substrats Energie für die Gluconeogenese erzeugt werden. Daher muss mehr Substrat, als allein für das Kohlenstoffgerüst der Glucose (2) benötigt wird, aufgenommen werden.

Laktat und Glycerol werden bei den einschleusenden Reaktionen bis zum Pyruvat bzw. DHAP oxidiert. Reduktionsenergie wird in Form reduzierter Reduktionsäquivalente generiert. Sowohl bei der Oxidation von Laktat zu Pyruvat (LDH), als auch durch die Glycerol-3P Dehydrogenase bei der Glycerolumwandlung zum DHAP wird NAD^+ zu NADH reduziert.

NADH wird bei der Verwertung von Glycerol zur ATP-Synthese in der oxidativen Phosphorylierung verwendet, bei Laktat für die GAPDH. Bei Verwendung von Glycerol wird kein NADH für die GAPDH Reaktion benötigt, da das Glycerol auf Höhe der Aldolase in die Gluconeogenese eingespeist wird und daher die GAPDH nicht zur Gluconeogenese notwendig ist.

Die notwendige ATP Energie für die Gluconeogenese wird bei allen Substraten vollständig im Mitochondrium erzeugt. Das im Zytosol verbrauchte ATP wird mittels ANT aus dem Mitochondrium ins Zytosol transportiert.

Der Großteil des ATP wird bei allen Substraten über die oxidative Phosphorylierung erzeugt, das restliche ATP durch die Succinat CoA Ligase im Citratzyklus. Die durch oxidative Phosphorylierung und die Succinat CoA Ligase beigesteuert Anteile variieren und reichen von 100 % oxidative Phosphorylierung bei Glycerol bis zu 77 % beim Oxalacetat. Der Citratzyklus in Kombination mit Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung stellt daher bei allen Substraten die Energieversorgung sicher.

Im Fall von Laktat und Alanin fallen 92.81 % des erzeugten ATP auf die oxidative Phosphorylierung, die restlichen 7.19 % werden jeweils durch die mit GTP als Kofaktor arbeitende Succinat CoA Ligase gebildet. Die im GTP gespeicherte Energie kann über die Nucleotiddiphosphatekinase auf ATP übertragen werden. Bei Pyruvat sinkt der Anteil der oxidativen Phosphorylierung auf 84.77 %, bei Oxalacetat auf 76.88 %.

Die für die Synthese eines Glucosemoleküls benötigte ATP Menge variiert in Abhängigkeit vom Substrat sehr stark.

Im Fall von Glycerol werden nur 2 ATP benötigt und zwar für die Phosphorylierung des Glycerols durch die Glycerokinase. Die 2 ATP können mittels des in der Glycerol-3P Dehydrogenase erzeugten NADH in der oxidativen Phosphorylierung erzeugt werden³.

Glycerol kann nicht nur den notwendigen Energiebedarf für die Gluconeogenese decken, sondern ist in geringem Umfang sogar in der Lage Energie in der Gluconeogenese für zelluläre Prozesse bereitzustellen. Bei den verwendeten P/O Quotient von 2.3 in dem Modell können aus dem 1 NADH der Glycerol-3 Phosphat Dehydrogenase 2.3 ATP erzeugt werden. Allerdings werden nur 2 ATP für die Synthese eines Glucosemoleküls aus 2 Glycerol benötigt. 0.774 NADH werden in der oxidativen Phosphorylierung zu den 2 notwendigen ATP für die Gluconeogenese, die Reduktionsenergie der restlichen 0.226 NADH werden über die mitochondriale Glutamin Dehydrogenase, die sowohl NADH und NADP als Kofaktor verwenden kann auf NADPH übertragen und stehen für die Zelle als Reduktionspotential bereit, z.B. für reduktive Biosynthesen.

Ausgehend vom Oxalacetat werden 4 ATP benötigt, bei Pyruvat 6 und beim Alanin sogar 11.68 ATP für die Synthese eines Glucosemoleküls.

Gluconeogenese ausgehend von Alanin ist im Vergleich zu den anderen getesteten Substraten energetisch sehr aufwendig, da neben den Kosten für die Gluconeogenese die Detoxifizierung des NH₃⁴ zusätzlich hohe Energiekosten verursacht.

NH₃ entsteht dabei bei der Umsetzung von Alanin zu Pyruvate. ALT überträgt die NH₃ Gruppe zunächst von Alanin auf α-Ketoglutarat unter der Bildung von Glutamat. Das NH₃ wird schließlich aus dem Glutamat durch die mitochondriale Glutamat Dehydrogenase freigesetzt. Die Entgiftung erfolgt über den Harnstoffzyklus. Dabei wird Urea gebildet, welches ans Blut

³Für sämtliche Simulationen wurden P/O Quotienten von 2.3 für NADH und 1.4 für FADH₂ verwendet. Siehe ausführliche Fußnote in den Simulationen zur aeroben und anaeroben Glykolyse.

⁴NH₃ liegt unter physiologischen Bedingungen in der Zelle nahezu vollständig als NH₄⁺ vor, wird aber in allen Reaktionsgleichungen und auch in der Diskussion als NH₃ bezeichnet.

abgegeben wird. Harnstoffzyklus und Ammoniakentgiftung treten nur in der Flusslösung zur Gluconeogenese ausgehend von Alanin auf. Die übrigen untersuchten Substrate besitzen keine Stickstoffatome.

Der Harnstoffzyklus ist energetisch aufwendig: 1 ATP wird in der Argininosuccinat Synthase Reaktion verbraucht, ein weiteres in der Adenylatkinase, welches AMP zu ADP umwandelt. Weitere 3.68 ATP benötigt ist die Carbamoylphosphat Synthase. Somit sind insgesamt 5.68 zusätzliche ATP für die Ammoniakentgiftung notwendig und erklären die große Menge an ATP die im Mitochondrium bei der Verwendung von Alanin erzeugt werden muss (11.68). Für Pyruvat als Substrat, dem die NH₃ fehlt, werden entsprechend nur 6 ATP benötigt.

Da die Energie v.a. durch die oxidative Phosphorylierung bereitgestellt wird spiegeln sich die energetischen Kosten der unterschiedlichen Substrate auch in dem unterschiedlichen Sauerstoffverbrauch wieder. Alanin benötigt am meisten Sauerstoff (2.52) gefolgt von Pyruvate (1.28), Laktat (1.21), Oxalacetate (0.85) und Glycerol (0.43).

Je nach Substrat unterscheidet sich der Anteil an ATP Verbrauch im Zytosol und Mitochondrium.

Bei Glycerol und Oxalacetat wird das für die Gluconeogenese notwendige ATP vollständig im Zytosol verbraucht. Im Fall von Glycerol für die Glycerokinase, im Fall von Oxalacetat für die PEPCK und die PGK. Beim Oxalacetat wird im Gegensatz zu Laktat, Alanin und Pyruvat kein ATP in der PC Reaktion verbraucht, da Oxalacetat als Substrat vorhanden ist und nicht aus Pyruvat erzeugt werden muss. Im Gegenteil, über den Umweg des zytosolischen Malic Enzyme muss Pyruvat aus Oxalacetat gebildet werden. Das Pyruvat ist im Falle von Oxalacetat als Substrat notwendig, um über PDH und CS als Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingespeist zu werden.

Bei Laktat wird 64.27 % der Energie im Mitochondrium für die mitochondriale PEPCK und die PC Reaktion, die übrigen 35.73 % im Zytosol für die PGK. Im Fall von Laktat werden umgekehrt ein Drittel des ATP im Mitochondrium verbraucht (33.33 %) für die PC, im Zytosol die restlichen zwei Drittel (66.67 %) für die zytosolische PEPCK und die PGK. Im Fall von Alanin werden 57.19 % der Energie im Mitochondrium für PEPCK, PC und CPS verbraucht, 42.81 % im Zytosol für PEPCK, ASS, Adenylatkinase und PGK.

Die im Mitochondrium erzeugte ATP Energie muss für die energieverbrauchenden Reaktionen im Zytosol aus dem Mitochondrium transportiert werden. Dies geschieht in allen Simulationen ausschließlich über ANT im Gegentausch mit ADP.

Der Transport der Reduktionsenergie zwischen Zytosol und Mitochondrium spielt bei allen untersuchten Vorstufen eine wichtige Rolle. Da keine Transporter in der inneren Mitochondrienmembran für NADH und NAD⁺ existieren, muss die Reduktionsenergie auf anderem Wege zwischen Mitochondrium und Zytosol transportiert werden.

Wenn ein Überschuss an NADH im Zytosol vorhanden ist (wie im Fall von Glycerol und Laktat) wird Oxalacetat durch die zytosolische MDH zu Malat reduziert, wobei NADH zu NAD⁺ und H₊ oxidiert wird. Malat wird über den Malatshuttle ins Mitochondrium transportiert. Dort

findet die Rückreaktion von Malat zu Oxalacetat durch die mitochondrialen MDH statt, die Reduktionsenergie wird als mitochondriales NADH gespeichert. Wenn Reduktionsenergie in Form von NADH dagegen aus dem Mitochondrium ins Zytosol transportiert werden muss, wie im Fall von Alanin, Pyruvate und Oxalacetat, da dieses für die GAPDH benötigt wird, arbeitet der Malatshuttle und die zytosolische und mitochondriale MDH in entsprechend umgekehrter Richtung (s.2.3.3).

Das bei Laktat als Vorstufe im Zytosol gebildete NADH durch LDH wirkt sich auch auf die PEPCK Reaktion aus. Wenn genügend NADH im Zytosol vorhanden ist, wird das für die Gluconeogenese benötigte PEP vollständig mittels der mitochondrialen Isoform der PEPCK erzeugt und anschließend ins Zytosol transportiert.

Im Fall von Pyruvat und Oxalacetat als Vorstufe, wird dagegen ausschließlich die zytosolische PEPCK zur Synthese von PEP verwendet. Das Oxalacetat für die PEPCK Reaktion ist durch die Nutzung des Malatshuttels für den Transport von NADH ins Zytosol bereits im Zytosol vorhanden und kann dort für die Synthese von PEP verwendet werden.

Im Fall von Glycerol muss kein PEP synthetisiert werden, da Glycerol erst deutlich später in die Gluconeogenese eingespeist wird.

Bei Alanin wird in der Flusslösung die zytosolische und mitochondriale PEPCK zu gleichen Teilen verwendet. Die Ursache ist, dass ein Teil des zytosolischen Oxalacetats für andere Reaktionen verwendet wird. Durch die zytosolische MDH werden 2 Oxalacetat erzeugt, allerdings wird nur 1 Oxalacetat durch die PEPCK zu zytosolischem PEP umgewandelt. Das andere Oxalacetat wird für die Aspartat Transaminase (AST) verwendet, welches mit Glutamin als weiterem Substrat, Aspartat und α -Ketoglutarat bildet. Aspartat wird in der Alaninlösung für die Argininosuccinat Synthase im Harnstoffzyklus benötigt. Das zweite PEP über die mitochondriale PEPCK synthetisiert und anschließend ins Zytosol transportiert.

Die Lösung ausgehend von Oxalacetat ist sehr ähnlich zur Lösung basierend auf Pyruvat. Einziger großer Unterschied ist, dass Pyruvat für den Citratzyklus erzeugt werden muss, welches mittels Malic Enzyme im Zytosol erzeugt. Oxalacetat, sowie Fumarat werden aus dem Mitochondrium über Shuttle-Systeme ins Zytosol transportiert. Malat kann zu Pyruvat durch das Malic Enzyme unter der Reduktion von NADP^+ zu NADPH decarboxyliert werden. Dieser recht aufwendige Weg über zwei Kompartimente muss gegangen werden, da auf Grund der Irreversibilität der PC diese Reaktion nicht einfach umgekehrt werden kann, um Pyruvat aus Oxalacetat zu erzeugen. Daher muss eine alternativer Weg verwendet werden.

Der Fluss durch das Malic Enzyme entspricht dem Fluss durch die Succinat CoA Ligase (0.92), da alles Pyruvat, dass über das ME erzeugt wird vollständig als Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingespeist wird und dort bis zum Fumarat oxidiert wird. Das ME erzeugt gerade soviel Pyruvat wie für die Energieversorgung mittels oxidativer Phosphorylierung notwendig ist.

Im Fall von Laktat, Alanin und Pyruvat stellt sich jeweils das umgekehrte Problem. Pyruvat ist vorhanden, aber das notwendige Oxalacetat für die Gluconeogenese muss zunächst erzeugt

werden. Bei diesen Substraten findet man einen hohen Fluss durch die PC (Laktat 1.6, Alanin 2, Pyruvat 2), um unter ATP Verbrauch das notwendige Oxalacetat zu erzeugen.

Auch das gebildete CO₂ variiert stark mit den Substraten.

Im Fall von Laktat wird 1.21 CO₂ erzeugt. Bei Alanin wird am wenigsten CO₂ (0.68) ins Blut exportiert, da ein Teil für die Urea-Synthese durch die CPS in Form von HCO₃⁻ verbraucht wird. Bei Oxalacetat werden 5.7 CO₂ gebildet. Dieser hohe Wert für Oxalacetat liegt an den ME und PC Reaktionen. Einerseits findet im Vergleich zu Pyruvat, Alanin und Laktat eine erhöhte CO₂ Produktion durch die decarboxylierende ME statt, andererseits keine CO₂ Fixierung durch die PC.

Bei der Gluconeogenese ausgehend von Glycerol wird kein CO₂ gebildet, da keine decarboxylierende Reaktionen Bestandteil der Flusslösung sind.

Jedes Substrat für die Gluconeogenese hat seine eigenen Besonderheiten, die sich in der Flusslösung widerspiegeln. Alanin muss Ammoniak über den Harnstoffzyklus entgiften. Glycerol muss erst auf Höhe der Aldolasereaktion in die Gluconeogenese eingespeist werden und kann den Energiebedarf der Gluconeogenese vollständig über die vorbereitenden Reaktionen zum DHAP decken. Laktat liefert zytosolisches NADH über die LDH, was nicht erst aus dem Mitochondrium über den Malatshuttle ins Zytosol transportiert werden muss. Oxalacetat muss erst das für den Citratzyklus notwendige Pyruvat über das Malic Enzyme erzeugen.

Das metabolische Netzwerk des Hepatozyten ist in der Lage alle diese substratspezifischen Erfordernisse zu bewerkstelligen. Einerseits tritt eine hohe Flexibilität des Metabolismus in den Lösungen zu Tage. Ausgehend von sehr unterschiedlichen äußeren Bedingungen (verschiedene Substrate für die Gluconeogenese) ist der Hepatozyt in der Lage ein Ziel zu erfüllen, die Gluconeogenese. Die dabei auftretenden Flusslösungen unterscheiden sich auf der einen Seite sehr stark (v.a. Glycerol im Vergleich zu den anderen Substraten). Aber auf der anderen Seite sind auch gemeinsame Prinzipien erkennbar. Wie, die Energieversorgung über die oxidative Phosphorylierung, Malatshuttle zum Austausch der Reduktionsenergie zwischen Zytosol und Mitochondrium und ANT zum Austausch von ATP und ADP oder Umwandlung der Vorstufen zum Oxalacetate und PEP (außer Glycerol). Gerade diese Flexibilität ist im Hepatozyten erforderlich, der Abhängig von der Nahrungsaufnahme, Nahrungszusammensetzung und dem Zustand des Organismus (z.B. starke Muskelarbeit) sehr unterschiedliche Metabolitzusammensetzungen des Blutes vorfindet.

Normalerweise wird der Energiebedarf der Gluconeogenese im Hepatozyten durch Fettabbau gedeckt, um die wertvolleren Vorstufen (C3) zu sparen. In den Simulationen wurde jeweils nur das gluconeogene Substrat als Vorstufe vorgegeben. In FBA Simulationen, in denen zusätzliche auch Fettsäuren verwendet werden konnten, lieferte die β -Oxidation die Energie, die gluconeogenen Substrate wurden vollständig zur Gluconeogenese verwendet.

2.3.4 Diskussion

FBA zur funktionellen Validierung Das rekonstruierte Modell des Kernhepatozyten kann die in den Simulationen definierte Funktionalität vollständig erfüllen (Tab. A.1). Alle Simulationen verlaufen erfolgreich und die dabei auftretenden Lösungen sind biochemisch plausibel. Die Flusslösungen haben eine sehr große Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Stoffwechselwegen zur Realisierung der jeweiligen Funktionalität.

Für die Qualität und Nutzen des Modells spricht, dass zur Definition der Einzelsimulationen jeweils nur sehr wenige Nebenbedingungen vorgegeben werden mussten. In nahezu allen Funktionalitätstests ist es ausreichend den gewünschten Zielfluss, sowie die mit dem Blut austauschbaren Metaboliten festzulegen. Die Flusslösung wird daher allein durch Vorgabe der Blutzusammensetzung, d.h. die für die Aufnahme durch den Hepatozyten vorhandenen Metabolite, sowie durch die vorgegebene Aufgabe des Hepatozyten (Zielfluss) bestimmt. Das Modell hat daher die selben Stellgrößen wie der reale Hepatozyt, der wie das Modell unter vorgegebener Blutzusammensetzung bestimmte interne Aufgaben erfüllen muss, wie beispielsweise Glucose über Gluconeogenese bereitstellen.

Durch sehr wenige Stellgrößen kann das Hepatozytenmodell ein breites Spektrum unterschiedlicher Funktionalitäten biochemisch plausibel realisieren.

Die Flusslösungen im Hepatozytenmodell stimmen sehr gut mit den in der Literatur beschriebenen Stoffwechselwegen und Reaktionsfolgen für die jeweilige Funktionalität überein. Beispiele sind die vorgestellten Flusslösungen zur Abbau der Glucose in Abhängigkeit vom vorhandenen Sauerstoff, die Untersuchung des PPP und die Simulationen zur Gluconeogenese. Charakteristische Eigenschaften der auftretenden Lösungen sind in der Literatur beschrieben und experimentell gezeigt worden. Beispielsweise der über 10-fache Anstieg der aufgenommenen Glucosemenge beim Umschalten von aeroben auf anaerobe Bedingungen und das Auftreten von Laktat (Pasteureffekt) [42]. Weiteres Beispiel ist die Verwendung der unterschiedlichen PEPCK Isoformen in Mitochondrium und Zytosol je nach verwendetem glucogenem Substrat [42].

Bei den durchgeföhrten FBA Simulationen muss berücksichtigt werden, dass die jeweilige Funktionalität isoliert getestet wurde. Die erfolgreichen Simulationen zeigen, dass das Modell in der Lage ist die Einzelaufgaben zu erfüllen. Der reale Hepatozyt muss allerdings nicht nur eine isolierte Aufgaben erfüllen, sondern zeitgleich sehr viele unterschiedliche Funktionalitäten bereitstellen, wie beispielsweise Energieversorgung der Zelle, Proteinsynthese, Bewältigung von oxidativem Stress und vieles mehr. Die Simulationen zum Test der isolierten Funktionalität spiegeln daher nur zum Teil die in der Zelle realisierten Flusslösungen wieder. Um einen realistischen Eindruck von der internen Flussverteilung zu bekommen, müsste man zusätzlich zu der zu testenden Funktionalität weitere basale Aufgaben in der Form von Zielflüssen definieren, die die ständigen zellulären Belastung widerspiegelt.

Erst durch die Analyse der Einzelaufgaben und der zugehörigen Flusslösungen ist man in der Lage komplexere Aufgaben zu verstehen und zu analysieren. So müssen beispielsweise zunächst die Lösungen zur Synthese der nicht-essentiellen Aminosäuren aus dem minimalen Austauschset funktionieren und biochemisch plausibel sein, bevor man die Synthese eines Beispielproteins verstehen kann, welche auf der Synthese der nicht-essentiellen Aminosäuren beruht.

Komplexere Aufgaben setzen sich aus einfacheren Aufgaben zusammen, wie deutlich im Fall der sauerstoffabhängigen Energieerzeugung aus Glucose deutlich wurde. Hier kann die Fragestellung zum Glucoseverbrauch unter verschiedenen hypoxischen Bedingungen auf die anaerobe und aerobe Fragestellung zurückgeführt werden. Durch die Simulationen der Einzelaufgaben gelangt man schrittweise zu einem Verständnis der real in der Zelle existierenden Flussverteilungen.

FBA in der Netzwerkrekonstruktion Die FBA war ein wesentliches Werkzeug für die Netzwerkrekonstruktion. Durch die Flusssimulationen konnte das konzertierte Zusammenspiel der einzelnen Netzwerkelemente untersucht und die daraus gewonnenen systemischen Eigenschaften zur lokalen Verbesserung der Netzwerkrekonstruktion verwendet werden. Durch die FBA Simulationen war es möglich Probleme und Fehler in dem Netzwerk zu beseitigen, die durch Kuratierung der Einzelreaktionen und -transporter nicht offensichtlich waren.

Beispiele solcher systembasierten Informationen sind Flusslösungen, die kurze ATP erzeugende Zyklen enthalten. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass mindestens eine der Reaktionen in dem Zyklus unter zellulären Bedingungen irreversibel in Umkehrrichtung verläuft. Durch Analyse der Flusslösung und zusätzliche Recherche konnten alle diese Zyklen schnell aus dem Modell beseitigt werden.

Weitere Beispiele sind Flusslösungen, die Reaktionen verwendeten, die ausdrücklich in der Literatur für die vorgegebene Funktionalität ausgeschlossen werden. In diesen Fällen existiert zumeist entweder ein alternativer Reaktionsweg im Hepatozyten oder ein starker regulatorischer Effekt, der die Reaktion in der Zelle unter den notwendigen Voraussetzungen für die Simulation stark inhibiert. Ein Beispiel sind die Simulationen zur Ketonkörpersynthese. Diese finden nur statt, wenn die Oxalacetatkonzentration sehr gering ist und das vorhandene Acetyl-CoA auf anderem Wege als im Citratzyklus verwendet werden muss. Die Citrat Synthase findet unter diesen Bedingungen nicht statt, da Oxalacetat als Substrat für die CS nicht vorhanden ist.

Erst durch die FBA Simulationen wurde aus der Netzwerkrekonstruktion ein funktionelles Modell, dass qualitativen prädiktiven Charakter besitzt.

Experimentelle Validierung Zur Validierung, ob das aufgestellte Modell auch quantitative Vorhersagen erlaubt, sind experimentelle Flussdaten für den humanen Hepatozyten notwendig. Einerseits sind die Austauschflüsse zwischen Hepatozyt und Blut erforderlich, andererseits die Messung interner Flüsse. Erst durch den Vergleich der experimentellen Daten mit den Vorhersagen, kann die Qualität der Flussverteilungen in dem Netzwerk validiert werden.

Leider waren keine solche Flussdaten vorhanden. Für kleinere Netzwerke wurde der Abgleich zwischen FBA Flüssen und experimentellen Daten durchgeführt und es konnten gute Übereinstimmung zwischen den Flusslösungen der Flussminimierung und kinetischen und experimentellen Arbeiten gefunden werden [19].

Einschränkungen der FBA Die FBA ist eine Methode zur Untersuchung der Flussverteilung in großen metabolischen Netzwerken. Allerdings hat die Methode auch ihre Grenzen:

Skalierung der Lösungen Wenn in den FBA Simulationen für die Reaktionen und Transporter keine obere Schranke definiert wird, dann skalieren die Lösungen mit den für die Simulation vorgegebenen Nebenbedingungen. Dies ist beispielsweise in den Simulationen zum aeroben Abbau der Glucose der Fall. Je mehr Sauerstoff vorhanden ist, desto stärker wird der Fluss durch sämtliche Reaktionen der aeroben Flusslösung und damit der Anteil der aeroben Flusslösung an der Gesamtlösung.

In der Zelle spielen allerdings viele beschränkende Faktoren eine Rolle. So stellen alle Enzyme nur eine begrenzte maximale Kapazität für die jeweils katalysierte Umsetzung zur Verfügung. Daher existiert für alle Reaktionen ein maximaler Fluss durch die entsprechende Reaktionen, der von der vorhandenen Enzymkonzentration aber auch der Kinetik der Reaktion abhängt. Die Enzyme mit der geringsten Flusskapazität bestimmen entscheidend die Flussverteilung in dem Netzwerk, da sie die Engpässe darstellen. Diese Flussbeschränkungen werden in den durchgeführten FBA Simulationen nicht berücksichtigt, sondern der Fluss durch alle Reaktionen ist prinzipiell unbegrenzt möglich.

Eine Erweiterung der FBA, die dieses Problem angeht ist beispielsweise die Verwendung von Expressionsdaten zur Einführung weiterer Nebenbedingungen. Allerdings müssen die Expressionsdaten nicht den Proteinkonzentrationen der Enzyme entsprechen. Weiterhin sind regulatorische Effekte, die den Fluss durch bestimmte Reaktionen beschränken nicht berücksichtigt.

Für eine detaillierteres Verständnis des Systems muss zu Ratengesetzen für die einzelnen Flüsse übergegangen werden und das Systemverhalten mittels Differentialgleichungen und kinetischer Modellierung untersucht werden.

Fliessgleichgewicht Die FBA geht davon aus, dass sich das untersuchte System im Fliessgleichgewicht befindet. Werden die Simulationsbedingungen verändert, wird ein neuer optimaler Fliessgleichgewichtszustand für die neuen Bedingungen berechnet. Aussagen über den dynamischen Übergang vom einen Zustand in den anderen sind mit der FBA nicht möglich. Hierfür sind Modelle basierend auf Differentialgleichungen notwendig.

Weiterhin sind die Fliessgleichgewichtsbedingungen nur eine Näherung. Die Annahme gilt nur, wenn die äußeren Bedingungen konstant sind bzw. sich sehr viel langsamer verändern als die Reaktionsraten der Enzyme. Unter realen Bedingungen kann die Metabolitzusammensetzung des

Blutes abhängig von physiologischen Faktoren beträchtlich variieren. Einerseits abhängig von der Nahrungsaufnahme und -zusammensetzung, andererseits auch abhängig von der Ausscheidung von Metaboliten aus dem Blut (z.B. Urea über die Niere) oder Verbrauch (z.B. Glucose bei Muskelarbeit). Um diese sich ständig verändernden Metabolitkonzentrationen zu berücksichtigen muss man zu einer kinetischen Beschreibung übergehen.

Fehlende Regulationen Weiterhin sind in der durchgeföhrten FBA keinerlei regulatorische Effekte berücksichtigt. Diese spielen in der Zelle eine entscheidende Rolle. Regulationen sind von entscheidender Bedeutung bei der Kontrolle gegenläufige Stoffwechselwege, so dass diese nicht gleichzeitig in der Zelle ablaufen. So wird in der Leber beispielsweise Gluconeogenese und Glykolyse, Fettsäuresynthese und β -oxidation, Glykogenabbau und Glykogensynthese jeweils gegenläufig reguliert. Über allosterische Effektoren und die Phosphorylierung / Dephosphorylierung von entscheidenden Enzymen der gegenläufigen Stoffwechselwege wird erreicht dass jeweils einer der beiden Stoffwechselwege in der Zelle dominiert.

Eine reine entweder/oder Entscheidung kann man über zusätzliche Nebenbedingungen in die FBA einbauen und dieser Ansatz wurde auch für einige der Simulationen verwendet (Glykogen-synthese, Glykogenabbau).

Um allerdings regulatorische Effekte einzubeziehen, die von der jeweiligen Konzentration der Regulatormetabolite abhängen, muss man zu einer kinetischen Beschreibung des Systems übergehen. Hier können die Regulationseffekte in den Ratengleichungen berücksichtigt werden.

Mittels FBA erhält man sehr viele Informationen über das untersuchte metabolische Netzwerk und dessen metabolische Fähigkeiten. Allerdings hat die Methode auch klar ihre Grenzen. Um zu einem Verständnis des dynamischen Verhaltens des Systems zu gelangen und um konzentrationsabhängige Regulation zu berücksichtigen, muss man zu einer kinetischen Beschreibung des Modells übergehen.

Kapitel 3

Kinetisches Modell der humanen Glykolyse, Gluconeogenese und des Glykogenstoffwechsels

3.1 Einleitung

3.1.1 Glucosehomöostase

Die Blutglucosekonzentration ist starker Regulation unterworfen. Sie liegt normalerweise innerhalb eines engen Bereiches, obwohl einerseits große Schwankungen in der Glucoseversorgung auftreten (Mahlzeiten) und andererseits der Glucosebedarf des Körpers stark variieren kann (z.B. Muskelarbeit).

In Erwachsenen liegen die arteriellen Werte im Laufe eines Tages im Mittel bei ~ 5 mM. Die maximale Konzentration wird postprandial erreicht und übersteigt gewöhnlicherweise nicht 9 mM (Abb. 3.4). Die minimale Konzentration wird bei längerem Fasten oder während intensiver Muskelarbeit erreicht und fällt dabei gewöhnlich nicht unter ~ 3 mM (s. Abb. 3.1) [46, 47].

Diese relative Stabilität unterscheidet die Glucose von anderen Metaboliten im Plasma wie Glycerol, Laktat, freien Fettsäuren oder Ketonkörpern, die deutlich größeren Fluktuationen unterworfen sind (Abb. 3.1) [47].

Die Aufrechterhaltung der Blutglucosekonzentration in einem relativ engen Bereich ist aus zwei Gründen von entscheidender Bedeutung für den Organismus:

Erstens muss die Versorgung von Zellen und Gewebe, die auf Glucose zur Energieversorgung angewiesen sind, gewährleistet werden (z.B. Gehirn oder Erythrozyten). Das Gehirn ist der wesentliche Glucoseverbraucher (Abb. 3.2) und verwendet im gesättigten oder postabsorptiven Zustand

	Overnight fast (12–16 h)	Moderate fast (30–60 h)	Prolonged fast (> 1 week)
<i>Substrates (mmol/l)</i>			
Glucose	5.0	4.0	3.0
Free fatty acids	0.5	1.0	1.5
Glycerol	0.05	0.1	0.2
3-Hydroxybutyrate	0.02	0.5	1.0
Lactate	0.8	0.8	0.7
Glutamine	0.6	0.5	0.4
Alanine	0.3	0.2	0.2
<i>Hormones</i>			
Insulin (pmol/l)	60	40	20
Glucagon (ng/l)	100	150	150
Cortisol (mmol/l)	0.3	0.5	0.9
Growth hormone (ng/l)	<2	4	8
Triiodothyronine (nmol/l)	1.8	1.6	0.9
Epinephrine (nmol/l)	0.2	0.4	0.6

Abbildung 3.1: Plasma Metabolite und regulatorische Hormone nach Übernachtfasten, moderatem Fasten und längerem Fasten (aus [47]). Die Glucosekonzentration variiert nur wenig und fällt auch bei längerem Fasten nicht unter 3 mM. Glycerol, 3-Hydroxybutyrat und freie Fettsäuren sind deutlich stärkeren Schwankungen unterworfen. Auffallend sind die starken Veränderungen in den Konzentrationen der Hormone Insulin und Glucagon. Insulin sinkt mit der Fastendauer und sinkender Glucosekonzentration immer weiter ab, wohingegen die Konzentration an Glucagon vom Übernachtfasten zum moderaten Fasten und bei sinkender Glucosekonzentration ansteigt.

nahezu ausschließlich Glucose zur Energieversorgung ($\sim 117\text{--}142$ g/Tag) [46, 48, 49]. Hypoglyämische Bedingungen müssen daher unter allen Umständen vermieden werden.

Der zweite wesentliche Grund ist die Toxizität der Glucose bei hyperglyämischen Bedingungen [50, 51]. So stehen Proteinmodifikationen durch Glucose [52], Glucose induzierte oxidative Probleme sowie andere Glucose vermittelte Effekte in einem klaren Zusammenhang mit zu hohen Blutglucosekonzentrationen, wie sie beispielsweise bei Menschen mit schlecht kontrollierter Diabetes auftreten [53, 54].

Die Blutglucosekonzentration muss daher in einem recht engen Bereich kontrolliert werden, um einerseits die Glucoseversorgung sicherzustellen, andererseits die toxischen Effekte bei zu hohen Glucosekonzentrationen zu vermeiden.

3.1.2 Rolle der Leber in der Glucosehomöostase

Um den Blutglucosespiegel konstant zu halten, müssen Änderungen in den Raten der Glucosezufuhr in die systemische Zirkulation durch vergleichbare Änderungen in den Raten der Gluco-

seentnahme kompensiert werden und umgekehrt Veränderungen in der Glucoseentnahme durch Änderungen in der Glucosezufuhr ausgeglichen werden.

Die Leber spielt im Kohlenhydratstoffwechsel und in der Glucosehomöostase eine zentrale Rolle. Einerseits ist sie in der Lage Glucose für die Blutzirkulation zu produzieren, d.h. mittels Gluconeogenese und Glykogenolyse Glucose für die Zirkulation bereitzustellen (hepatic glucose production - HGP), andererseits ist sie auch an der Glucoseaufnahme postprandial und unter hyperglycämischen Bedingungen beteiligt (hepatic glucose utilisation - HGU). Die Leber kann also sowohl Glucoseproduzent, als auch Glucoseverbraucher sein [10].

Postprandial, wenn die Blutglucosekonzentration in Folge aufgenommener Nahrungsglucose erhöht ist, ist die Leber in der Lage einen Teil der Glucose aufzunehmen. Die HGP sowie hepatische Glykogenolyse sind stark reduziert [46]. Die aus der Zirkulation entfernte Glucose wird als Glykogen gespeichert oder durch Glykolyse metabolisiert [55, 56].

Der Großteil der Glucose wird in extrahepatischen Geweben und dabei v.a. im Muskel aus der Blutbahn entfernt [57]. Aber auch adipöses Gewebe und die inneren Organe spielen eine Rolle bei der Glucoseentfernung aus der Blutbahn [56, 47].

Im übernacht postabsorptiven Zustand erfolgt die HGP einerseits durch Glykogenolyse, der Freisetzung von Glucose aus Glykogenspeichern, und andererseits durch Gluconeogenese, der Neubildung von Glucose aus Vorstufen wie Laktat, Pyruvat, Glycerol, Aminosäuren und Intermediaten des Citratzyklus (TCA).

Die relativen Beiträge von Glykogenolyse und Gluconeogenese zur Aufrechterhaltung der Glucose Homöostase variieren mit der Zeit. Während die Glykogenolyse in den ersten Stunden nach der Nahrungsaufnahme hauptsächlich auftritt, hat die Gluconeogenese einen größeren Beitrag bei längerem Fasten [57]. Zwischen Mahlzeiten, während langer Fastenzeiten oder während starker Muskelarbeit werden die Glykogenspeicher geleert. In diesen Zeiten muss der Organismus in der Lage sein Glucose aus gluconeogenen Vorstufen zu synthetisieren, die Gluconeogenese wird zur einzigen Quelle der HGP.

Nach 12 - 14h Übernachtfasten wird die Glucose der HGP zu ungefähr gleichen Teilen aus Glykogenolyse und Gluconeogenese bereitgestellt. Mit längerem Fasten nimmt der Anteil der Glucose aus Glykogen an der HGP ab (die Glykogenspeicher leeren sich) bis nach 60h Fasten die Gluconeogenese nahezu vollständig die Glucose für die Blutzirkulation generiert (Abb. 3.2) [46, 47, 58].

Die im Menschen als Glykogen gespeicherte Energiemenge ist sehr viel geringer als die im Fett gespeicherte (Triazylglycerole), allerdings können im Menschen die Fettsäuren nicht zu Glucose umgewandelt werden, wodurch diese nicht zur HGP zur Verfügung stehen [42].

Die Leber ist das zentrale Organ der Gluconeogenese. Bei längerem Fasten kann auch die Niere bis zu 10% der Glucose, die durch Gluconeogenese erzeugt wird, beisteuern, unter normalen Bedingungen sind diese Beiträge allerdings sehr gering (0-5%) (Abb. 3.2). Andere Organe und

	Overnight fast (12–16 h)	Moderate fast (30–60 h)	Prolonged fast (> 1 week)
<i>Overall glucose production*</i>	10(100)	7.5(100)	5.0(100)
Hepatic output	10(100)	7.1(95)	4.5(90)
Glycogenolysis	5.0(50)	0.4(15)	0(0)
Gluconeogenesis	5.0(50)	6.7(90)	4.5(90)
Renal gluconeogenesis	0(0)	0.3(5)	0.5(10)
<i>Overall glucose utilization*</i>	10(100)	7.5(100)	5.0(100)
Brain	5.0(50)	4.4(60)	3.5(70)
Splanchnic tissues	1.5(15)	0.9(12)	0.3(6)
Muscle	1.5(15)	0.8(10)	0.3(6)
Blood cells, skin	1.0(10)	0.8(10)	0.6(12)
Renal medulla	0.5(5)	0.4(5)	0.2(4)
Adipose tissue	0.5(5)	0.2(3)	0.1(2)

* $\mu\text{mol}/\text{kg}$ per min (percent of total).

Abbildung 3.2: Zusammenfassung der normalen Glucosehomöostase nach Übernachtfasten, moderatem und verlängertem Fasten (aus [47]). Die HPG ist hauptverantwortlich für die Glucoseproduktion. Die renale Gluconeogenese spielt nur eine sehr untergeordnete Rolle. Mit zunehmender Fastendauer wird der Beitrag der Glykogenolyse zur HGP immer geringer. Das Gehirn ist der Hauptglucoseverbraucher, bei längerem Fasten steigt der Anteil am Glucoseverbrauch an. Der Absolutverbrauch an Glucose sinkt mit längerem Fasten, die Ketonkörper decken den Restbedarf.

Gewebe spielen nach derzeitigen Wissensstand keine Rolle bei der Gluconeogenese (s. [59] für Review).

Die Leber ist somit der einzige Glucoseproduzent außer in zwei Situationen: (1) nach längerem Fasten, wenn die Niere bis zu 10% der Glucose liefern kann oder (2) nach Mahlzeiten wenn Glucose aus der Nahrung in die Blutbahn aufgenommen wird [47, 60].

Die wichtigsten gluconeogenen Vorstufen nach Übernachtfasten sind Laktat, Glutamin und Alanin, die zusammen über 80% der Substrate der Gluconeogenese bilden. Laktat ist dabei die Hauptvorstufe, die nach Übernachtfasten für 60% der Gluconeogenese verantwortlich ist, bei längerem Fasten immer noch für 35% (s. Abb. 3.3) [47].

Laktat spielt insbesondere im Cori-Zyklus eine Rolle. Bei Glykolyse unter anaeroben Bedingungen wird Laktat gebildet (z.B. bei Muskelarbeit), welches an die Blutbahn abgegeben wird. Dieses kann von der Leber aufgenommen durch Gluconeogenese wieder zu Glucose regeneriert werden, welche von der Leber an die Blutbahn abgegeben wird (HGP) und damit den peripheren Geweben wieder zur Verfügung steht.

Die Anlieferung von gluconeogenen Vorstufen zur Leber kann raten-limitierend für die Gluconeogenese sein. Ein Abfall wie in der Maple syrup urine disease und renaler Insuffizienz kann die

Gluconeogenesis from	Overnight fast (12–16 h)	Moderate fast (30–60 h)	Prolonged fast (> 60 h)
Gluconeogenesis*	5.0	7.0	5.0
Lactate*	3.0(60)	2.5(35)	1.7(34)
Glutamine*	0.8(16)	1.4(20)	0.5(10)
Alanine*	0.7(14)	1.1(16)	0.5(10)
Other amino acids*	0.3(6)	1.1(16)	0.5(10)
Glycerol*	0.2(4)	0.9(12)	1.9(36)

* $\mu\text{mol/kg per min}$ (percent of total).

Abbildung 3.3: Bildung von Glucose aus verschiedenen gluconeogenen Vorstufen (aus [47]). Laktat ist die wichtigste Vorstufe der Gluconeogenese. Mit zunehmender Fastendauer gewinnt Glycerol immer mehr an Bedeutung.

Gluconeogenese und die HGP reduzieren [47]. Ein weiterer Anstieg von gluconeogenen Vorstufen muss allerdings nicht notwendigerweise zu einer erhöhten Gluconeogeneserate führen [47, 61].

3.1.3 Regulationmechanismen

Um den Blutglucosespiegel innerhalb eines Normalbereichs zu halten, muss der Hepatozyt in der Lage sein zwischen HGP und HGU umzuschalten. Die Steuerung erfolgt dabei durch Mediatoren und Hormone, von denen Insulin und Glucagon eine Schlüsselrolle innehaben [57]. Weiterhin spielt die Glucosekonzentration selbst eine entscheidende Rolle, da diese direkt als Signal wirkt, aber auch die Ausschüttung von Insulin und Glucagon beeinflusst/steuert.

Die Umschaltung zwischen HGP und HGU wird durch verschiedene Mechanismen, die auf unterschiedlichen Zeitskalen wirken, erreicht [56]:

1. schnelle allosterische Regulation
2. Regulation durch interkonvertierbare Enzyme im Minutenbereich
3. im Vergleich dazu langsame Regulation durch Veränderung der Genexpression von Schlüsselenzymen

Das Umschalten erfolgt v.a. über die reziproke Regulation derjenigen Enzyme, die charakteristisch für HGU (GK, PFK1, PK, GS) und HGP (G6PASE, FBP1, PC, PEPCK) sind.

Die Regulationsmechanismen unterscheiden sich je nach Enzym. So wird beispielsweise die PEPCK v.a. über die Genexpression reguliert, wohingegen bei der PK allosterische Regulation, Regulation durch Interkonvertierung und Regulation durch Veränderung der Genexpression auftreten.

Hormonelle Regulation durch Insulin und Glucagon Insulin und Glucagon sind die Haupthormone, die den Kohlenhydratstoffwechsel und die Glucosehomöostase der Leber kontrollieren [42]. Sowohl die Insulinkonzentration, als auch die Glucagonkonzentration sind abhängig von der Blutglucosekonzentration. Insulin ist positiv mit der Blutglucose korreliert, Glucagon zeigt negative Korrelation. Auf verschiedenen enzymatischen Schritten hat Glucagon Effekte, die die Glykolyse und Glykogensynthese (HGU) inhibieren und die Gluconeogenese und Glykogenolyse (HGP) vorantreiben, Insulin hat die entgegengesetzten Effekte [62].

Mit steigender Blutglucose steigt in gesunden Menschen auch der Insulinspiegel im Blut. Postprandial steigt die Plasmaglucosekonzentration innerhalb von 15 min an (Abb. 3.4). Durch diese Hyperglycämie wird die Insulinsekretion stimuliert (Abb. 3.5) und die Glucagonausschüttung unterdrückt [47]. Die Plasmaglucosewerte erreichen ihren Maximalwert nach 45 - 90 min und fallen anschließend innerhalb von 180 min wieder auf ein basales Level zurück. Dabei werden bei gesunden Personen im allgemeinen Blutglucosekonzentrationen von 9 mM nicht überschritten. Die Plasmainsulinkonzentration folgt dem selben zeitlichen Muster, wohingegen Plasmaglucagon den Minimalwert erst zwischen 80 und 180 min erreicht (Abb. 3.4).

Mit zunehmender Fastendauer und sinkender Blutglucosekonzentration sinkt auch die Blutinsulinkonzentration ab und die Blutglucagonkonzentration steigt an (Abb. 3.1).

In Diabetes Typ II ist der funktionelle Zusammenhang zwischen Blutglucosekonzentration und Insulin- und Glucagonkonzentration gestört (Abb. 3.4). Der Blutglucosespiegel ist deutlich erhöht, die Insulinkonzentrationen liegen deutlich niedriger und der Glucagonspiegel deutlich höher als in gesunden Personen.

Hyperglucagonämie und veränderte Insulin zu Glucagon Verhältnisse spielen eine entscheidende Rolle in der Einleitung und Aufrechterhaltung hyperglycämischer Zustände [63].

Insulin Die klassische Aufgabe des Insulin ist die Kontrolle des Glucosemetabolismus durch einen zweifachen Feedbackloop zwischen Plasmainsulin und Plasmaglucosekonzentrationen [64]. Steigende Blutglucosekonzentrationen bewirken eine erhöhte Insulinausschüttung, Insulin bewirkt eine Verringerung der HGP und eine Erhöhung der Glucose Clearance (Aufnahme von Glucose durch Gewebe wie Muskel).

Die Insulinfreisetzung wird direkt über die Blutglucosekonzentration gesteuert. Postprandialer Anstieg und interprandialer Abfall des Insulinspiegels sind eng an das Vorhandensein von Glucose gekoppelt (Abb. 3.5). Die Fähigkeit der β -Zellen glycämische Änderungen durch sofortige Erhöhung oder Erniedrigung der Insulinausschüttung zu folgen ist ein wesentlicher Faktor in der Glucosehomöostase [65, 64]. Die Insulinproduktion und -sekretion in pankreatischen β -Zellen wird durch erhöhte Blutglucosekonzentration getriggert. Die *in vivo* Dose-Response Kurve im Menschen, die die Beziehung zwischen Insulinsekretion und Blutglucosekonzentrationen beschreibt sind sigmoidal, im Bereich von 5-12 mM (90 - 220 mg/100ml) nahezu linear [66] (Abb. 3.5B).

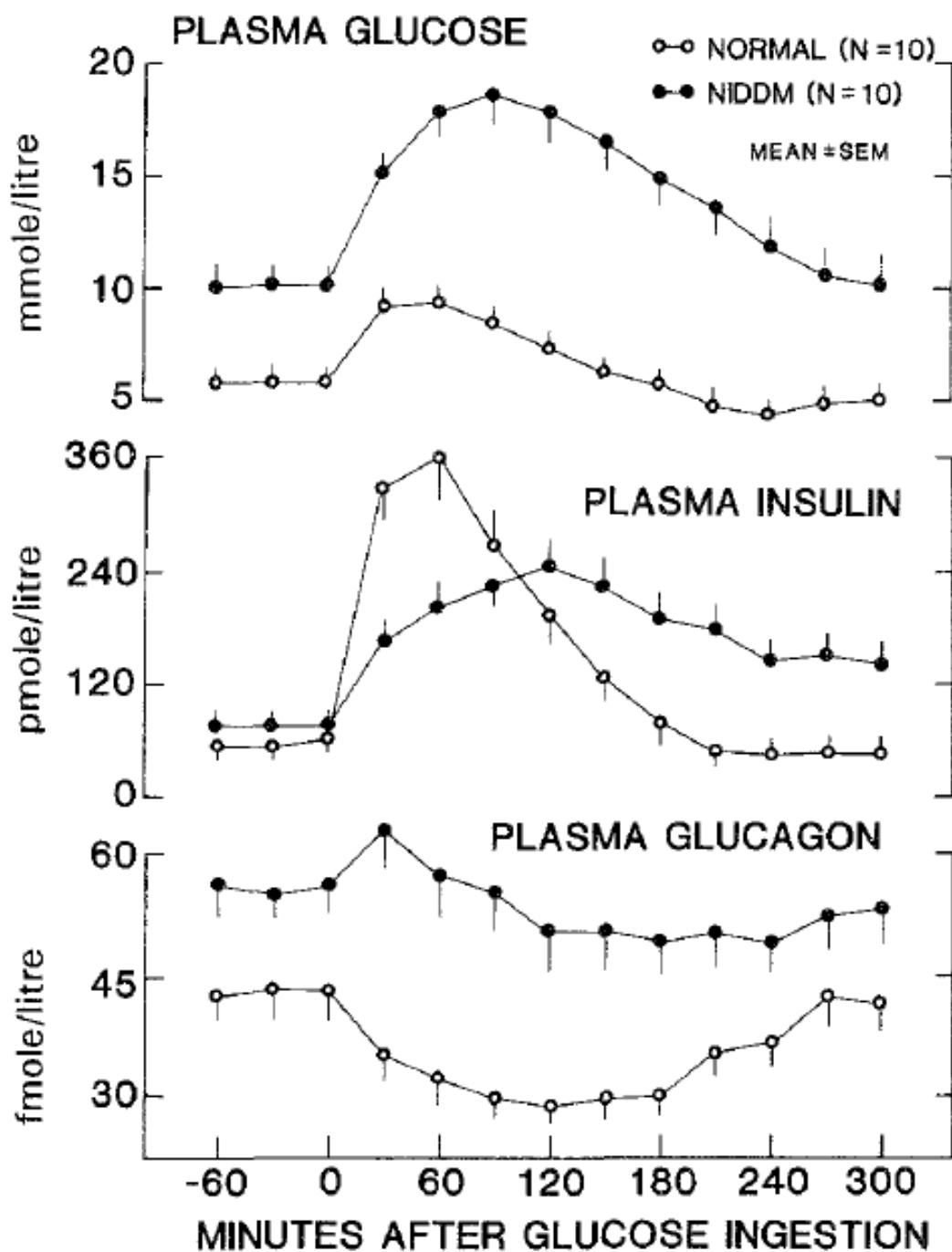


Abbildung 3.4: Veränderungen in Glucose, Insulin und Glucagon im Plasma nach Glucoseaufnahme in normalen Freiwilligen und in Patienten mit Diabetes Typ II (aus [47]). In Personen mit Diabetes Typ II ist die Blutglucosekonzentration deutlich erhöht, die Insulinantwort auf die aufgenommene Glucose erfolgt deutlich schwächer, als in gesunden Personen. Weiterhin ist der Glucagonspiegel deutlich erhöht und verändert sich kaum mit der Glucoseaufnahme.

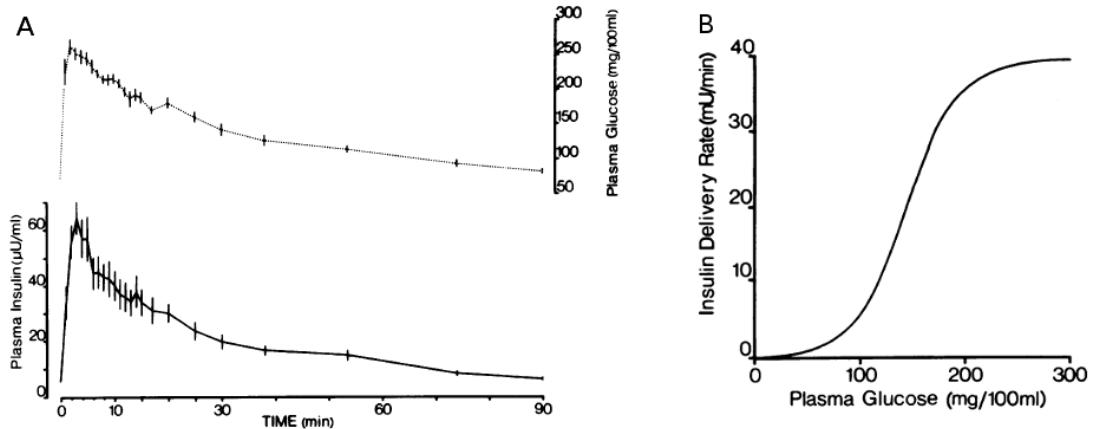


Abbildung 3.5: Zusammenhang zwischen Plasmaglucose und Plasmainsulin (aus [65]). A) Mittlere Plasma Insulin und Glucose Konzentration nach intravenöser Injektion von 0.33 g Glucose/ kg Körpergewicht wt in 17 normalen Personen. Vertikale Balken sind \pm SEM. Deutlich ist der Zusammenhang zwischen der Insulin- und Glucosekonzentration im Plasma erkennbar. B) Abhängigkeit der Insulin Ausschüttungsrate von der Plasmaglucosekonzentration. Sigmoidaler Zusammenhang mit Wendepunkt im Bereich von 150 mg/ml = 8.3 mM.

Systemische Zugabe von Insulin senkt den Blutglucosespiegel und inhibiert die HGP innerhalb von Minuten [57]. Dabei wirkt Insulin auf den hepatischen Glucosefluss über direkte und indirekte Mechanismen [67, 68].

Die direkten Effekte können weiter unterteilt werden in eine akute Insulinaktion, die zu einem raschen Absenken der HGP innerhalb von Minuten führt [64] (v.a. durch Wirkung auf interkonvertierbare Enzyme) und eine längerfristige Insulinwirkung, welche die Genexpression von Schlüsselenzymen der Gluconeogenese moduliert [69, 70, 57].

In übernacht gefasteten Hunden konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in den portalen Insulinkonzentrationen in der Abwesenheit von Veränderungen des Plasmaglucagons, freier Fettsäuren und Vorstufen der Gluconeogenese die HGP effektiv inhibiert werden konnte [62, 71]. Diese Ergebnisse bestätigend, konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Insulinlevel die suppressiven Effekte von Insulin auf HGP nicht verstärkt, was dafür spricht, dass Insulin seinen Effekt auf HGP zumindestens in Hunden hauptsächlich direkt bewirkt [57].

Im Menschen spielen unter physiologischen Bedingungen neben der direkten auch die indirekte Insulinwirkung eine Rolle [62, 57, 68]. Indirekte Effekte des Insulins auf die HGP sind die Unterdrückung der Lipolyse (Veränderungen in Substraten und Energie für die Gluconeogenese [67], sowie Veränderung von Plasma NEFA (non-esterified fatty acids) und Glycerol Konzentrationen, welche Einfluss auf die HGP haben [62, 72, 73]), die Inhibierung der Glucagonsekretion [74] und die Aktivierung von Signalen des Hypothalamus [75].

Glucagon Als ein antagonistisches Hormon des Insulin spielt Glucagon eine entscheidende Rolle in der Glucosehomöostase. Während der Fastenperiode steigt die Glucagonausschüttung durch die α -Zellen des Pankreas an (Abb. 3.1) und führt zu einem Erhöhung der Plasmaglucagonkonzentration, welche einen Anstieg des Plasmaglucose Levels bewirkt [55].

Glucagon fördert die HGP durch Erhöhung der Glykogenolyse und der Gluconeogenese und durch eine Erniedrigung der Glykogensynthese und der Glykolyse in einer konzertierten Art und Weise über verschiedene Mechanismen und erhöht so den Blutglucosespiegel [63].

Zugabe exogenen Glucagons erhöht die die Glucoselevel in gefasteten und gefütterten Tieren [76, 77] und ähnliche Ergebnisse wurden auch im Menschen erzielt [78, 79, 80]. So erhöht in normalen Subjekten intranasale Glucagon die Plasmaglucagon Level in einem Dose-Response Effekt [78]. Glucagon wird klinisch verwendet um Hypoglycämie in Menschen zu behandeln [63].

Hormonwirkung - Veränderung der Genexpression, Interkonvertierbare Enzyme

Die kurzfristigen Effekte von Glucagon und Insulin werden v.a. durch Änderungen im cAMP Spiegel und daraus resultierenden Änderung im Phosphorylierungszustand von Schlüsselenzymen bewirkt [56]. Längerfristige Veränderungen erfolgen über veränderte Genexpression von Schlüsselenzymen in Folge von Insulin und Glucagon.

Allosterische Regulation Allosterische Regulationsmechanismen spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der hepatischen Glykolyse, Gluconeogenese und des Glykogenstoffwechsels (Tab. 3.1). Von entscheidender Bedeutung sind hierbei Glucose und fru26bp.

Fru26bp ist ein potenter allosterischer Aktivator der PFK1 und ein kompetitiver Inhibitor der FBP1 [56]. Bei niedriger fru26bp Konzentration, wird die Gluconeogenese begünstigt, der Fluss durch die Glykolyse vermindert. Umgekehrt wird bei hoher fru26bp Konzentration, die Glykolyse begünstigt und die Gluconeogenese erschwert. Fru26bp kontrolliert daher wesentlich das Umschaltverhalten auf Ebene der PFK1 und FBP1.

Mit zunehmender Glucosekonzentrationen kann das glucokinase regulator protein (GKRP) die GK schlechter binden, die Menge an freier GK im Zytosol erhöht sich. Glucose führt daher zu einer positiven Feedback Aktivierung der GK, indem die Menge an freier GK erhöht wird, wodurch mehr Glucose aufgenommen werden kann, welche die Menge an freier GK weiter erhöht. Weiterhin ist Glucose ein wichtiger Inhibitor der Glykogen Phosphorylase a. Die intrazelluläre Glucosekonzentration ist daher ebenfalls ein wesentlicher Kontrollfaktor für die HGU/HGP und den Glykogenmetabolismus [81, 82, 46].

Interkonvertierbare Enzyme Die kurzfristigen Effekte von Glucagon und Insulin werden v.a. durch Änderungen im cAMP Spiegel und daraus resultierenden Veränderungen im Phosphorylierungszustand von interkonvertierbaren Enzymen bewirkt [56]. Die kovalenten Modifikationen finden innerhalb von Sekunden bis Minuten nach dem regulatorischen Signal statt [42].

Enzyme		allosteric effector	effect
GK	(Gl. 3.3)	glc	activation [83, 42]
GK	(Gl. 3.3)	fru6p	inhibition [83, 42]
PK	(Gl. 3.24)	fru16bp	activation [84, 85]
PFK1	(Gl. 3.16)	fru26bp	activation [86, 56, 87]
FBP1	(Gl. 3.17)	fru26bp	inactivation [86, 56, 88]
FBP2	(Gl. 3.15)	fru6p	inactivation [89, 90]
PC	(Gl. 3.27)	acoa	activation [40, 91]
PDH	(Gl. 3.32)	acoa	inhibition [92, 42]
GP [dp]	(Gl. 3.10)	amp	activation [93, 94]
GP [p]	(Gl. 3.10)	glc	inactivation [83, 93]
GS	(Gl. 3.9)	glc6p	activation [83, 47]

Tabelle 3.1: Übersicht wichtiger allosterischer Effektoren in der humanen Glykolyse, Gluconeogenese und des Glykogenstoffwechsels. Abkürzungen für Enzyme und Metabolite entsprechend den Bezeichnungen im kinetischen Modell (Tab. 3.2 und Tab. 3.3). Alle angegebenen allosterischen Effekte sind auch Teil des kinetischen Modells.

Die phosphorylierten und dephosphorylierten Formen der interkonvertierbaren Enzyme haben jeweils unterschiedliche kinetische Eigenschaften. Daher bewirkt eine Veränderung des Phosphorylierungszustands eine Veränderung in der Kinetik des entsprechenden Enzyms und in der Folge einen veränderten Fluss durch die Reaktion. So kann durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung sehr schnell der Fluss durch wichtige Schlüsselreaktionen kontrolliert werden.

Entscheidende Kontrollgröße für den Interkonvertierungszustand ist der intrazelluläre cAMP Spiegel, welcher die Aktivität der cAMP abhängigen Proteinkinase (PKA) kontrolliert. PKA kann viele der interkonvertierbaren Enzyme von HGP und HGU phosphorylieren.

Glucagon bewirkt eine Aktivierung der Adenylatzyklase (AC), welche cAMP synthetisiert. Erhöhtes Glucagon bewirkt daher eine Erhöhung des zellulären cAMP Spiegels [47]. Insulin wirkt umgekehrt durch Aktivierung der Phosphodiesterase (PDE), welche cAMP spaltet und so den cAMP Spiegel senkt. Insulin und Glucagon verändern den cAMP Spiegel somit in reziproker Weise, welcher wiederum den Phosphorylierungsgrad der interkonvertierbaren Enzyme bestimmt.

Neben dem cAMP abhängigen Weg, werden auch cAMP unabhängige Proteinkinasen aktiviert, beispielsweise GSK3 durch Insulin. GSK3 aktiviert die GS durch Phosphorylierung, die Glykogensynthese wird gesteigert.

Durch Insulin und Glucagon werden somit Signalkaskaden aktiviert, welche den Phosphorylierungszustand der interkonvertierbaren Schlüsselenzyme von HGP und HGU verändern. Interkonvertierbare Enzyme der Glykolyse, der Gluconeogenese und des Glykogenstoffwechsels, deren Aktivität durch Insulin und Glucagon verändert wird, sind sowohl Schlüsselenzyme der HGP (GP, FBP2), als auch der HGU (GS, PFK2, PK, PDH).

So kommt die GP in Leber in einer phosphorylierten aktiven (a) Form und einer inaktiven,

unphosphorylierten (b) Form vor [46]. Phosphorylase b wird zu Phosphorylase a durch Phosphorylierung durch eine cAMP abhängige Proteinkinase [47], die Dephosphorylierung findet über eine hormonsensitive Proteinphosphatase statt. Daher bewirken Hormone, die den hepatischen cAMP Spiegel erhöhen, wie Glucagon oder Adrenalin, eine Aktivierung der GP und des Glykogenabbaus [47].

Die PC wird durch cAMP und Glucagon aktiviert und durch Insulin inhibiert [56, 47]. Auch die Aktivität von GS, FBP2/PFK2 und PDH wird jeweils durch cAMP, Insulin und Glucagon beeinflusst.

Durch die Hormone Insulin und Glucagon erfolgt daher eine konzertierte Veränderung der Kinetiken von Schlüsselenzymen von HGP und HGU.

Regulation durch Genexpression Neben den schnellen Regulationsmechanismen durch allosterische Effektoren und interkonvertierbare Enzyme, werden die Schlüsselenzyme von HGP und HGU auch auf Ebene der Genexpression reguliert. Die Anpassung der Expression unterstützt dabei jeweils den geschalteten Modus. Bei HGU, wenn Glykolyse betrieben werden soll, wird die Expression von GK, PFK1 und PK erhöht und die Expression der Umgehungsschritte der Gluconeogenese G6PASE, FBP1 und PEPCK erniedrigt. Umgekehrt bei HGP und Gluconeogenese wird die Expression von GK, PFK1 und PK inhibiert und die Expression von G6PASE, FBP1 erhöht.

Die langfristigen Effekte der Hormone auf die Genexpression werden zum Teil durch Veränderungen im cAMP Spiegel bewirkt, aber auch über cAMP unabhängige Mechanismen [56]. Weiterhin verändert auch die Glucose die Genexpression wichtiger Enzyme der HGP und HGU. Die Genexpression der Enzyme der Gluconeogenese (PEPCK, FBP1 und G6PASE) wird hormonell reguliert, v.a. durch Insulin, Glucagon und die Glucocorticoide [42]. Während Insulin die Gluconeogenese inhibiert, indem die Expression von PEPCK und G6PASE vermindert wird, stimulieren Glucagon und Glucocorticoide die Glucoseproduktion durch Induktion dieser Gene [57, 42]. Insulin stimuliert die Transkription der Gene von GK, PFK1, PK und PFK2/FBP2. Die Effekte durch die Genexpression sind deutlich langsamer, als die allosterische Regulation und die Regulation durch die interkonvertierbaren Enzyme.

3.1.4 Störungen der Blutglucosehomöostase - Diabetes

Auf Grund der engen Beziehung zwischen Leber und Kohlenhydratstoffwechsel sind Veränderungen der Glucosehomöostase verbreitete Phänomene bei beeinträchtigter Leberfunktionalität [57]. Das Auftreten von Diabetes und gestörter Glucosetoleranz bei Patienten mit Leberzirrhose ist deutlich höher als in Personen ohne Lebererkrankungen. Für 60 - 80 % der Patienten mit Leberzirrhose wurden Glucoseintoleranz berichtet und bis zu 20% entwickelten Diabetes Typ II[95, 96, 97, 98].

Diabetes Diabetes ist die häufigste Erkrankung der Glucosehomöostase. Die postprandiale Hyperglycämie ist einerseits eine Folge der beeinträchtigten HGP Reduktion und andererseits der beeinträchtigten Aufnahme der Glucose durch Skelettmuskel, Herz oder adipöses Gewebe. Diese Abnormalitäten resultieren im allgemeinen aus einer Kombination von gestörter Insulinsekretion und einer Gewebstoleranz gegenüber Insulin [57].

In Diabetes Typ I und Typ II ist erhöhte HGP ein Hauptfaktor der Hyperglycämie im gefasteten Zustand [57]. Dabei scheint erhöhte Gluconeogenese statt erhöhte Glykogenolyse der dominierende Prozess zu sein, der für die erhöhte postabsorptive HGP Rate in Diabetes Typ II verantwortlich ist [99, 100]. Erhöhte Gluconeogenese ausgehend von Laktat, Alanin und Glycerol wurden in Patienten mit Typ II Diabetes gefunden [47, 101]. Obwohl bei Diabetes die Flüsse der Vorläufer der Gluconeogenese im allgemeinen größer sind als bei normalen Personen, ist eine erhöhte intrahepatische Gluconeogenese, statt einem erhöhten Substratangebot die Hauptanomalie in Diabetes Typ II [99, 101, 47]. Ein erhöhter Fluss durch die Gluconeogenese, entweder durch Überexpression von PEPCK oder G6PASE sind ausreichend, um metabolische Störungen zu beobachten, die dem Diabetes Typ II entsprechen [57].

3.1.5 Zielstellung kinetisches Modell und Hypothesen

In dieser Arbeit wird ein detailliertes kinetisches Modell der Glykolyse, Gluconeogenese und des Glykogenstoffwechsels des menschlichen Hepatozyten aufgestellt. Das Modell soll in der Lage sein, die Aufgabe des Hepatozyten (der Leber) in der Glucosehomöostase zu erfüllen, d.h. einerseits bei hyperglycämischen Bedingungen Glucose aus dem Blut aufzunehmen (HGU), andererseits bei hypoglycämischen Bedingungen hepatische Glucoseproduktion zu betreiben (HGP).

Der Glykogenspeicher soll die jeweiligen Aufgaben unterstützen, indem dieser bei hypoglycämischen Bedingungen geleert wird, um zusätzliche Glucose neben der Gluconeogenese für die Zirkulation bereitzustellen, bei hyperglycämischen Bedingungen (z.B. postprandial) wieder gefüllt wird.

Die Regulation über allosterische Effektoren und interkonvertierbare Enzyme ist Teil des kinetischen Modells. Der Phosphorylierungszustand der interkonvertierbaren Enzyme wird über die Insulin und Glucagonkonzentration im Blut verändert. Langsame Veränderungen auf Grund der Regulation der Genexpression sind nicht Teil des Modells.

Laktat dient als Substrat der Gluconeogenese.

Aufgestellte Hypothesen, die mit dem Modell überprüft werden sollen:

1. Der Hepatozyt ist in der Lage zwischen HGP und HGU in Abhängigkeit von Glucose, Insulin und Glucagon im Blut umzuschalten. Für den Schaltprozess sind die schnellen Regulationen über interkonvertierbare Enzyme und allosterische Effektoren ausreichend. Veränderung der Genexpression von Schlüsselenzyme ist nicht notwendig für den Schalt-

prozess.

2. Der Glykogenspeicher wird bei HGP geleert und bei HGU gefüllt. Durch den Glykogenspeicher kann die Aufgabe der Blutglucosehomöostase besser erfüllt werden.
3. Bei gestörten Insulin- und Glucagonsignalen ist auch der Umschaltprozess zwischen HGP und HGU gestört. Im Fall von Diabetes Typ II führt diese Störung zu einer erhöhten HGP. Durch Insulingabe kann die Störung teilweise wieder behoben werden.
4. Die Änderung der Genexpression führt zu einer Optimierung des jeweils geschalteten Zustands. Futile Cycles werden hierdurch minimiert.

3.2 Methoden

3.2.1 Netzwerkrekonstruktion

Für die kinetische Modellierung wurde das Teilnetzwerk Glykolyse, Gluconeogenese und Glykogenstoffwechsels der durchgeführten Kernhepatozytenrekonstruktion verwendet. Das Modellnetzwerk wurde mittels FBA Rechnungen funktionell überprüft.

3.2.2 Sammlung kinetischer Parameter

Für alle Reaktionen des Modells wurden die vorhandenen kinetischen Informationen aus BRENDA [102, 14] und SabioRK [103] skriptbasiert gesammelt. Die so gewonnenen kinetischen Parameter und zugehörigen Literaturreferenzen dienten als Ausgangspunkt einer ausführlichen Literaturrecherche. Dabei wurden die Orginalarbeiten in denen BRENDA und SabioRK die kinetischen Informationen extrahiert haben, ausgewertet und die in den Arbeiten angegebenen Referenzen zur Sammlung weitere kinetische Informationen verwendet.

Als zweiter Ausgangspunkt der Recherche wurden Reviews der Reaktionen und Transporter verwendet. Diese dienten als Startpunkt für eine tiefer gehende Literaturrecherche zum jeweiligen Enzym. Hierdurch konnten v.a. zusätzliche Daten zu den Regulationsmechanismen (allosterischen Effektoren und interkonvertierbare Enzyme) gewonnen werden.

Drittens wurde gezielt nach Literatur zu kinetischen Publikationen in PubMed für die Einzelenzyme gesucht und diese ausgewertet.

Die Suche erfolgte gewebsspezifisch für Leber und Hepatozyt und konzentrierte sich auf Informationen zu *Homo sapiens* und Ratte.

Kinetische Informationen für andere Gewebe im Menschen und Leberdaten in anderen Mammalia wurden ebenfalls gespeichert. Diese Daten wurden aber nur in sehr wenigen Ausnahmefällen, wenn keine Informationen für (*Homo sapiens* und Leber) oder (Ratte und Leber) vorlagen, für die Aufstellung der Ratengleichungen verwendet. Insbesondere bei Reaktionen, die durch spezielle Isoenzyme in der Leber synthetisiert werden, wurde darauf geachtet nur leber- und hepatocyten-spezifische Informationen für die Aufstellung der Ratengleichungen zu verwenden.

Von Interesse waren unter anderem Km-Werte für Substrate, Produkte und allosterische Effektoren, die Art der allosterischen Effekte, freie Energien und Gleichgewichtskonstanten, kinetische Mechanismen und insbesondere die Unterschiede in den Kinetiken der interkonvertierbaren Enzyme zwischen phosphoryliertem und dephosphoryliertem Zustand.

3.2.3 Aufstellung der Ratengleichungen

Die vorhandenen Informationen und kinetischen Parameter wurden in Ratengesetze für die Einzelreaktionen integriert. Die Ratengleichungen wurden mit Hilfe der experimentell bestimmten Parameter so aufgestellt, dass für jede Ratengleichung nur ein freier Parameter (V_{max}) unbestimmt blieb.

Im Falle der interkonvertierbaren Enzyme wurden jeweils eine Ratengleichung für den phosphorylierten und dephosphorylierten Zustand aufgestellt, welche einen gemeinsame freien V_{max} Parameter besitzen.

Die Glykolyse, Gluconeogenese und der Glykogenmetabolismus ist in der Leber gut untersucht, wodurch ausreichend kinetische Informationen in der Literatur vorhanden waren, um sämtliche Ratengleichungen aufzustellen.

In dem Modell wurden keine Reaktionsschritte zusammengefasst, alle Reaktionen und Transporter werden individuell kinetisch beschrieben.

3.2.4 Anfangswerte und Flusswerte

Die Anfangswerte der Konzentrationen wurden aus experimentellen Arbeiten in der Leber von *Homo sapiens* und Ratte extrahiert. Hierbei wurden Konzentrationswerte für unterschiedliche metabolische Zustände (Übernachtfasten (HGP) und Zustand nach Nahrungsaufnahme (HGP)) verwendet.

Ebenso wurden Flussverteilungen für die unterschiedlichen Zustände aus der Orginalliteratur zusammengestellt.

Für die zum Teil notwendige Umrechnungen humaner Daten wurde jeweils ein Körpergewicht von 80kg und ein Lebergewicht von 1.5 kg angenommen (wenn keine Patientendaten angegeben waren). Für die Umrechnungen der Konzentrationswerte wurde eine Leberdichte von 1 g/ml verwendet.

3.2.5 Optimierung der V_{max}

Die freien V_{max} Parameter wurden mittels der experimentelle Flusswerte und Konzentrationen für die unterschiedliche metabolischen Zustände bestimmt. In einem ersten Schritt wurde ein initialer Parametersatz manuell angepasst. Durch Optimierung mit Nebenbedingungen (Matlab constraint optimization) wurden die V_{max} ausgehend von diesen Startparametern so optimiert, dass die simulierten Flüsse möglichst geringen quadratischen Abstand von den experimentellen Flüssen haben, die sich einstellenden Konzentrationswerte möglichst gut die steady state Bedingungen erfüllen und die sich einstellenden Konzentrationswerte möglichst geringen Abstand von den experimentellen Konzentrationswerten besitzen.

3.2.6 Simulationen

Das kinetische Modell wurde in Matlab implementiert und simuliert. Für sämtliche Simulationen wurden die in Kap. 3.3 angegebenen Ratengleichungen verwendet.

V_{max} und Startwerte Für alle Simulationen wurden als Anfangswerte der Konzentrationen aus Tab. 3.3 verwendet. In allen Simulationen (mit Ausnahme der Simulationen zur Genexpression) wurden die V_{max} aus Tab. 3.2 verwendet. Die in den Simulationen zur Genexpression durchgeführten Veränderungen der V_{max} sind in den Simulationen angegeben.

Sämtliche Flüsse sind in [$\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{min}$] und beziehen sich auf den Fluss der Gesamtleber pro kg Körpergewicht. Das zytosolische Volumen wurde 5 mal so groß wie das mitochondriale Volumen angenommen.

Die Glykogenkonzentration wird in Glucoseäquivalenten angegeben.

Konstante Konzentrationen Einige Konzentrationen mussten in den Simulationen konstant gehalten werden.

Dies sind Metabolite, die die Schnittstelle des Modells mit dem Gesamtmetabolismus bilden (Acetyl-CoA und Citrat im Mitochondrium), Metabolite, die den Energiestatus der Zelle bestimmen (ATP, ADP, NADH, NAD), sowie Phosphat und CO_2 .

Sämtliche konstante Metabolite werden auf die in Tab. 3.3 für den jeweiligen Metaboliten angegebene Konzentrationen während der Simulationen gesetzt.

Da der TCA Zyklus und die Atmungskette nicht Bestandteil des Modells sind, werden die Schnittstellenmetabolite des TCA auf konstante Werte gesetzt. Dies sind Acetyl-CoA und Citrat.

Der NADH zu NAD Spiegel unterscheidet sich nur geringfügig zwischen übernacht gefasteten und gefütterten Zustand und auch die ATP und ADP Konzentrationen sind in beiden Zuständen sehr ähnlich (Tab.3.3). Die Leber nutzt v.a. die Oxidation von Fettsäuren zur Energieversorgung und ist in der Lage den Energiestatus während HGU und HGP nahezu unverändert zu halten.

Der Hepatozyt sollte daher bei konstantem Energiestatus in der Lage sein zwischen HGP und HGU umzuschalten.

Weiterhin wurden einige Kofaktoren in den Modell konstant gehalten (Phosphat und CO_2). Phosphat ist an sehr vielen Reaktionen in dem Modell beteiligt, insbesondere auch an den Reaktionen der ATP Hydrolyse. Da ATP und ADP konstant gehalten werden wird auch das Phosphat auf einen konstanten Wert gesetzt.

Die CO_2 Konzentration in der Zelle wird durch sehr viele Reaktionen beeinflusst. Insbesondere durch die Decarboxylierungen des TCA aber beispielsweise auch durch den Harnstoffzyklus und andere decarboxylierende und CO_2 verwendende Reaktionen, wie beispielsweise die PC. Der CO_2 Wert wird daher auf einen konstanten Wert festgehalten und stellt keine beschränkende Größe für die Gluconeogenese ausgehend von Pyruvat dar.

PEPCK Vereinfachung Um das Modell so einfach wie möglich zu halten, wurde nur die mitochondriale PEPCK und der mitochondriale PEP Transport für die Simulationen verwendet. Um den Weg über die zytosolische PEPCK zu integrieren sind sehr viele zusätzliche Reaktionen und Transporter notwendig. Darunter der Malatshuttle mit zytosolischer und mitochondrialer MDH. Die FBA Simulationen zur Gluconeogenese ausgehend von Laktat haben gezeigt, dass nur die mitochondriale PEPCK verwendet wurde. Auch in der Literatur ist beschrieben, dass bei der Verwendung von Laktat als Substrat v.a. die mitochondriale PEPCK benutzt wird [42]. Der Malatshuttle zum Transport der reduzierten Reduktionsenergie für die GAPDH Reaktion ins Zytosol ist nicht notwendig, da das reduzierte NADH durch die LDH in der Umsetzung von Laktat zu Pyruvat erzeugt wird. Daher wird in den Simulationen nur die mitochondriale PEPCK verwendet.

Abweichung von recherchierten Parametern In den Simulationen wurde für die PGK ein $\Delta G^0'$ von -5 kJ/mol statt dem in der Literatur gefundenen Wert von -18.5 kJ/mol verwendet. Die Simulationsergebnisse bei -5 kJ/mol sind qualitativ identisch zu den Simulationen, die mit -18.5 kJ/mol für die PGK durchgeführt wurden. Insbesondere unterscheidet sich das Umschaltverhalten zwischen HGP und HGU und auch die Rolle des Glykogenspeichers nicht.

Wesentlicher Unterschied sind die sich einstellende Konzentrationen von pg2 und pg3. Bei -18.5 kJ/mol stellen sich unphysiologische Konzentrationen von pg2 und pg3 im Bereich von $5\text{-}30 \text{ mM}$ ein, wenn bpg13 im physiologischen Bereich von $\sim 0.05 \text{ mM}$ liegt. Die Konzentrationsverhältnisse in den experimentellen Daten für pg3/bpg13 bewegen sich im Bereich von ~ 5 , und nicht wie durch $\Delta G^0' = -18.5 \text{ kJ/mol}$ vorgegeben in der Größenordnung von 1000. Mit dem in der Literatur gefundenen sehr negativen $\Delta G^0'$ von PGK war es unmöglich V_{max} zu finden, bei denen alle Intermediate der Glycolyse in physiologischen Bereichen liegen.

Die PGK ist eine reversible Reaktion, die in physiologischen Bereichen von bpg13 und pg2 sowohl in Richtung der Gluconeogenese, als auch der Glycolyse ablaufen sollte. Der $\Delta G^0'$ sollte unter zytosolischen Bedingungen eher im Bereich von -5 kJ/mol als bei -18.5 kJ/mol liegen.

Alle anderen Parameter der Ratengleichungen sind unverändert aus der Literatur übernommen.

3.2.7 Visualisierung

Sämtliche Abbildungen wurden mittels Matlab oder Cytoscape erstellt.

3.3 Kinetisches Modell

3.3.1 Modellübersicht

Das kinetische Modell der Glykolyse, der Gluconeogenese und des Glykogenstoffwechsel (Abb. 3.6) besteht aus Blutkompartiment, Zytosol und Mitochondrium. In Tab. 3.2 sind die Flüsse, in Tab. 3.3 die Konzentrationen des Modells angegeben. Glykolyse findet ausgehend von Glucose bis zum Pyruvat im Zytosol statt. Teilschritte der Gluconeogenese sind mitochondrial lokalisiert. Laktat kann als gluconeogenen Vorstufe verwendet werden. Der Glykogenmetabolismus wird über GS und GP modelliert, Branching Enzym, Debranching Enzym und Glycogenin sind nicht Teil des Modells.

Die interkonvertierbaren Enzyme, deren Phosphorylierungszustand über die Hormone Insulin und Glucagon verändert werden, sind GS, GP, FBP2, PFK2, PK, PDH. Die Schlüsselenzyme GK, G6Pase und PEPCK sind nicht interkonvertierbar. Die wichtigsten allosterischen Effektoren sind in den Ratengleichungen berücksichtigt. Die Genexpression ist nicht Teil des Modells.

Reaktion	Kurzname	Langname	Kompartiment	V_{max} [$\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{min}$]
v_1	GLUT2	GLUT2 glucose transport (facilitated diffusion)	Plasmamembran	1000
v_2	GK	glucokinase, hexokinase IV	Zytosol	40
v_3	G6PASE	Glucose-6 phosphatase	Zytosol	40
v_4	GPI	Glucose-6-phosphate isomerase	Zytosol	1000
v_5	G16PI	Glucose-1-phosphate 1,6-phosphomutase	Zytosol	500
v_6	UPGASE	UTP:Glucose-1-phosphate uridylyltransferase	Zytosol	100
v_7	PPASE	Pyrophosphate phosphohydrolase	Zytosol	100
v_8	GS	Glycogen synthase	Zytosol	500
v_9	GP	Glycogen phosphorylase	Zytosol	5
v_{10}	NDK	Nucleosid diphosphate kinase (GTP)	Zytosol	500
v_{11}	NDK	Nucleosid diphosphate kinase (UTP)	Zytosol	1000
v_{12}	AK	Adenylyl kinase	Zytosol	500
v_{13}	PFK2	Phosphofructo kinase 2	Zytosol	0.01
v_{14}	FBP2	Fructose-2,6-bisphosphatase	Zytosol	0.0833
v_{15}	PFK1	Phosphofructo kinase 1	Zytosol	3
v_{16}	FBP1	Fructose-1,6-bisphosphatase	Zytosol	1
v_{17}	ALD	Aldolase	Zytosol	1000
v_{18}	TPI	Triosephosphate isomerase	Zytosol	1000
v_{19}	GAPDH	Glyceraldehydepsphosphate dehydrogenase	Zytosol	1000
v_{20}	PGK	Phosphoglycerate kinase	Zytosol	1000
v_{21}	PGM	3-Phosphoglycerate mutase	Zytosol	1000
v_{22}	EN	Enolase	Zytosol	100
v_{23}	PK	Pyruvate kinase	Zytosol	200
v_{24}	PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	Zytosol	0
v_{25}	PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	Mitochondrium	1000
v_{26}	PC	Pyruvate Carboxylase	Mitochondrium	1000
v_{27}	LDH	Lactate dehydrogenase	Zytosol	30
v_{28}	LACT	Lactate transport	Plasmamembran	10
v_{29}	PYRT	Pyruvate transport	mitochondriale Membran	100
v_{30}	PEPT	PEP transport	mitochondriale Membran	100
v_{31}	PDH	Pyruvate dehydrogenase	Mitochondrium	30
v_{32}	CS	Citrate synthase	Mitochondrium	10
v_{33}	NDK	Nucleosid diphosphate kinase (GTP)	Mitochondrium	1000
v_{34}	OAAFLX	oxalacetate flux	Mitochondrium	0
v_{35}	ACO AFLX	acetyl-CoA flux	Mitochondrium	0
v_{36}	CITFLX	citrate flux	Mitochondrium	0

Tabelle 3.2: Reaktionen und Transporter und in den Simulationen verwendetes V_{max} .

Metabolit	Kurzname	Langname	Kompartiment	übernacht gefastet [mM]	gesättigt [mM]
<i>S</i> ₁	atp	ATP	Zytosol	3	3
<i>S</i> ₂	adp	ADP	Zytosol	1.3	0.89
<i>S</i> ₃	amp	AMP	Zytosol	0.28	0.24
<i>S</i> ₄	utp	UTP	Zytosol	0.27	0.27
<i>S</i> ₅	udp	UDP	Zytosol	0.11	0.11
<i>S</i> ₆	gtp	GTP	Zytosol	0.27	0.27
<i>S</i> ₇	gdp	GDP	Zytosol	0.11	0.11
<i>S</i> ₈	nad	NAD ⁺	Zytosol	1.22	1.22
<i>S</i> ₉	nadh	NADH	Zytosol	7.97E-4	3.26E-4
<i>S</i> ₁₀	p	phosphate	Zytosol	5	5
<i>S</i> ₁₁	pp	pyrophosphate	Zytosol	0.05	0.05
<i>S</i> ₁₂	h2o	water	Zytosol	-1	-1
<i>S</i> ₁₃	co2	CO ₂	Zytosol	0.1	0.1
<i>S</i> ₁₄	h	H ⁺	Zytosol	-1	-1
<i>S</i> ₁₅	glc1p	glucose-1-phosphate	Zytosol	0.2	0.2
<i>S</i> ₁₆	udpglc	UDP-glucose	Zytosol	0.5	0.5
<i>S</i> ₁₇	glyglc	glycogen	Zytosol	220	220
<i>S</i> ₁₈	glc	glucose	Zytosol	5	6.85
<i>S</i> ₁₉	glc6p	glucose-6-phosphate	Zytosol	0.1	0.2
<i>S</i> ₂₀	fru6p	fructose-6-phosphate	Zytosol	0.05	0.1
<i>S</i> ₂₁	fru16bp	fructose-1,6-bisphosphate	Zytosol	0.02	0.02
<i>S</i> ₂₂	fru26bp	fructose-2,6-bisphosphate	Zytosol	0	0.1
<i>S</i> ₂₄	dhap	glyceraldehyde 3-phosphate	Zytosol	0.09	0.11
<i>S</i> ₂₃	grap	glycerone phosphate	Zytosol	0.02	0.03
<i>S</i> ₂₅	bpg13	1,3-bisphospho-glycerate	Zytosol	0.05	0.05
<i>S</i> ₂₆	pg3	3-phosphoglycerate	Zytosol	0.26	0.3
<i>S</i> ₂₇	pg2	2-phosphoglycerate	Zytosol	0.03	0.04
<i>S</i> ₂₈	pep	phosphoenol pyruvate	Zytosol	0.09	0.12
<i>S</i> ₂₉	pyr	pyruvate	Zytosol	0.02	0.27
<i>S</i> ₃₀	oaa	oxalacetate	Zytosol	0.01	0.04
<i>S</i> ₃₁	lac	lactate	Zytosol	0.1	0.1
<i>S</i> ₃₂	glc_ext	glucose	Blut	3.5	8
<i>S</i> ₃₃	lac_ext	lactate	Blut	0.8	0.8
<i>S</i> ₃₄	co2_mito	CO ₂	Mitochondrium	0.1	0.1
<i>S</i> ₃₅	p_mito	phosphate	Mitochondrium	5	5
<i>S</i> ₃₆	oaa_mito	oxalacetate	Mitochondrium	0.01	0.04
<i>S</i> ₃₇	pep_mito	pep	Mitochondrium	0.09	0.12
<i>S</i> ₃₈	acoa_mito	acetyl-coenzyme A	Mitochondrium	0.1	0.04
<i>S</i> ₃₉	pyr_mito	pyruvate	Mitochondrium	0.02	0.27
<i>S</i> ₄₀	cit_mito	citrate	Mitochondrium	0.32	0.3
<i>S</i> ₄₁	atp_mito	ATP	Mitochondrium	3	3
<i>S</i> ₄₂	adp_mito	ADP	Mitochondrium	1.3	0.89
<i>S</i> ₄₃	gtp_mito	GTP	Mitochondrium	0.27	0.27
<i>S</i> ₄₄	gdp_mito	GDP	Mitochondrium	0.11	0.11
<i>S</i> ₄₅	coa_mito	coenzyme A	Mitochondrium	0.1	0.1
<i>S</i> ₄₆	nadh_mito	NADH	Mitochondrium	0.24	0.25
<i>S</i> ₄₇	nad_mito	NAD ⁺	Mitochondrium	0.98	0.97
<i>S</i> ₄₈	h_mito	H ⁺	Mitochondrium	-1	-1
<i>S</i> ₄₉	h2o_mito	H ₂ O	Mitochondrium	-1	-1

Tabelle 3.3: Übersicht der Metabolite des Models. Konzentrationen aus [104, 105, 106, 58, 107, 108]. Glykogenkonzentrationen sind in Glucoseäquivalenten. 'Overnight fasted' ist Zustand 8-12h nach letzter Nahrungsaufnahme. 'Fed' ist Zustand nach Nahrungsaufnahme. Metabolite, die nicht in den Ratengleichungen verwendet werden, aber in der detaillierten stöchiometrischen Matrix des Systems auftauchen sind auf -1 gesetzt.

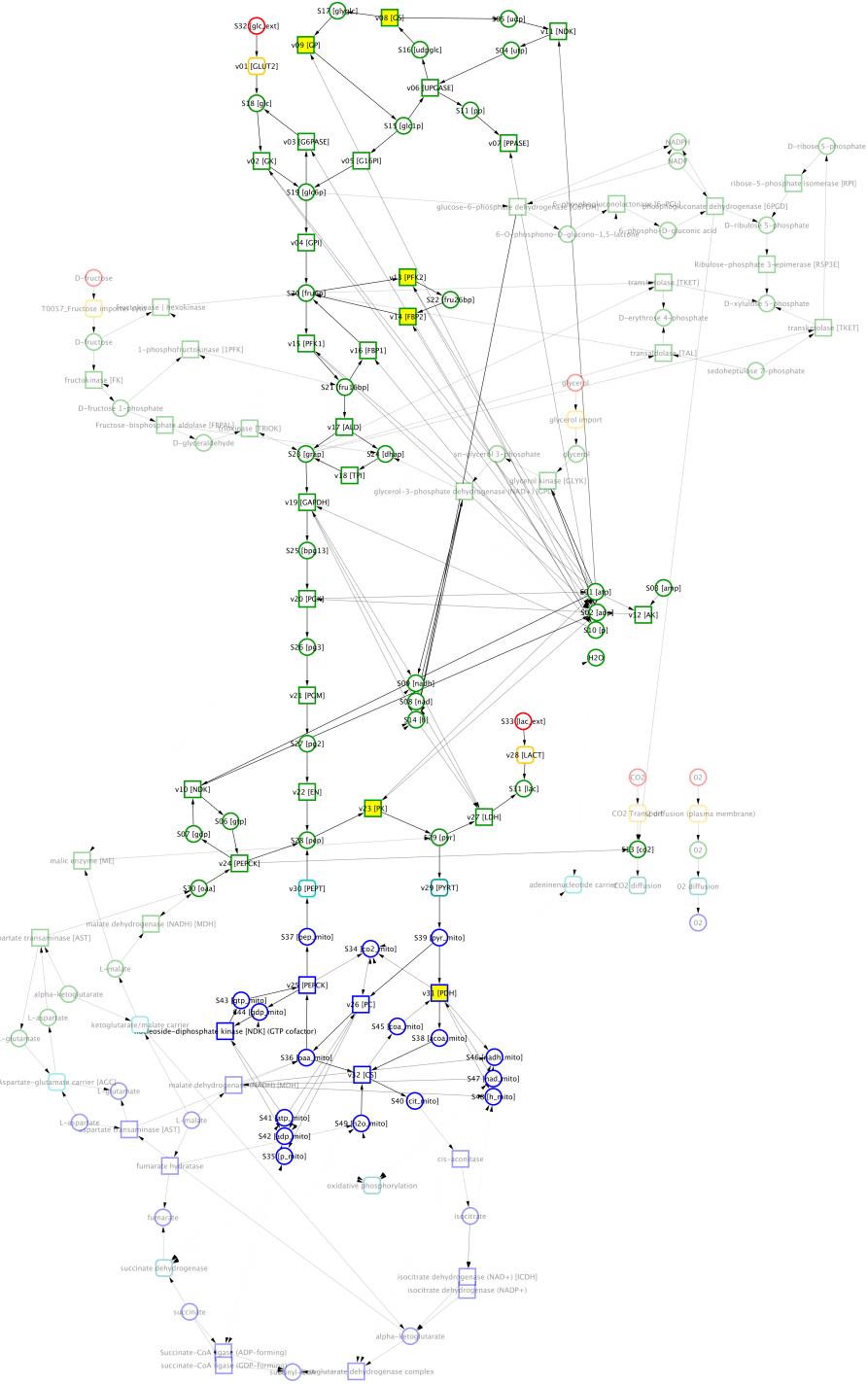


Abbildung 3.6: Übersicht kinetisches Netzwerk. Blutkompartiment (rot), Zytosol (grün), Mitochondrium (blau), Plasmamembran(orange), mitochondrielle Membran (hellblau). Metabolite (Kreise), Reaktionen (Quadrate), Transporter (abgerundete Quadrate). Pfeilrichtungen in Richtung der Definition in den Ratengleichungen. Interkonvertierbaren Enzyme gelb hervorgehoben. Direkte Umgebung des kinetischen Netzwerks bestehend aus Fructosemetabolismus, Glycerolmetabolismus und TCA ist transparent dargestellt.

3.3.2 Ratengleichungen

Die Kinetiken der interkonvertierbaren Enzyme unterscheiden sich im phosphorylierten (v_p) und dephosphorylierten (v_{dp}) Zustand (Kap. 3.3.5). Die Gesamtkinetik setzt sich in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsgrad γ aus den Einzelkinetiken nach

$$v = \gamma \cdot v_p + (1 - \gamma) \cdot v_{dp} \quad (3.1)$$

zusammen. Der Phosphorylierungsgrad γ der interkonvertierbaren Enzyme in Abhängigkeit von Insulin und Glucagon ergibt sich über die Signalfunktion (Kap. 3.3.4).

Glucose transport (GLUT2) [109, 110, 111, 112, 42]



$$v_1([glc], [glc_ext]) = \frac{\frac{v_{max}}{k_m^{glc}} \cdot ([glc_ext] - \frac{[glc]}{k_{eq}})}{1 + \frac{[glc_ext]}{k_m^{glc}} + \frac{[glc]}{k_m^{glc}}} \quad (3.2)$$

$$\Delta G^0' = 0 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 1$$

$$k_m^{glc} = 42 \text{ mM}$$

Glucokinase (Hexokinase IV, GK) [113, 114, 83, 42, 115, 116, 117]

GK Aktivität wird v.a. durch das GKRP (glucokinase regulator protein) kontrolliert, welches ein kompetitiver Inhibitor für Glucose ist. Die Bindung von GKRP an GK ist abhängig von $[glc]$, $[fru6p]$ und $[fru1p]$ und verändert den k_m für Glucose. Darüber hinaus bewirkt GKRP die Translokation von GK in den Nucleus, so dass die Konzentration von GK im Zytosol geringer wird. In dem Modell ist nur die freie GK aktiv.

$$gk_{free}([glc], [fru6p]) = \frac{[glc]^{n_{gkrp}}}{[glc]^{n_{gkrp}} + (k_{gkrp}^{glc})^{n_{gkrp}}} \left(1 - b_{gkrp} \frac{[fru6p]}{[fru6p] + k_{gkrp}^{fru6p}} \right)$$

$$v_2([glc], [atp], [fru6p]) = v_{max} \cdot gk_{free} \cdot \frac{[atp]}{k_m^{atp} + [atp]} \cdot \frac{[glc]^n}{[glc]^n + (k_m^{glc})^n} \quad (3.3)$$

$$\Delta G^{0'} = -16.7 \text{ kJ/mol}$$

$$n = 1.6$$

$$k_m^{glc} = 7.5 \text{ mM}$$

$$k_m^{atp} = 0.26 \text{ mM}$$

$$n_{gkrp} = 2$$

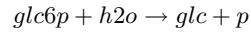
$$k_{gkrp}^{glc} = 15 \text{ mM}$$

$$k_{gkrp}^{fru6p} = 0.010 \text{ mM}$$

$$b_{gkrp} = 0.7$$

Glucose-6 phosphatase (G6PASE) [118, 119, 120]

In dem Modell ist die G6Pase Aktivität zytosolisch lokalisiert. Im Hepatozyten ist die G6Pase dagegen ein Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulums. Transporter für glc6p, p und glc existieren in der ER Membran.



$$v_3([glc6p]) = v_{max} \frac{[glc6p]}{k_m^{glc6p} + [glc6p]} \quad (3.4)$$

$$\Delta G^{0'} = -13.8 \text{ kJ/mol}$$

$$k_m^{glc6p} = 2 \text{ mM}$$

Glucose-6-phosphate isomerase (GPI) [121, 122]



$$v_4([glc6p], [fru6p]) = \frac{\frac{v_{max}}{k_m^{glc6p}} \cdot ([glc6p] - \frac{[fru6p]}{k_{eq}})}{1 + \frac{[glc6p]}{k_m^{glc6p}} + \frac{[fru6p]}{k_m^{fru6p}}} \quad (3.5)$$

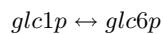
$$\Delta G^{0'} = 1.7 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 0.5157$$

$$k_m^{glc6p} = 0.182 \text{ mM}$$

$$k_m^{fru6p} = 0.071 \text{ mM}$$

Glucose-1-phosphate 1,6-phosphomutase (G16PI) [123]



$$v_5([glc1p], [glc6p]) = \frac{\frac{v_{max}}{k_m^{glc1p}} \cdot ([glc1p] - \frac{[glc6p]}{k_{eq}})}{1 + \frac{[glc1p]}{k_m^{glc1p}} + \frac{[glc6p]}{k_m^{glc6p}}} \quad (3.6)$$

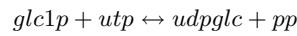
$$\Delta G^{0'} = -7.1 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 15.7$$

$$k_m^{glc6p} = 0.67 \text{ mM}$$

$$k_m^{glc1p} = 0.045 \text{ mM}$$

UTP:Glucose-1-phosphate uridylyltransferase (UPGASE) [124, 125, 126]



$$v_6([glc1p], [utp], [udpglc], [pp]) = \frac{\frac{v_{max}}{k_m^{utp} k_m^{glc1p}} \left([glc1p][utp] - \frac{[udpglc][pp]}{k_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{[utp]}{k_m^{utp}} \right) \left(1 + \frac{[glc1p]}{k_m^{glc1p}} \right) + \left(1 + \frac{[udpglc]}{k_m^{udpglc}} \right) \left(1 + \frac{[pp]}{k_m^{pp}} \right) - 1} \quad (3.7)$$

$$\Delta G^{0'} = 3.0 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 0.31$$

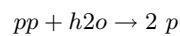
$$k_m^{utp} = 0.563 \text{ mM}$$

$$k_m^{glc1p} = 0.172 \text{ mM}$$

$$k_m^{udpglc} = 0.049 \text{ mM}$$

$$k_m^{pp} = 0.166 \text{ mM}$$

Pyrophosphate phosphohydrolase (PPASE) [127, 128]



$$v_7([pp]) = v_{max} \frac{[pp]}{[pp] + k_m^{pp}} \quad (3.8)$$

$$\Delta G^{0'} = -19.1 \text{ kJ/mol}$$

$$k_m^{pp} = 0.005 \text{ mM}$$

Glycogen synthase (GS) [129, 130, 131, 58, 105]

Unterschiedliche Ratengleichungen für die phosphorylierte [p] und dephosphorylierte [dp] Form des Enzyms. Der Gesamtfluss ergibt sich durch Kombination von [p] und [dp] Form in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand $\gamma_{GS} \in [0, 1]$. Die Ratengleichung der GS ist abhängig vom Glykogen $[glyglc]$ und der maximalen Glykogenspeicherkapazität C .

$$\begin{aligned}
& udp\text{glc} \rightarrow udp + gly\text{glc} \\
f_{max}([glyglc]) &= (1 + k_1^{max}) \frac{(C - [glyglc])}{(C - [glyglc]) + k_1^{max}C} \\
v_8^{dp}([udp\text{glc}], [glc6p], [glyglc]) &= v_{max} f_{max} \frac{[udp\text{glc}]}{[udp\text{glc}] + (\frac{k_1^{dp}}{k_2^{dp} + [glc6p]})} \\
v_8^p([udp\text{glc}], [glc6p], [glyglc]) &= v_{max} f_{max} \frac{[udp\text{glc}]}{[udp\text{glc}] + (\frac{k_1^p}{k_2^p + [glc6p]})} \\
v_8([udp\text{glc}], [glc6p], [glyglc]) &= (1 - \gamma_{GS}) \cdot v_8^{dp} + \gamma_{GS} \cdot v_8^p
\end{aligned} \tag{3.9}$$

$$k_1^{dp} = 0.224 \text{ mM}^2$$

$$k_2^{dp} = 0.1504 \text{ mM}$$

$$k_1^p = 3.003 \text{ mM}^2$$

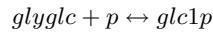
$$k_2^p = 0.09029 \text{ mM}$$

$$k_1^{max} = 0.1$$

$$C = 500 \text{ mM}$$

Glycogen phosphorylase (GP) [94, 132, 93, 133, 82, 134]

Unterschiedliche Ratengleichungen für die phosphorylierte [p] und dephosphorylierte [dp] Form des Enzyms. Der Gesamtfluss ergibt sich durch Kombination von [p] und [dp] Form in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand $\gamma_{GP} \in [0, 1]$.



$$\begin{aligned}
v_{max}^{dp}([amp]) &= v_{max} \left(k_{dp,base}^{amp} + (k_{dp,max}^{amp} - k_{dp,base}^{amp}) \left(\frac{[amp]}{[amp] + k_{dp,a}^{amp}} \right) \right) \\
v_{max}^p([glc]) &= v_{max} \exp(-\frac{\ln(2)}{k_{p,i}^{glc}} [glc])
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
v_9^{dp}([glyglc], [p], [glc1p], [amp]) &= \frac{\frac{v_{max}^{dp}}{k_{dp}^{glyc} k_{dp}^p} \left([glyglc][P] - \frac{[glc1p]}{k_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{[glyglc]}{k_{dp}^{glyc}} \right) \left(1 + \frac{[p]}{k_{dp}^p} \right) + \left(\frac{[glc1p]}{k_{dp}^{glc1p}} \right) - 1} \\
v_9^p([glyglc], [p], [glc1p], [glc]) &= \frac{\frac{v_{max}^p}{k_p^{glyc} k_p^p} \left([glyglc][p] - \frac{[glc1p]}{k_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{[glyglc]}{k_p^{glyc}} \right) \left(1 + \frac{[p]}{k_p^p} \right) + \left(\frac{[glc1p]}{k_p^{glc1p}} \right) - 1} \\
v_9([glyglc], [p], [glc1p], [amp], [glc]) &= (1 - \gamma_{GP}) \cdot v_9^{dp} + \gamma_{GP} \cdot v_9^p
\end{aligned} \tag{3.10}$$

$$\Delta G^{0'} = 4.0 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 0.21 \frac{1}{\text{mM}}$$

$$k_{dp}^{glyc} = 4.8 \text{ mM}$$

$$k_p^{glyc} = 2.7 \text{ mM}$$

$$k_{dp}^{glc1p} = 120 \text{ mM}$$

$$k_p^{glc1p} = 2 \text{ mM}$$

$$k_{dp}^p = 300 \text{ mM}$$

$$k_p^p = 5 \text{ mM}$$

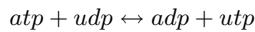
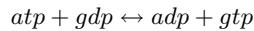
$$k_{p,i}^{glc} = 5 \text{ mM}$$

$$k_{dp,a}^{amp} = 1 \text{ mM}$$

$$k_{dp,base}^{amp} = 0.03$$

$$k_{dp,max}^{amp} = 0.30$$

Nucleosid diphosphate kinase (GTP, UTP) (NDK) [135, 136, 137]



$$v_{10}([atp], [adp], [gtp], [gdp]) = \frac{\frac{v_{max}}{k_m^{atp} k_m^{gdp}} \left([atp][gdp] - \frac{[adp][gtp]}{k_{eq}} \right)}{(1 + \frac{[atp]}{k_m^{atp}})(1 + \frac{[gdp]}{k_m^{gdp}}) + (1 + \frac{[adp]}{k_m^{adp}})(1 + \frac{[gtp]}{k_m^{gtp}}) - 1} \tag{3.11}$$

$$v_{11}([atp], [adp], [utp], [udp]) = \frac{\frac{v_{max}}{k_m^{atp} k_m^{udp}} \left([atp][udp] - \frac{[adp][utp]}{k_{eq}} \right)}{(1 + \frac{[atp]}{k_m^{atp}})(1 + \frac{[udp]}{k_m^{udp}}) + (1 + \frac{[adp]}{k_m^{adp}})(1 + \frac{[utp]}{k_m^{utp}}) - 1} \tag{3.12}$$

$$\Delta G^{0'} = 0 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 1$$

$$k_m^{atp} = 1.33 \text{ mM}$$

$$k_m^{adp} = 0.042 \text{ mM}$$

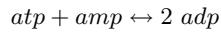
$$k_m^{utp} = 16 \text{ mM}$$

$$k_m^{udp} = 0.19 \text{ mM}$$

$$k_m^{gtp} = 0.15 \text{ mM}$$

$$k_m^{gdp} = 0.031 \text{ mM}$$

Adenylate kinase (AK) [138, 139, 122]



$$v_{12}([atp], [adp], [amp]) = \frac{\frac{v_{max}}{k_m^{atp} k_m^{amp}} \left([atp][amp] - \frac{[adp]^2}{k_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{[atp]}{k_m^{atp}} \right) \left(1 + \frac{[amp]}{k_m^{amp}} \right) + \frac{2[adp]}{k_m^{adp}} + \frac{[adp]^2}{(k_m^{adp})^2}} \quad (3.13)$$

$$\Delta G^{0'} = 3.6 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 0.25$$

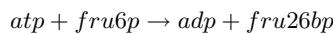
$$k_m^{atp} = 0.09 \text{ mM}$$

$$k_m^{amp} = 0.08 \text{ mM}$$

$$k_m^{adp} = 0.11 \text{ mM}$$

Phosphofructo kinase 2 (PFK2) [87, 90, 140, 141, 142]

Erste Reaktion des bifunktionellen PFK2/FBP2 Enzyms. Unterschiedliche Ratengleichungen für die phosphorylierte [p] und dephosphorylierte [dp] Form des Enzyms. Der Gesamtfluss ergibt sich durch Kombination von [p] und [dp] Form in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand $\gamma_{PFK2} \in [0, 1]$.



$$\begin{aligned} v_{13}^{dp}([fru6p], [atp]) &= v_{max}^{dp} \cdot \frac{[fru6p]^{n_{dp}}}{[fru6p]^{n_{dp}} + (k_{dp}^{fru6p})^{n_{dp}}} \cdot \frac{[atp]}{[atp] + k_{dp}^{atp}} \\ v_{13}^p([fru6p], [atp]) &= v_{max}^p \cdot \frac{[fru6p]^{n_p}}{[fru6p]^{n_p} + (k_p^{fru6p})^{n_p}} \cdot \frac{[atp]}{[atp] + k_p^{atp}} \\ v_{13}([fru6p], [atp]) &= (1 - \gamma_{pfk2}) \cdot v_{13}^{dp} + \gamma_{pfk2} \cdot v_{13}^p \end{aligned} \quad (3.14)$$

$$\Delta G^{0'} = -14.2 \text{ kJ/mol}$$

$$n_{dp} = 1.3$$

$$n_p = 2.1$$

$$k_{dp}^{fru6p} = 0.016 \text{ mM}$$

$$k_p^{fru6p} = 0.050 \text{ mM}$$

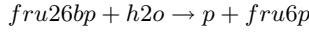
$$k_{dp}^{atp} = 0.28 \text{ mM}$$

$$k_p^{atp} = 0.65 \text{ mM}$$

$$v_{max}^p = v_{max}^n$$

Fructose-2,6-bisphosphatase (FBP2) [87, 90, 140, 141, 142]

Zweite Reaktion des bifunktionellen PFK2/FBP2 Enzyms. Die identische Signalfunktion $\gamma_{FBP2} = \gamma_{PFK2}$ reguliert den Fluss durch dephosphorylierte [dp] und phosphorylierte [p] Form des Enzyms.



$$\begin{aligned} v_{14}^{dp}([fru6p], [fru26bp]) &= \frac{v_{max}^{dp}}{1 + \frac{[fru6p]}{k_{i,dp}^{fru6p}}} \cdot \frac{[fru26bp]}{k_{m,dp}^{fru26bp} + [fru26bp]} \\ v_{14}^p([fru6p], [fru26bp]) &= \frac{v_{max}^p}{1 + \frac{[fru6p]}{k_{i,p}^{fru6p}}} \cdot \frac{[fru26bp]}{k_{m,p}^{fru26bp} + [fru26bp]} \\ v_{14}^p &= (1 - \gamma_{FBP2}) \cdot v_{14}^{dp} + \gamma_{FBP2} \cdot v_{14}^p \end{aligned} \tag{3.15}$$

$$\Delta G^{0'} = -16.3 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{m,dp}^{fru26bp} = 0.010 \text{ mM}$$

$$k_{m,p}^{fru26bp} = 0.0005 \text{ mM}$$

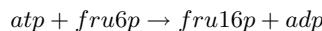
$$k_{i,dp}^{fru6p} = 0.0035 \text{ mM}$$

$$k_{i,p}^{fru6p} = 0.010 \text{ mM}$$

$$\gamma_{FBP2} = \gamma_{PFK2}$$

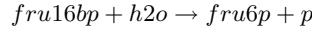
$$v_{max}^p = v_{max}^{dp}$$

Phosphofructo kinase 1 (PFK1) [143, 144, 145]



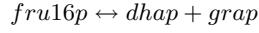
$$\begin{aligned} v_{15}([fru6p], [atp], [fru26bp]) &= \\ v_{max} \left(1 + \frac{[fru26bp]}{k_a^{fru26bp}} \right) \left(\frac{[fru6p][atp]}{k_i^{fru6p} \cdot k_m^{atp} + k_m^{fru6p} \cdot [atp] + k_m^{atp} \cdot [fru6p] + [atp] \cdot [fru6p]} \right) & \end{aligned} \tag{3.16}$$

$$\begin{aligned}\Delta G^{0'} &= -14.2 \text{ kJ/mol} \\ k_m^{atp} &= 0.111 \text{ mM} \\ k_m^{fru6p} &= 0.077 \text{ mM} \\ k_i^{fru6p} &= 0.012 \text{ mM} \\ k_a^{fru26bp} &= 0.001 \text{ mM}\end{aligned}$$

Fructose-1,6-bisphosphatase (FBP1) [146, 88]

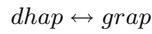
$$v_{16}([fru16bp], [fru26bp]) = \frac{v_{max}}{1 + \frac{[fru26bp]}{k_i^{fru26bp}}} \left(\frac{[fru16bp]}{[fru16bp] + k_m^{fru16bp}} \right) \quad (3.17)$$

$$\begin{aligned}\Delta G^{0'} &= -16.3 \text{ kJ/mol} \\ k_i^{fru26bp} &= 0.001 \text{ mM} \\ k_m^{fru16bp} &= 0.0013 \text{ mM}\end{aligned}$$

Aldolase (ALD) [147, 148, 149, 122]

$$v_{17}([fru16p], [dhap], [grap]) = \frac{\frac{v_{max}}{k_m^{fru16p}} \cdot \left([fru16p] - \frac{[grap][dhap]}{k_{eq}} \right)}{1 + \frac{[fru16p]}{k_m^{fru16p}} + \frac{[grap]}{k_{i1}^{grap}} + \frac{[dhap]([grap] + k_n^{grap})}{k_m^{dhap} \cdot k_{i1}^{grap}} + \frac{[fru16p][grap]}{k_m^{fru16p} k_{i2}^{grap}}} \quad (3.18)$$

$$\begin{aligned}\Delta G^{0'} &= 23.8 \text{ kJ/mol} \\ k_{eq} &= 0.0976 \text{ mM} \\ k_m^{fru16p} &= 0.0071 \text{ mM} \\ k_m^{dhap} &= 0.0364 \text{ mM} \\ k_m^{grap} &= 0.0071 \text{ mM} \\ k_{i1}^{grap} &= 0.0572 \text{ mM} \\ k_{i2}^{grap} &= 0.176 \text{ mM}\end{aligned}$$

Triosephosphate isomerase (TPI) [150, 151, 122]

$$v_{18}([dhap], [grap]) = \frac{v_{max}}{k_m^{dhap}} \cdot \left(\frac{[dhap] - \frac{[grap]}{k_{eq}}}{1 + \frac{[dhap]}{k_m^{dhap}} + \frac{[grap]}{k_m^{grap}}} \right) \quad (3.19)$$

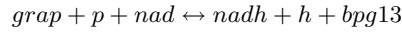
$$\Delta G^{0'} = 7.5 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 0.0545 \text{ mM}$$

$$k_m^{dhap} = 0.59 \text{ mM}$$

$$k_m^{grap} = 0.42 \text{ mM}$$

D-Glyceraldehyde-3-phosphate:NAD⁺ oxidoreductase (GAPDH, Glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase) [122]



$$v_{19}([grap], [p], [nad], [nadh], [bpg13]) = \frac{\frac{v_{max}}{k_{nad} \cdot k_{grap} \cdot k_p} \left([nad][grap][p] - \frac{[bpg13][nadh]}{k_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{[nad]}{k_{nad}} \right) \left(1 + \frac{[grap]}{k_{grap}} \right) \left(1 + \frac{[p]}{k_p} \right) + \left(1 + \frac{[nadh]}{k_{nadh}} \right) \left(1 + \frac{[bpg13]}{k_{bpg13}} \right) - 1} \quad (3.20)$$

$$\Delta G^{0'} = 6.3 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 0.0868 \frac{1}{\text{mM}}$$

$$k^{nad} = 0.05 \text{ mM}$$

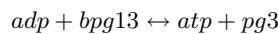
$$k^{grap} = 0.005 \text{ mM}$$

$$k^p = 3.9 \text{ mM}$$

$$k^{nadh} = 0.0083 \text{ mM}$$

$$k^{bpg13} = 0.0035 \text{ mM}$$

Phosphoglycerate kinase (PGK) [122]



$$v_{20}([adp], [atp], [bpg13], [pg3]) = \frac{\frac{v_{max}}{k_{adp} k_{bpg13}} \left([adp][bpg13] - \frac{[atp][pg3]}{k_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{[adp]}{k_{adp}} \right) \left(1 + \frac{[bpg13]}{k_{bpg13}} \right) + \left(1 + \frac{[atp]}{k_{atp}} \right) \left(1 + \frac{[pg3]}{k_{pg3}} \right) - 1} \quad (3.21)$$

$$\Delta G^{0'} = -5 \text{ kJ/mol} (-18.5 \text{ kJ/mol})$$

$$k_{eq} = 7 (1310)$$

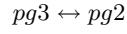
$$k^{adp} = 0.35 \text{ mM}$$

$$k^{bpg13} = 0.002 \text{ mM}$$

$$k^{atp} = 0.48 \text{ mM}$$

$$k^{pg3} = 1.2 \text{ mM}$$

3-Phosphoglycerate mutase (PGM) [122]



$$v_{21}([pg3], [pg2]) = \frac{v_{max} \left([pg3] - \frac{[pg2]}{k_{eq}} \right)}{[pg3] + k_{pg3} \left(1 + \frac{[pg2]}{k_{pg2}} \right)} \quad (3.22)$$

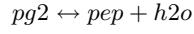
$$\Delta G^{0'} = 4.4 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 0.1814$$

$$k^{pg3} = 5 \text{ mM}$$

$$k^{pg2} = 1 \text{ mM}$$

Enolase (EN) [122]



$$v_{22}([pg2], [pep]) = \frac{v_{max} \left([pg2] - \frac{[pep]}{k_{eq}} \right)}{[pg2] + k_{pg2} \left(1 + \frac{[pep]}{k_{pep}} \right)} \quad (3.23)$$

$$\Delta G^{0'} = 7.5 \text{ kJ/mol}$$

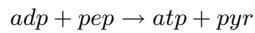
$$k_{eq} = 0.0545$$

$$k^{pg2} = 1 \text{ mM}$$

$$k^{pep} = 1 \text{ mM}$$

Pyruvate kinase (PK) [84, 152, 85, 153]

Unterschiedliche Ratengleichungen für die phosphorylierte [p] und dephosphorylierte [dp] Form des Enzyms. Der Gesamtfluss ergibt sich durch Kombination von [p] und [dp] Form in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand $\gamma_{PK} \in [0, 1]$.



$$\begin{aligned}
f^{dp} &= \frac{[fru16bp]^{n_{fbp}}}{[fru16bp]^{n_{fbp}} + (k_{fbp}^{dp})^{n_{fbp}}} \\
f^p &= \frac{[fru16bp]^{n_{fbp}}}{[fru16bp]^{n_{fbp}} + (k_{fbp}^{dp})^{n_{fbp}}} \\
\alpha_{inp}^{dp} &= (1 - f)(\alpha^{dp} - \alpha_{end}) + \alpha_{end} \\
\alpha_{inp}^p &= (1 - f)(\alpha^p - \alpha_{end}) + \alpha_{end} \\
k_{pep,inp}^{dp} &= (1 - f)(k_{pep}^{dp} - k_{pep}^{min}) + k_{pep}^{min} \\
k_{pep,inp}^p &= (1 - f)(k_{pep}^p - k_{pep}^{min}) + k_{pep}^{min} \\
v_{23}^{dp} &= v_{max} \alpha_{inp}^{dp} \left(\frac{[pep]^{n_{pep}}}{[pep]^{n_{pep}} + (k_{pep,inp}^{dp})^{n_{pep}}} \right) \left(\frac{[adp]}{[adp] + k_{adp}} \right) \left(a_{base}^{dp} + (1 - a_{base}^{dp})f^{dp} \right) \\
v_{23}^p &= v_{max} \alpha_{inp}^p \left(\frac{[pep]^{n_{pep}}}{[pep]^{n_{pep}} + (k_{pep,inp}^p)^{n_{pep}}} \right) \left(\frac{[adp]}{[adp] + k_{adp}} \right) \left(a_{base}^p + (1 - a_{base}^p)f^p \right) \\
v_{23}([pep], [adp]) &= (1 - \gamma_{PK}) \cdot v_{23}^{dp} + \gamma_{PK} \cdot v_{23}^p
\end{aligned} \tag{3.24}$$

$$\Delta G^{0'} = -31.4 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 1.74 \cdot 10^5$$

$$n^{pep} = 3.5$$

$$n^{fbp} = 1.8$$

$$k_{pep}^{dp} = 0.58 \text{ mM}$$

$$k_{pep}^p = 1.10 \text{ mM}$$

$$k_{pep}^{min} = 0.08 \text{ mM}$$

$$\alpha^{dp} = 1.0$$

$$\alpha^p = 1.1$$

$$\alpha_{end} = 1.0$$

$$k_{fbp}^{dp} = 0.16 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$$

$$k_{fbp}^p = 0.35 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$$

$$a_{base}^{dp} = 0.08$$

$$a_{base}^p = 0.04$$

$$k_{adp} = 2.3 \text{ mM}$$

Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) [154, 155]

Reaktion mit sehr ähnlicher Kinetik in Mitochondrium und Zytosol [154].



$$v_{24}([oaa], [gtp], [pep], [gdp], [co2]) = \frac{\frac{v_{max}}{k_m^{gtp} k_m^{oaa}} \left([oaa][gtp] - \frac{[pep][gdp][co2]}{k_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{[oaa]}{k_m^{oaa}} \right) \left(1 + \frac{[gtp]}{k_m^{gtp}} \right) + \left(1 + \frac{[pep]}{k_m^{pep}} \right) \left(1 + \frac{[gdp]}{k_m^{gdp}} \right) \left(1 + \frac{[co2]}{k_m^{co2}} \right) - 1} \quad (3.25)$$

$$v_{25}([oaa_mito], [gtp_mito], [pep_mito], [gdp_mito], [co2_mito]) = \frac{\frac{v_{max}}{k_m^{gtp} k_m^{oaa}} \left([oaa_mito][gtp_mito] - \frac{[pep_mito][gdp_mito][co2_mito]}{k_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{[oaa_mito]}{k_m^{oaa}} \right) \left(1 + \frac{[gtp_mito]}{k_m^{gtp}} \right) + \left(1 + \frac{[pep_mito]}{k_m^{pep}} \right) \left(1 + \frac{[gdp_mito]}{k_m^{gdp}} \right) \left(1 + \frac{[co2_mito]}{k_m^{co2}} \right) - 1} \quad (3.26)$$

$$\Delta G^{0'} = -15 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 337 \frac{1}{\text{mM}}$$

$$k_m^{pep} = 0.237 \text{ mM}$$

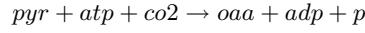
$$k_m^{gdp} = 0.0921 \text{ mM}$$

$$k_m^{co2} = 25.5 \text{ mM}$$

$$k_m^{oaa} = 0.0055 \text{ mM}$$

$$k_m^{gtp} = 0.0222 \text{ mM}$$

Pyruvate Carboxylase (PC) [91, 156]



$$v_{26}([pyr_mito][atp_mito][co2_mito][acoa_mito]) = \frac{v_{max} \left(\frac{[pyr_mito]}{k_m^{pyr} + [pyr_mito]} \right) \left(\frac{[atp_mito]}{k_m^{atp} + [atp_mito]} \right) \left(\frac{[co2_mito]}{k_m^{co2} + [co2_mito]} \right) \left(\frac{[acoa_mito]^n}{(k_m^{acoa})^n + [acoa_mito]^n} \right)}{(3.27)}$$

$$k_m^{atp} = 0.22 \text{ mM}$$

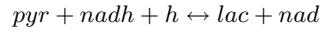
$$k_m^{pyr} = 0.22 \text{ mM}$$

$$k_m^{co2} = 3.2 \text{ mM}$$

$$k_m^{acoa} = 0.015 \text{ mM}$$

$$n = 2.5$$

Lactate dehydrogenase (LDH) [157, 158, 159]



$$v_{27}([lac], [pyr], [nad], [nad]) = \frac{\frac{v_{max}}{k_m^{pyr} k_m^{nad}} \left([pyr][nad] - \frac{[lac][nad]}{k_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{[nad]}{k_m^{nad}} \right) \left(1 + \frac{[pyr]}{k_m^{pyr}} \right) + \left(1 + \frac{[lac]}{k_m^{lac}} \right) \left(1 + \frac{[nad]}{k_m^{nad}} \right) - 1} \quad (3.28)$$

$$\Delta G^{0'} = 21.1 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 5.90 \cdot 10^{-5}$$

$$k_m^{pyr} = 0.495 \text{ mM}$$

$$k_m^{lac} = 31.98 \text{ mM}$$

$$k_m^{nad} = 0.984 \text{ mM}$$

$$k_m^{nad} = 0.027 \text{ mM}$$

Lactate transport (LacT)



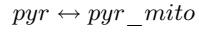
$$v_{28}([lac], [lac_ext]) = \frac{\frac{v_{max}}{k_m^{lac}} \left([lac_ext] - \frac{[lac]}{k_{eq}} \right)}{1 + \frac{[lac_ext]}{k_m^{lac}} + \frac{[lac]}{k_m^{lac}}} \quad (3.29)$$

$$\Delta G^{0'} = 0 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 1$$

$$k_m^{lac} = 0.8 \text{ mM}$$

Pyruvate transport (PyrT)



$$v_{29}([pyr], [pyr_mito]) = \frac{\frac{v_{max}}{k_m^{pyr}} \left([pyr] - \frac{[pyr_mito]}{k_{eq}} \right)}{1 + \frac{[pyr_mito]}{k_m^{pyr}} + \frac{[pyr]}{k_m^{pyr}}} \quad (3.30)$$

$$\Delta G^{0'} = 0 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 1$$

$$k_m^{pyr} = 0.1 \text{ mM}$$

PEP transport (PepT)



$$v_{30}([pep_mito], [pep]) = \frac{\frac{v_{max}}{k_m^{pep}} \left([pep_mito] - \frac{[pep]}{k_{eq}} \right)}{1 + \frac{[pep_mito]}{k_m^{pep}} + \frac{[pep]}{k_m^{pep}}} \quad (3.31)$$

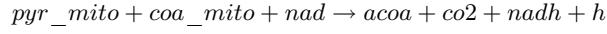
$$\Delta G^{0'} = 0 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 1$$

$$k_m^{pep} = 0.1 \text{ mM}$$

PDH [160, 161, 92, 162]

Unterschiedliche Ratengleichungen für die phosphorylierte [p] und dephosphorylierte [dp] Form des Enzyms. Der Gesamtfluss ergibt sich durch Kombination von [p] und [dp] Form in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand $\gamma_{PDH} \in [0, 1]$.



$$v_{31}^{dp}([pyr], [coa], [nad], [nadh], [acoa]) = \\ v_{max} \alpha_{dp} \left(\frac{[pyr]}{[pyr] + k^{pyr}} \right) \left(\frac{[nad]}{[nad] + k^{nad}(1 + \frac{[nadh]}{k_i^{nadh}})} \right) \left(\frac{[coa]}{[coa] + k^{coa}(1 + \frac{[acoa]}{k_i^{acoa}})} \right)$$

$$v_{31}^p([pyr], [coa], [nad], [nadh], [acoa]) = \\ v_{max} \alpha_p \left(\frac{[pyr]}{[pyr] + k^{pyr}} \right) \left(\frac{[nad]}{[nad] + k^{nad}(1 + \frac{[nadh]}{k_i^{nadh}})} \right) \left(\frac{[coa]}{[coa] + k^{coa}(1 + \frac{[acoa]}{k_i^{acoa}})} \right)$$

$$v_{23}([pyr], [coa], [nad], [nadh], [acoa]) = (1 - \gamma_{PDH}) \cdot v_{31}^{dp} + \gamma_{PDH} \cdot v_{31}^p \quad (3.32)$$

$$k^{pyr} = 0.025 \text{ mM}$$

$$k^{coa} = 0.013 \text{ mM}$$

$$k^{nad} = 0.050 \text{ mM}$$

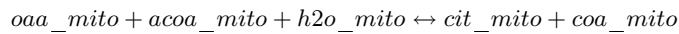
$$k_i^{acoa} = 0.035 \text{ mM}$$

$$k_i^{nadh} = 0.036 \text{ mM}$$

$$\alpha_{dp} = 5 \text{ mM}$$

$$\alpha_p = 1 \text{ mM}$$

Citrate synthase (CS) [163, 164, 165, 42]



$$v_{32}([oaa_mito], [acoa_mito], [cit_mito], [coa_mito]) = \\ \frac{\frac{v_{max}}{k^{oaa}k^{acoa}} \left([oaa_mito][acoa_mito] - \frac{[cit_mito][coa_mito]}{k_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{[oaa_mito]}{k^{oaa}} \right) \left(1 + \frac{[acoa_mito]}{k^{acoa}} \right) + \left(1 + \frac{[cit_mito]}{k^{cit}} \right) \left(1 + \frac{[coa_mito]}{k^{coa}} \right) - 1} \quad (3.33)$$

$$\Delta G^{0'} = -32.2 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 2.66E5$$

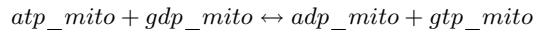
$$k^{oaa} = 0.002 \text{ mM}$$

$$k^{acoa} = 0.016 \text{ mM}$$

$$k^{cit} = 0.420 \text{ mM}$$

$$k^{coa} = 0.070 \text{ mM}$$

Nucleosid diphosphate kinase (GTP, UTP) (NDK) [135, 136, 137]



$$v_{33}([atp_mito], [adp_mito], [gtp_mito], [gdp_mito]) = \frac{\frac{v_{max}}{k_m^{atp} k_m^{gdp}} \left([atp_mito][gdp_mito] - \frac{[adp_mito][gtp_mito]}{k_{eq}} \right)}{(1 + \frac{[atp]}{k_m^{atp}})(1 + \frac{[gdp_mito]}{k_m^{gdp}}) + (1 + \frac{[adp_mito]}{k_m^{adp}})(1 + \frac{[gtp_mito]}{k_m^{gtp}}) - 1} \quad (3.34)$$

$$\Delta G^{0'} = 0 \text{ kJ/mol}$$

$$k_{eq} = 1$$

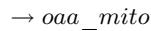
$$k_m^{atp} = 1.33 \text{ mM}$$

$$k_m^{adp} = 0.042 \text{ mM}$$

$$k_m^{gtp} = 0.15 \text{ mM}$$

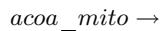
$$k_m^{gdp} = 0.031 \text{ mM}$$

Oxalacetate flux (OAAFLX)



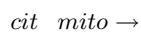
$$v_{34} = v_{max} \quad (3.35)$$

Acetyl-CoA flux (ACOAFLX)



$$v_{35} = v_{max} \quad (3.36)$$

Citrate flux (CITFLX)



$$v_{36} = v_{max} \quad (3.37)$$

3.3.3 Insulin und Glucagon - Dose-Response Kurven

Die Plasmakonzentration von Insulin und Glucagon ist abhängig von der Blutglucosekonzentration (Kap. 3.1.3). Die in dem Modell verwendeten Dose-Response Kurven wurden basierend auf experimentellen Daten in gesunden Personen und Patienten mit Diabetes Typ II aufgestellt [47, 166, 167, 66, 168] (s.a. Abb. 3.4, 3.1, 3.5).

Sowohl Insulin als auch die Glucagon besitzen eine sigmoidale Abhängigkeit von der Blutglucosekonzentration. Die experimentellen Daten wurden daher unter Verwendung einer Hill-Funktion gefittet, wobei die Informationen über Hill-Koeffizienten, Wendepunkte, Maximalwerte und Minimalwerte der Hormonantworten aus der Literatur berücksichtigt wurden.

Insulin Dose-Response Kurve

$$ins([glc_{ext}]) = ins_{base} + (ins_{max} - ins_{base}) \frac{[glc_{ext}]^n}{[glc_{ext}]^n + k_{glc}^n} \quad (3.38)$$

$$ins^{dia}([glc_{ext}]) = ins_{base}^{dia} + (ins_{max}^{dia} - ins_{base}^{dia}) \frac{[glc_{ext}]^{n^{dia}}}{[glc_{ext}]^{n^{dia}} + k_{glc}^{n^{dia}}} \quad (3.39)$$

$$ins_{max} = 520 \text{ pmol/l}$$

$$ins_{max}^{dia} = 270 \text{ pmol/l}$$

$$ins_{base} = 20 \text{ pmol/l}$$

$$ins_{base}^{dia} = 20 \text{ pmol/l}$$

$$k_{glc} = 8.33 \text{ mM}$$

$$k_{glc}^{dia} = 13 \text{ mM}$$

$$n = 5$$

$$n^{dia} = 5$$

Glucagon-Glucose Dose-response Kurve

$$glu([glc_{ext}]) = glu_{base} + (glu_{max} - glu_{base}) \left(1 - \frac{[glc_{ext}]^n}{[glc_{ext}]^n + k_{glc}^n} \right) \quad (3.40)$$

$$glu^{dia}([glc_{ext}]) = glu_{base}^{dia} \quad (3.41)$$

$$glu_{max} = 21 \text{ pmol/l}$$

$$glu_{base} = 12 \text{ pmol/l}$$

$$glu_{base}^{dia} = 25 \text{ pmol/l}$$

$$k_{glc} = 4.8 \text{ mM}$$

$$n = 20$$

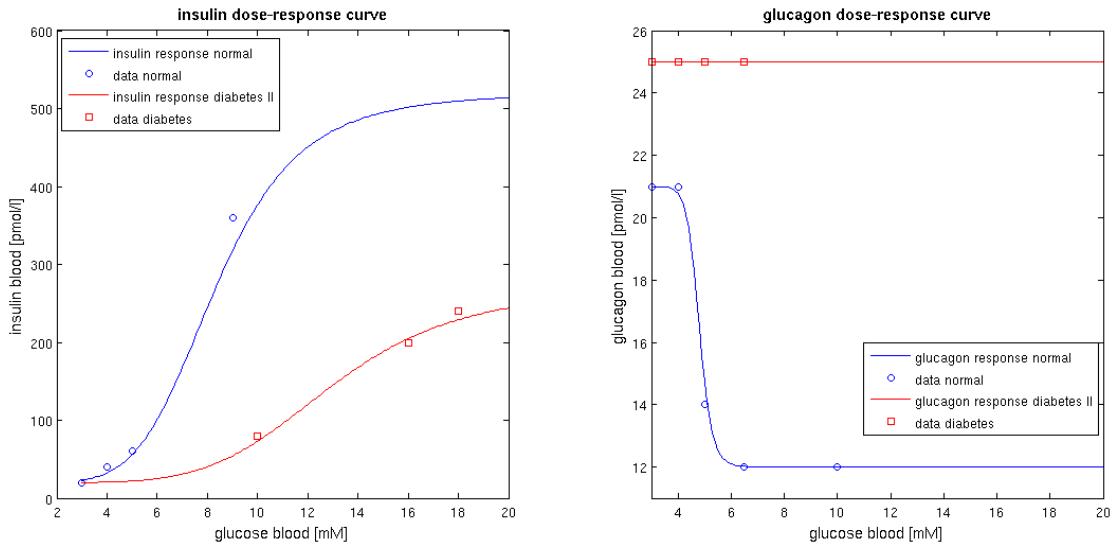


Abbildung 3.7: Dose-Response Kurven für Insulin und Glucagon in Abhängigkeit von der Blutglucosekonzentration. Neben den Dose-Response Kurven (Gl. 3.40, 3.41, 3.38, 3.39) sind auch die für den Fit verwendeten experimentellen Daten aus [47, 166] abgebildet. Deutlich sind die Unterschiede in den Dose-Response Kurven zwischen gesunden Personen und Patienten mit Diabetes Typ II zu erkennen.

Die Dose-Response Kurven (Gl. 3.40, 3.41, 3.38, 3.39) sind zusammen mit den experimentellen Daten in Abb. 3.7 dargestellt.

Sowohl Insulin als auch Glucagon haben eine minimale und maximale Hormonkonzentration und sigmoidales Verhalten.

Insulin ist positiv mit der Blutglucosekonzentration korreliert, Glucagon negativ. Weiterhin unterscheiden sich die Kurven für Insulin und Glucagon in den Glucosekonzentrationen am Wendepunkt und den Hill-Koeffizienten.

Für Glucagon liegt der Wendepunkt bei normalen Personen mit 4.8 mM knapp unter dem Sollwert der Glucose (5 mM). Bereits bei geringem Abfall unter den Sollwert erfolgt daher eine starke Änderung in der Glucagonkonzentration. Im Fall des Insulin liegt der Wendepunkt bei einer deutlich erhöhten Glucosekonzentrationen (8.33 mM). Die stärkste Änderung in der Insulinantwort erfolgt daher erst bei deutlich hyperglycämischen Bedingungen.

Auch die Hillkoeffizienten unterscheidet sich für Insulin und Glucagon deutlich. Glucagon zeigt deutlich stärkeres Schalterverhalten ($n = 20$), das Umschalten von basaler auf maximale Insulinantwort erfolgt dagegen deutlich langsamer ($n = 5$).

Die Folge dieser unterschiedlichen Wendepunkte und Hillkoeffizienten ist eine deutlich unterschiedliche Antwort von Insulin und Glucagon bei Abweichungen von euglycämischen Bedingungen. Die Insulinantwort konzentriert sich auf hyperglycämische Bedingungen und erfolgt bei Erhöhung des Blutglucosespiegels über 5 mM deutlich langsamer als die entsprechende Antwort

des Glucagons bei Erniedrigung unter 5 mM. Bei Abfall unter 5 mM ändert sich die Insulinkonzentration nur noch unbedeutend. Im Gegensatz zum Insulin konzentriert sich die Veränderung der Glucagonkonzentration auf hypoglycämische Bedingungen und das Umschalten auf maximale Glucagonantwort erfolgt bereits bei deutlich geringeren Auslenkungen von Glucosesollwert als beim Insulin.

Durch den im Vergleich zum Glucagon geringen Hillkoeffizienten ändert sich die Insulinkonzentration auch noch bei sehr hohen Glucosekonzentrationen.

Die Insulin- und Glucagonkonzentrationen im Fastenzustand und nach Glucoseladung (postprandial) unterscheiden sich deutlich zwischen normalen Personen und Patienten mit Diabetes Typ II (Abb. 3.4). Die Insulinantwort fällt deutlich geringer als bei gesunden Patienten aus, die Glucagonkonzentration ist erhöht. Die Dose-Response Kurven für Insulin und Glucagon unterscheiden sich daher stark zwischen gesunden Personen und Patienten mit Diabetes Typ II (Abb. 3.7).

In der diabetischen Insulin Dose-Response Kurve ist einerseits die maximale Insulinantwort deutlich erniedrigt (270 pmol/l statt 520 pmol/l), andererseits auch der Wendepunkt zu einer deutlich höheren Glucosekonzentration verschoben (13 mM statt 8.33 mM). Hierdurch erfolgt eine deutlich geringer Insulinantwort bei Diabetes Typ II, als in gesunden Personen. Eine Änderung der Glucagonkonzentration bei Erhöhung der Glucosekonzentration kann nicht beobachtet werden, die Glucagon Dose-Response Kurve ist konstant.

3.3.4 Signalfunktion γ

Die Hormone Insulin und Glucagon binden an Rezeptoren in der Plasmamembran. Über verschiedene Signalkaskaden führen die hormonellen Signale zu veränderten Aktivitäten von Proteinkininasen und -kinasen (z.B. cAMP abhängige PKA) und letztendlich zu Veränderungen im Phosphorylierungszustand interkonvertierbarer Enzyme. Die Zwischenschritte der Signalweiterleitung von den Bluthormonkonzentrationen zur Veränderung des Phosphorylierungszustand wird in dem Modell durch ein vereinfachte Signalfunktion beschrieben.

Der phosphorylierte Anteil des interkonvertierbaren Enzyms ist $\gamma \in [0, 1]$, der Anteil unphosphorylierten Enzyms $(1 - \gamma) \in [0, 1]$. Die Signalfunktion definiert die funktionelle Abhängigkeit des phosphorylierten Anteils der interkonvertierbaren Enzyme von Insulin und Glucagon, also die Funktion $\gamma([ins], [glu])$.

Die Signalfunktion soll die folgenden Eigenschaften erfüllen:

1. Insulin erhöht den Phosphorylierungsgrad, d.h. γ ist eine monoton steigende Funktion in der Insulinvariable.
2. Glucagon erniedrigt den Phosphorylierungsgrad, d.h. γ ist eine monoton fallende Funktion in der Glucagonvariable.

3. Relative Insulin- und Glucagonänderungen bewirken jeweils gleich große Veränderungen im Phosphorylierungsgrad (beide Hormone wirken gleichberechtigt).
4. Bei maximaler Insulinkonzentration und minimaler Glucagonkonzentration, sind die interkonvertierbaren Enzyme vollständig dephosphoryliert ($\gamma = 0$)
5. Bei maximaler Glucagonkonzentration und minimaler Insulinkonzentration sind die interkonvertierbaren Enzyme vollständig phosphoryliert ($\gamma = 1$).

Die einfachste Funktion, die diese Bedingungen erfüllt, ist eine lineare Abhängigkeit von γ von der relativen Insulin- und Glucagonkonzentration (Abb. 3.8, Gl. 3.42).

$$\gamma([ins], [glu]) = 0.5(1 - rel_{ins} + rel_{glu}) \quad (3.42)$$

Die relativen Hormonkonzentrationen ergeben sich durch Normierung der jeweiligen Antwort im Intervall [basale Hormonantwort, maximale Hormonantwort] im gesunden Patienten. Werte, die unterhalb der basalen Konzentration liegen, haben nur die basale Hormonwirkung, Werte die oberhalb der maximalen Hormonantwort liegen haben maximale Hormonantwort.

$$rel_{ins}([ins]) = \frac{[ins] - ins_{base}}{ins_{max} - ins_{base}} \quad (3.43)$$

$$rel_{glu}([glu]) = \frac{[glu] - glu_{base}}{glu_{max} - gluc_{base}} \quad (3.44)$$

Weiterhin wurde in dem Modell angenommen:

1. Die hormonelle Änderung des Phosphorylierungszustands erfolgt instantan, d.h. Veränderungen in den hormonellen Signalen bewirken ohne zeitliche Verzögerung einen veränderten Phosphorylierungszustand der Enzyme. In experimentellen Arbeiten erfolgt die Wirkung von Insulin und Glucagon auf den Phosphorylierungszustand im Bereich von einigen Minuten.
2. Die Wirkung der Hormone auf alle interkonvertierbaren Enzyme sind identisch, d.h. für alle interkonvertierbaren Enzyme wird dieselbe Signalfunktion verwendet ($\gamma = \gamma_{PDK2} = \gamma_{FBP2} = \gamma_{GS} = \gamma_{GP} = \gamma_{PK} = \gamma_{PDH}$).

In der Zelle existieren unterschiedliche Signalfunktionen, da beispielsweise die verschiedenen interkonvertierbaren Enzyme unterschiedlich gute Substrate für die Proteinkinasen und Phosphatasen sein können. Weiterhin sind die Signalwege, die zur Phosphorylierung/Dephosphorylierung führen nicht für alle interkonvertierbaren Enzyme identisch (beispielsweise Phosphorylierung von GS durch die GSK3).

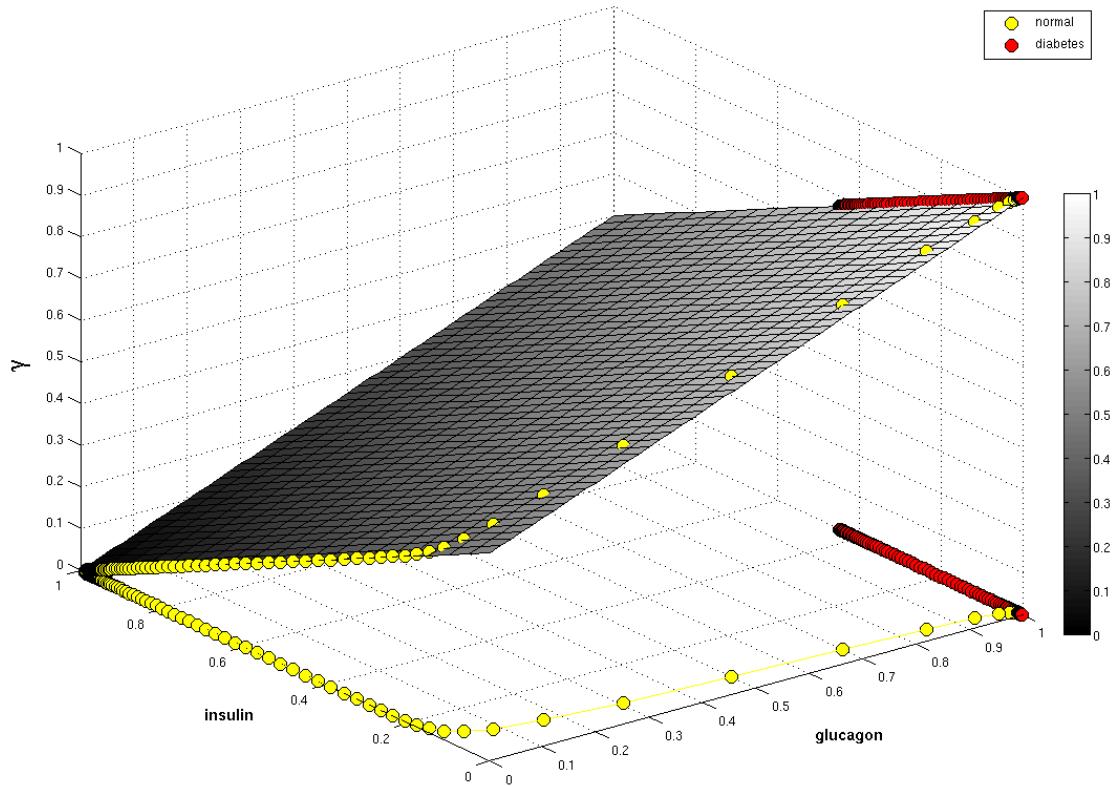


Abbildung 3.8: Lineare Signalfunktion γ . Die graue Ebene (Gl. 3.42) veranschaulicht den linearen Zusammenhang zwischen relativer Insulinkonzentration, relativer Glucagonkonzentration und dem Phosphorylierungszustand der interkonvertierbaren Enzyme. Zusätzlich sind, die bei Veränderung der Glukosekonzentration von 3 - 20 mM in Schritten von jeweils 0.2 mM resultierenden γ für normale Personen und Patienten mit Diabetes Typ II abgebildet. Die Insulin- und Glucagon Dose Response Kurven zur Bestimmung der absoluten Insulin und Glucagon Konzentrationen in Abhängigkeit von der Blutglukosekonzentration verwendet (Abb.3.7). Die Kurven sind einerseits direkt in der Ebene abgebildet, zusätzlich, um den Veränderung der relativen Insulin- und Glucagonwerte besser zu verdeutlichen auch noch in der Ebene $\gamma = 0$.

Analyse der Signalfunktion In der Abb. 3.9 sind die relativen Insulinkonzentrationen (A), die relativen Glucagonkonzentrationen (B) basierend auf den jeweiligen Dose-Response Kurven, sowie die resultierende Veränderung im Phosphorylierungszustand γ (C) bei Veränderung des Blutglucosespiegels dargestellt. Die Veränderung des Blutglucosespiegels führt zu einer Veränderung der Insulin und Glucagonkonzentrationen im Plasma (Dose-Response Kurven), welche wiederum, den Phosphorylierungszustand γ der interkonvertierbaren Enzyme verändern.

Zusätzlich zu Abb. 3.9C ist die Abhängigkeit von γ vom Blutglucosespiegel auch in Abb. 3.8 dargestellt. Bei 3 mM Blutglucose (und niedriger) liegen die interkonvertierbaren Enzyme voll-

ständig phosphoryliert vor. Bei ansteigender Glucose sinkt γ monoton ab.

Auffällig ist das zweiphasige Verhalten von γ . Bei Absinken der Blutglucose unter 5 mM erfolgt eine starke Glucagonantwort innerhalb eines kleinen Glucoseintervalls, welche die interkonvertierbaren Enzyme beim Absinken auf 3 mM vollständig phosphoryliert. Beim Anstieg über 5 mM erfolgt dagegen eine deutlich schwächere Insulinantwort über ein deutlich größeres Glucoseintervall. Mit steigender Blutglucosekonzentration nimmt der Phosphorylierungsgrad der Enzyme immer weiter ab.

Die unterschiedlich starken Veränderungen in γ sind sehr gut in der Schrittweisen Veränderung der Glucosekonzentration um 0.2 mM in Abb. 3.8 zu erkennen. Zunächst erfolgt eine sehr große Änderung entlang der Glucagonachse und anschließend oberhalb von 5 mM eine langsame Veränderung in γ entlang der Insulinachse.

Die unterschiedlich starke Antwort bei hyperglycämischen und hypoglycämischen Bedingungen könnte eine physiologische Bedeutung haben. Die Versorgung des Gehirns muss unter allen Umständen sichergestellt werden (auch wenn der Insulinschalter nicht gut funktioniert). Glucagon dient als Notfallsignal, das bereits bei geringem Abfall der Blutglucosekonzentration unter den Sollwert auf HGP umschaltet und eine starke Wirkung hat.

Die Insulinantwort muss dagegen in der Lage sein v.a. auf sehr unterschiedliche Nahrungszusammensetzung und auch Glucosemengen reagieren zu können. Die hyperglycämischen Bedingungen postprandial können sehr unterschiedlich sein. Daher ist es für den Organismus sinnvoll auf ein großes Intervall unterschiedlicher hyperglycämischer Bedingungen mit verschiedenen Insulinantworten reagieren zu können. Hyperglycämische Bedingungen stellen keine akute Bedrohung für den Organismus dar (Glucosetoxyzität hat langfristige Effekte), daher muss nicht sofort extrem gegen Abweichungen gegen gesteuert werden, sondern für den Organismus könnte es wichtiger sein, auf eine große Spanne unterschiedlicher hyperglycämischer Bedingungen reagieren zu können.

Neben der diskutierten und in den Simulationen verwendeten linearen Signalfunktionen, wurden auch noch sigmoidale Signalfunktionen ausgetestet. Diese sind in Abb. 3.9 D. dargestellt. Mit zunehmenden Hillkoeffizienten ist das System immer schlechter in der Lage auf kleine hyperglycämische Abweichungen von Stellwert zu reagieren, es bildet sich ein γ Plateau im Bereich von 6-8 mM. Der Hepatozyt muss allerdings in der Lage sein auf Veränderungen vom Sollwert sowohl in hyper- als und hypoglycämischer Richtungen zu reagieren. Für sämtliche Simulationen wurde die lineare Signalfunktion verwendet.

Die γ Abhängigkeit von der Blutglucosekonzentration bei Patienten mit Diabetes Typ II unterscheidet sich gravierend von normalen Personen. Eine Umschaltung erfolgt nicht, die interkonvertierbaren Enzyme sind selbst bei sehr hohen Glucosekonzentrationen noch fast vollständig phosphoryliert (Abb. 3.8, Abb. 3.9).

3.3.5 Interkonvertierbare Enzyme

Die Kinetiken der interkonvertierbaren Enzyme unterscheiden sich im phosphorylierten (v_p) und dephosphorylierten (v_{dp}) Zustand. Die Gesamtkinetik setzt sich in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsgrad γ aus den Einzelkinetiken nach

$$v = \gamma \cdot v_p + (1 - \gamma) \cdot v_{dp} \quad (3.45)$$

zusammen.

Glykogensynthase (GS) Für die GS sind in Abb. 3.10 die Unterschiede in den kinetischen Eigenschaften zwischen (v_p) und (v_{dp}) dargestellt. Durch die Phosphorylierung wird einerseits die Affinität für das Substrat *udpglc* erhöht, andererseits auch die Abhängigkeit vom allosterischen Effektor *glc6p* verändert. Insbesondere im physiologischen Bereich der Konzentrationen von *udpglc* und *glc6p* (zwischen 0 - 1 mM Abb. 3.10 oben) unterscheiden sich die Flüsse durch die GS beträchtlich. Durch die Interkonvertierung kann daher zwischen einem Zustand der Glykogensynthase (Synthase D) und deutlich geringerer Glykogensynthase (Synthase I) umgeschaltet werden.

Pyruvatkinase (PK) Der Fluss durch die PK hängt unter anderem von der *pep* und *fru16bp* Konzentration ab. Die Abhängigkeit von der *pep* Konzentration ist dabei sigmoidal. Durch die Phosphorylierung werden die Affinitäten für das Substrat *pep* und den allosterischen Aktivator *fru16bp* gesenkt, wodurch der Fluss durch die PK bei identischen Metabolitkonzentrationen erhöht wird. Durch die sigmoidale *pep* Abhängigkeit wird dadurch der Schaltpunkt von niedriger zu hoher PK Aktivität hin zu höheren *pep* Konzentrationen verschoben.

Starken Einfluss hat die Veränderung in den Affinitäten für den allosterischen Aktivator *fru16bp*. Die Unterschiede zwischen dephosphorylierter und phosphorylierter Form ist für *fru16bp* Konzentrationen um $\sim 0.3 \mu\text{M}$ am stärksten. Bei sehr niedrigen *fru16bp* Konzentrationen ist die PK praktisch inaktiv. Dieser Schaltvorgang erfolgt für die phosphorylierte PK erst bei höheren *fru16pb* Konzentrationen als in der dephosphorylierten PK.

Übersicht der veränderten kinetischen Eigenschaften der interkonvertierbaren Enzyme Neben der GS und PK unterscheiden sich auch die kinetischen Eigenschaften von dephosphorylierter und phosphorylierter Form der übrigen interkonvertierbaren Enzyme (Tab. 3.4). Die Enzyme der HGU (GS, PFK2, PDH und PK) werden alle im phosphorylierten Zustand im Vergleich zum dephosphorylierten Zustand aktiviert, die Enzyme der HGP (GP, FBP2) durch Phosphorylierung dagegen inaktiviert. Die interkonvertierbaren Enzyme werden durch die Phosphorylierung/Dephosphorylierung in konzertierter Weise reziprok reguliert.

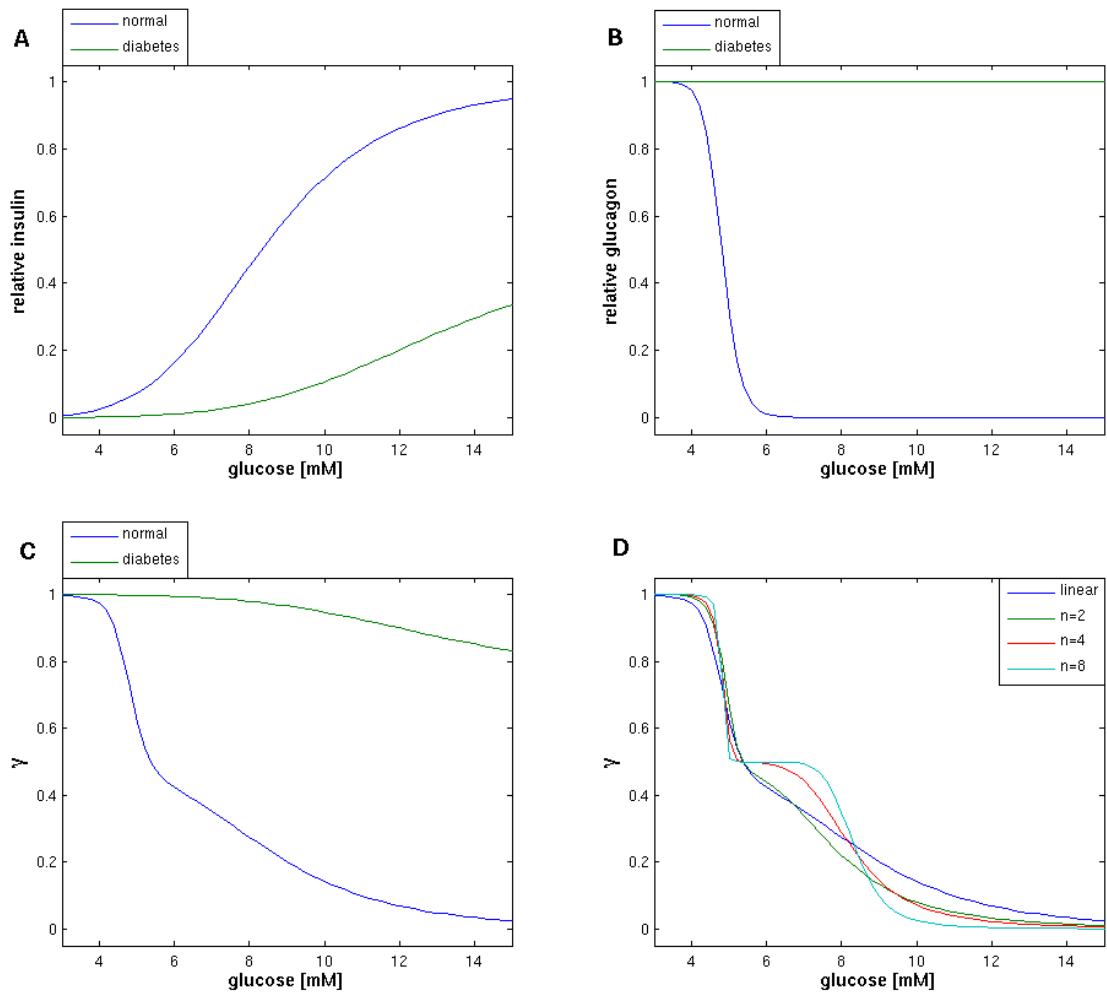


Abbildung 3.9: A) Relative Insulinantwort, B) relative Glucagonantwort und C) γ in Abhängigkeit von der Blutglucosekonzentration. D) Verschiedene getestete Signalfunktionen γ .

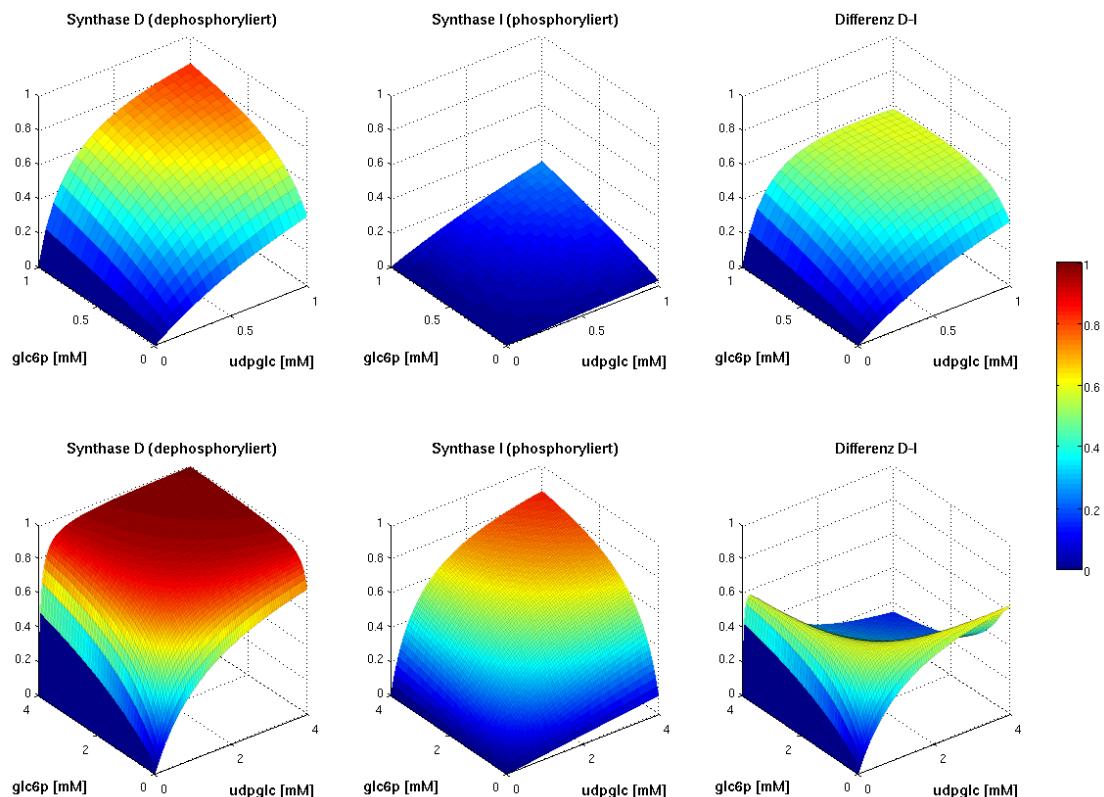


Abbildung 3.10: Unterschiedliche kinetische Eigenschaften der phosphorylierten und dephosphorylierten GS (Gl. 3.9). Relativer Fluss ($\frac{v}{V_{max}}$) in Abhängigkeit von udpglc und dem allosterischen Effektor glc6p. Variation udpglc und glc6p zwischen 0 - 1 mM (oben), zwischen 0 - 4 mM (unten). Dephosphorylierte GS (links), phosphorylierte GS (mitte) und Unterschied der beiden Formen (rechts). Deutlich sind die großen Flussunterschiede bei physiologischen Konzentrationen von udpglc und glc6p im Bereich von 0.5 mM zu erkennen.

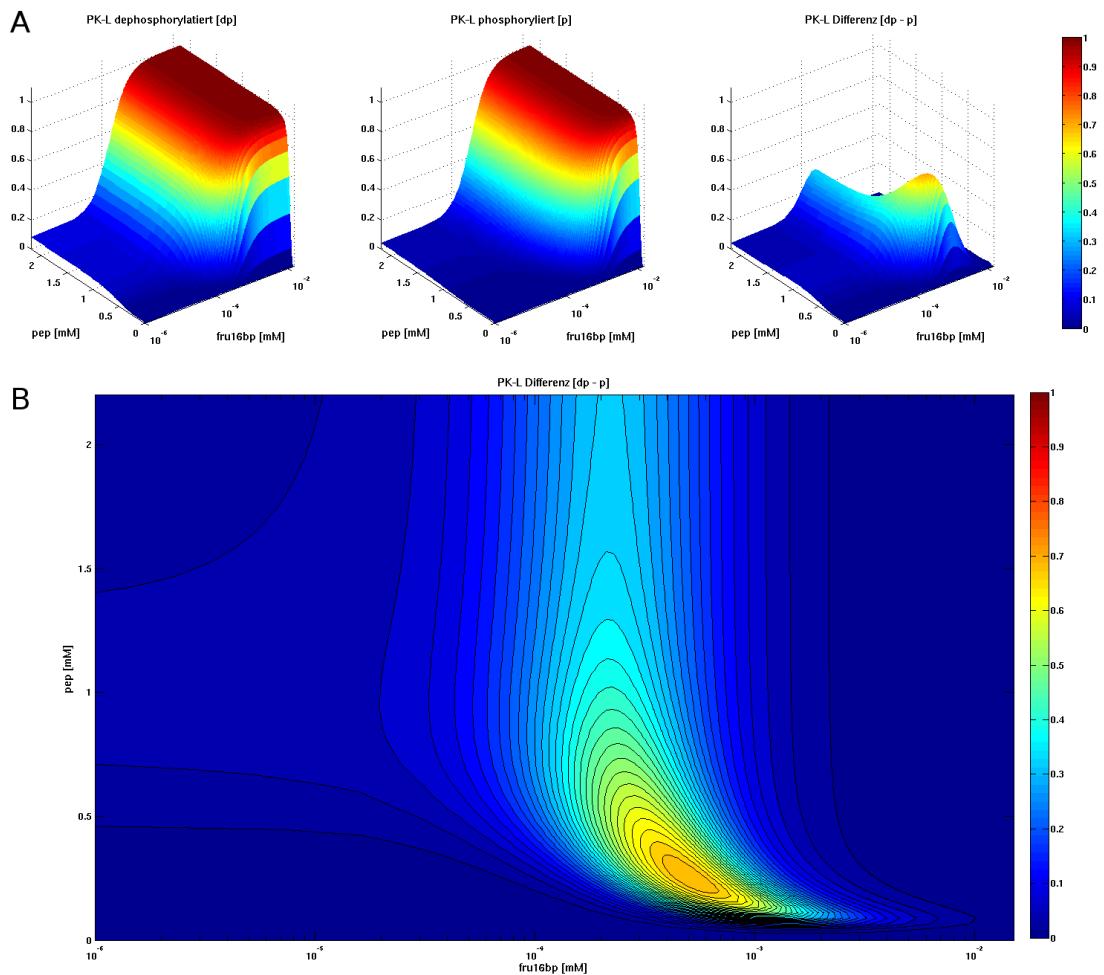


Abbildung 3.11: Unterschiede in den kinetischen Eigenschaften zwischen dephosphorylierter und phosphorylierter Pyruvatkinase (PK) (Gl. 3.9). Dephosphorylierte PK (A links), phosphorylierte PK (A mittte) und Differenz (A rechts u. B) Die fru16bp Konzentration ist in logarithmischer Skala aufgetragen. Im Bereich um 0.25 mM pep und 0.3 μ M fru26bp sind die Unterschiede auf Grund der Phosphorylierung am größten.

Enzym	HGP/HGU	dephosphoryliert	phosphoryliert	Änderungen durch Phosphorylierung
GS (Gl. 3.9)	HGU	niedrigere Affinität für udpglc	höhere Affinität für udpglc	Inaktivierung niedrigere Affinität für Substrat unterschiedliche Aktivierung durch glc6p
GP (Gl. 3.10)	HGP	niedrigeres V_{max} kein Effekt glc Aktivierung durch amp etwas geringere Affinität glycogen viel geringere Affinität glc1p viel geringere Affinität p	höheres V_{max} Aktivierung durch glc kein Effekt amp etwas höhere Affinität glycogen viel höhere Affinität glc1p viel höhere Affinität p	Aktivierung erhöhtes V_{max} unterschiedliche allosterische Effektoren veränderte Affinitäten für Substrate und Produkte
FBP2 (Gl. 3.15)	HGP	geringere Affinität fru26bp höhere Affinität für fru6p	höhere Affinität fru26bp geringere Affinität für Aktivator fru6p	Aktivierung höhere Affinität für Substrat geringere Inaktivierung durch fru6p
PFK2 (Gl. 3.14)	HGU	höhere Affinität für fru6p höhere Affinität für atp	geringere Affinität für fru6p geringere Affinität für atp	Inaktivierung geringere Affinität für Substrate
PDH (Gl. 3.32)	HGU	höheres V_{max}	niedrigeres V_{max}	Inaktivierung Verminderung V_{max}
PK (Gl. 3.24)	HGU	höhere Affinität für pep höhere Affinität für Aktivator fru16p	niedrigere Affinität für pep geringere Affinität für Aktivator fru16p	Inaktivierung geringer Affinität für substrate geringer Aktivierung durch fru16p

Tabelle 3.4: Unterschiedliche kinetische Eigenschaften der interkonvertierbaren Enzyme in phosphorylierter und dephosphorylierter Form. Die Veränderungen sind sehr unterschiedlich und reichen von veränderten V_{max} über veränderte Affinitäten für Substrate und Produkte bis zu unterschiedlichen Aktivierungs- / Inaktivierungsmechanismen durch allosterische Effektoren. Die interkonvertierbaren Enzyme der HGU werden durch Phosphorylierung aktiviert, die Enzyme der HGP inaktiviert.

Die Aktivierung oder Inaktivierung erfolgt nicht durch ein gemeinsames Prinzip, sondern diese werden durch sehr unterschiedliche Mechanismen erreicht. Die kinetischen Veränderungen reichen von veränderten Affinitäten (halbmaximal Konstanten) für Substrate, Produkte und allosterische Effektoren, über Veränderungen in den Maximalgeschwindigkeiten V_{max} bis hin zu unterschiedlichen allosterischen Regulatoren im phosphorylierten und dephosphorylierten Zustand. Die Veränderung in den kinetischen Eigenschaften ist jeweils enzymspezifisch.

Weiterhin auffällig ist, dass nicht alle enzymatischen Reaktionen, die charakteristisch für HGU oder HGP sind durch Interkonvertierungsmechanismen reguliert werden. Insbesondere die GK und die G6Pase, sowie die PEPCK werden nach derzeitigem Wissensstand nicht durch Phosphorylierungs- / Dephosphylierungsmechanismen reguliert.

3.4 Simulationen

Hypothesen

1. Der Hepatozyt ist in der Lage zwischen HGP und HGU in Abhängigkeit von Glucose, Insulin und Glucagon im Blut umzuschalten. Für den Schaltprozess sind die schnellen Regulationen über interkonvertierbare Enzyme und allosterische Effektoren ausreichend. Veränderung der Genexpression von Schlüsselenzyme ist nicht notwendig für den Schaltprozess.
2. Der Glykogenspeicher wird bei HGP geleert und bei HGU gefüllt. Durch den Glykogenspeicher kann die Aufgabe der Blutglucosehomöostase besser erfüllt werden.
3. Bei gestörten Insulin und Glucagonsignalen ist auch der Umschaltprozess zwischen HGP und HGU gestört. Im Fall von Diabetes Typ II führt diese Störung zu einer erhöhten HGP. Durch Insulingabe kann die Störung teilweise wieder behoben werden.
4. Die Änderung der Genexpression führt zu einer Optimierung des jeweils geschalteten Zustands. Futile Cycles werden hierdurch minimiert.

3.4.1 Umschalten zwischen HGU und HGP

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob der Hepatozyt in der Lage ist zwischen Glucoseproduktion (HGP) bei hypoglycämischen Bedingungen und Glucoseaufnahme (HGU) bei hyperglycämischen Bedingungen umzuschalten, wurde die Blutglucosekonzentration bei ansonsten identischen Bedingungen variiert.

Für die hypoglycämische Simulation wurde die externe Glucosekonzentration auf 3.5 mM gesetzt, für die hyperglycämische Simulation auf 8 mM. Der Glykogenspeicher zu Beginn der Simulationen war jeweils ungefähr zur Hälfte gefüllt (220 mM glyglc von maximal 500 mM glyglc), die Blutlaktatkonzentration betrug 0.8 mM. Die hypoglycämische Simulation wird im folgenden als HGP Simulation bezeichnet, die hyperglycämische Simulation als HGU Simulation.

HGP Simulation [3.5 mM] Die zeitabhängigen Veränderungen in den Konzentrationen der HGP Simulation sind in Abb. 3.12, die zugehörigen Flüsse in Abb. 3.13 dargestellt. Die Flüsse zu unterschiedlichen Zeitpunkten sind in Abb. 3.14 abgebildet.

Das Modell ist in der Lage HGP bei Blutglucosekonzentrationen von 3.5 mM zu betreiben. Der Fluss durch GLUT2 ist über den gesamten Zeitverlauf negativ, Glucose wird an die Blutbahn abgegeben. Der Glykogenspeicher wird im Laufe der Zeit vollständig geleert. Auch nachdem kein Glykogen mehr vorhanden ist, kann der Hepatozyt weiterhin HGP betreiben, die Glucose stammt unter diesen Bedingungen vollständig aus der Gluconeogenese.

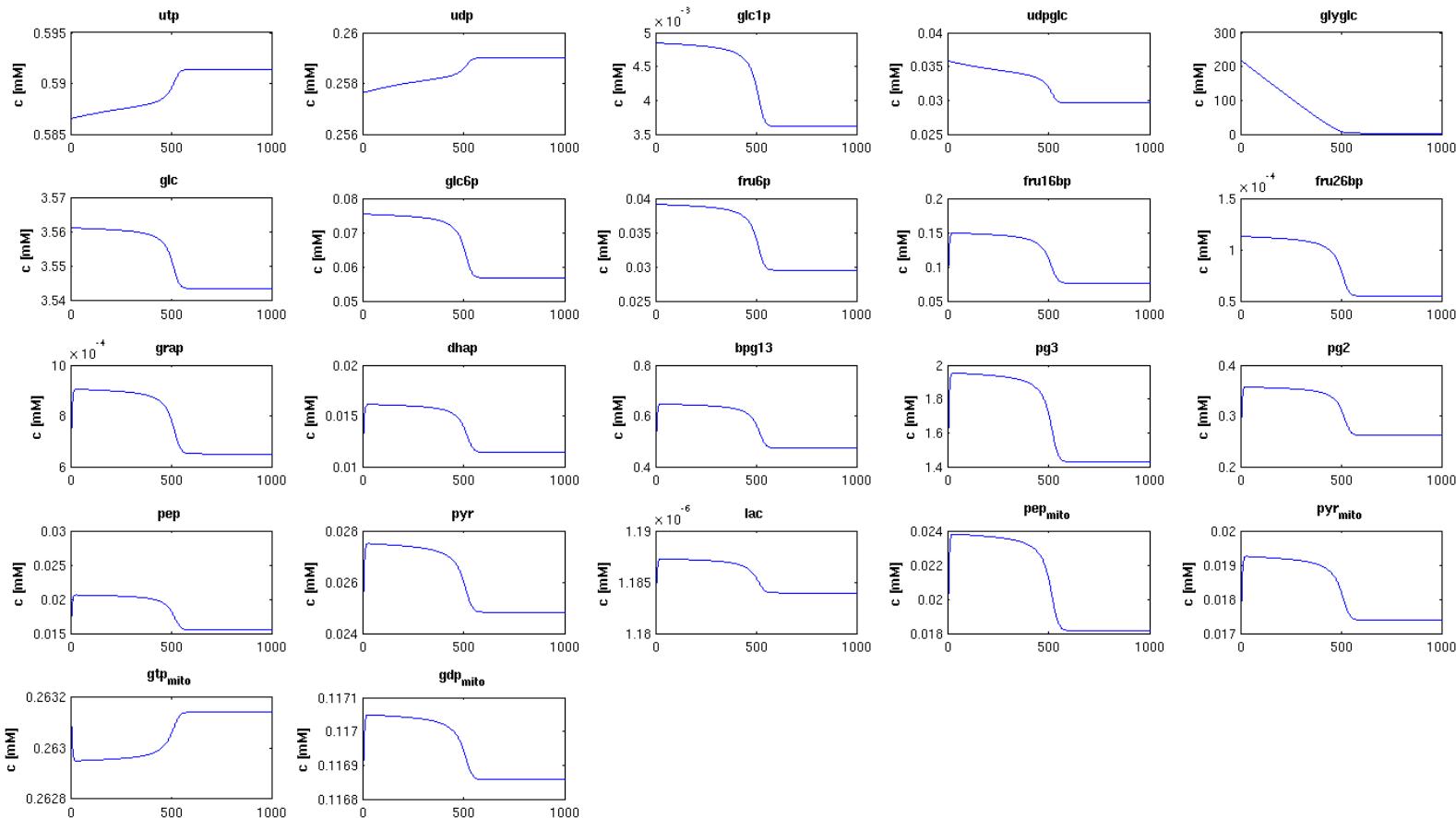


Abbildung 3.12: Konzentrationsverlauf der HGP Simulation [3.5mM Blutglucose, 0.8 mM Blutlaktat]. Konzentrationen in [mM], Zeit t in [min]. Auffällig ist das Umschalten zwischen einer ersten Phase des Glykogenabbaus und einer zweiten Phase mit leeren Glykogenspeichern.

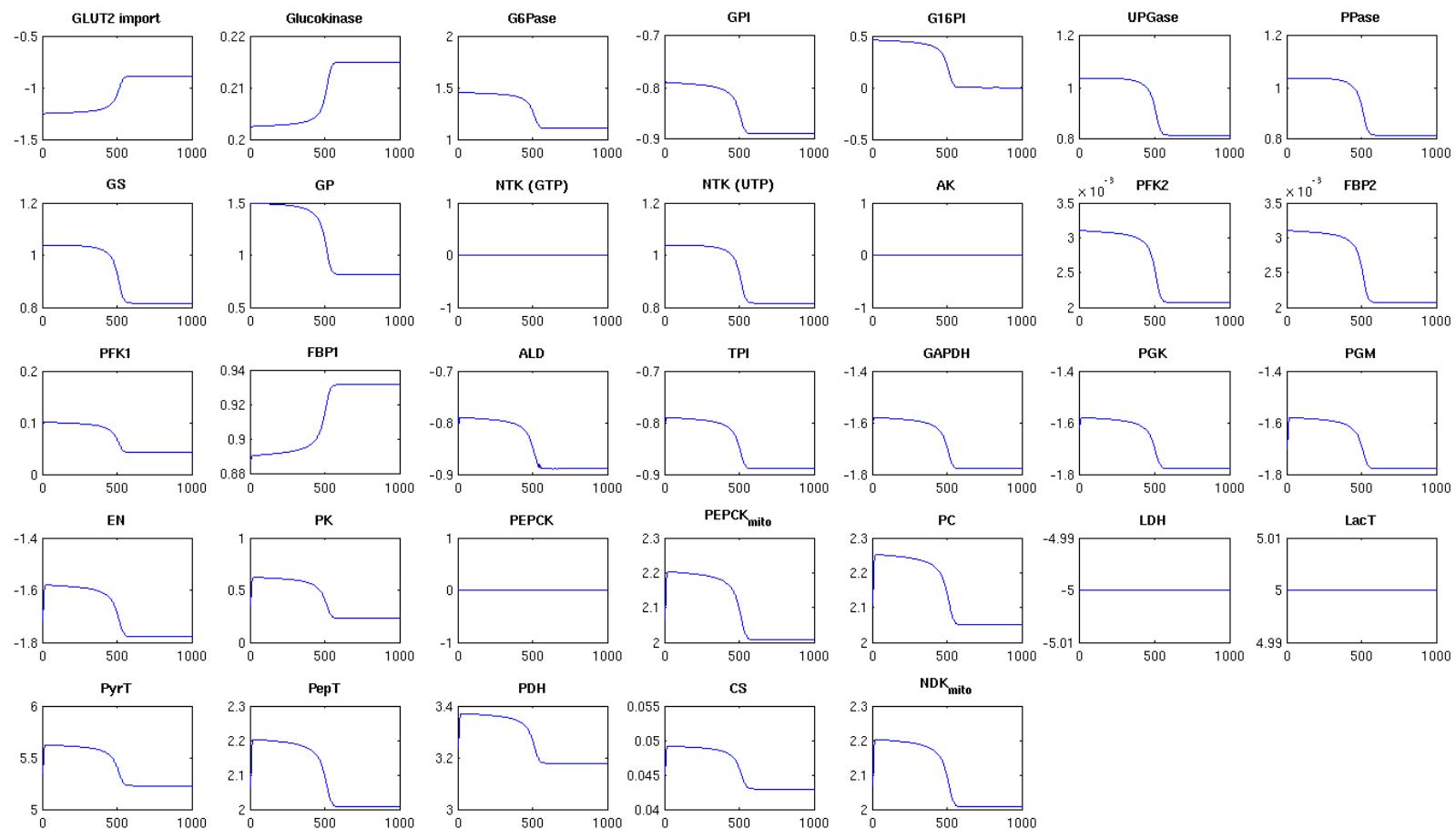


Abbildung 3.13: Flüsse in der HGP Simulation [3.5 mM Blutglucose, 0.8 mM Blutlaktat]. Flüsse in [$\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{min}$], Zeit t in [min]. Deutlich ist eine erste Phase des Glykogenabbaus und eine zweite Phase mit leeren Glykogenspeichern zu erkennen. Fluss durch AK ist 0, da ATP und ADP konstant und keine AMP bildenden Reaktionen in dem Modell enthalten sind. Fluss durch PEPCK und NTK (GTP) 0, da mitochondriale PEPCK verwendet wird.

Sowohl in den Konzentrationen, als auch in den Flüssen ist eine deutlich zweiphasiges Verhalten zu erkennen, das in direktem Zusammenhang mit dem abnehmenden Glykogenspeicher steht. In der ersten Phase wird der Glykogenspeicher geleert in der zweiten ist kein Glykogen mehr vorhanden. Sobald das Glykogen nach ungefähr 500 min verbraucht ist, schaltet das System auf einen zweiten Zustand, indem sich fast alle Flüsse und Konzentrationen von der initialen Phase des Glykogenabbaus unterscheiden. In der zweiten Phase sinken nahezu alle Konzentrationen, mit Ausnahme von utp, udp und gtp_mito auf einen niedrigeren Wert als während des Glykogenabbaus.

In der ersten Phase wird das aus dem Glykogen entstehende glc1p in den glc6p Pool eingeschleust und leistet einen wesentlichen Beitrag zur HGP. Dies wird durch Vergleich der Flüsse durch G16PI, G6PASE, GK und GLUT2 deutlich. Der Fluss von $\sim 0.5 \mu\text{mol}/\text{kg}/\text{min}$ durch die G16PI, der glc1p in glc6p umwandelt, entspricht dem erhöhten Fluss durch die G6PASE. Der GK Fluss ändert sich nur minimal zwischen den beiden Phasen, die Differenz zwischen GK und G6PASE entspricht dem Glucosetransport über GLUT2. Das abgebaut Glykogen fließt daher zum Teil in den glc6p Pool und wird anschließend als Glucose exportiert. Durch Abbau des gespeicherten Glykogen ist der Hepatozyt so in der Lage einen erhöhten Glucoseoutput unter hypoglykämischen Bedingungen zu erzielen.

Bei leeren Glykogenspeichern verschwindet der Fluss vom Glykogen zum glc6p Pool durch G16PI, die Flüsse durch die Gluconeogenese vom pep bis zum glc6p steigen an (EN, PGM, GAPDH, TPI, ALD, FBP1, GPI). Die Glucose für die HGP stammt bei leeren Glykogenspeichern vollständig aus der Gluconeogenese.

Die HGP im Vergleich zur ersten Phase ist verringert. Das Fehlende glc6p aus den Glykogenspeichern wird zum Teil durch erhöhte Gluconeogenese kompensiert, allerdings nicht vollständig.

Wenn Glykogen zur Verfügung steht, kann dieses zur HGP verwendet werden. Steht kein Glykogen mehr zur Verfügung ist auch die HGP geringer und wird ausschließlich aus der Gluconeogenese betrieben. Besonders auffällig ist, dass bei leeren Glykogenspeichern die Gluconeogenese um über 10% ansteigt. Der Zustand des Glykogenspeichers ist über in dem gesamten Netzwerk veränderten Flüsse und Konzentrationen in der Lage andere Prozesse, wie die Gluconeogenese zu beeinflussen.

Der Laktatimport durch LacT und der Fluss durch LDH ist unabhängig vom Zustand der Glykogenspeicher nahezu unverändert (Veränderungen so gering, dass nicht mehr in der Abbildung erkennbar).

Die Umschaltung auf erhöhte Gluconeogenese in der zweiten Phase erfolgt über den PEPCK - PK Schalter. Der Fluss durch beide Reaktionen wird geringer, aber die Differenz vergrößert sich, da der Fluss durch PK deutlich stärker abnimmt (-50%) als der Fluss durch die PEPCK (-10%). Die veränderte Gluconeogenese beruht also nicht aus einer veränderten Laktataufnahme, sondern aus einer unterschiedlichen Veränderung der Kinetiken der PEPCK und der PK in Abhängigkeit vom Zustand des Glykogenspeicher.

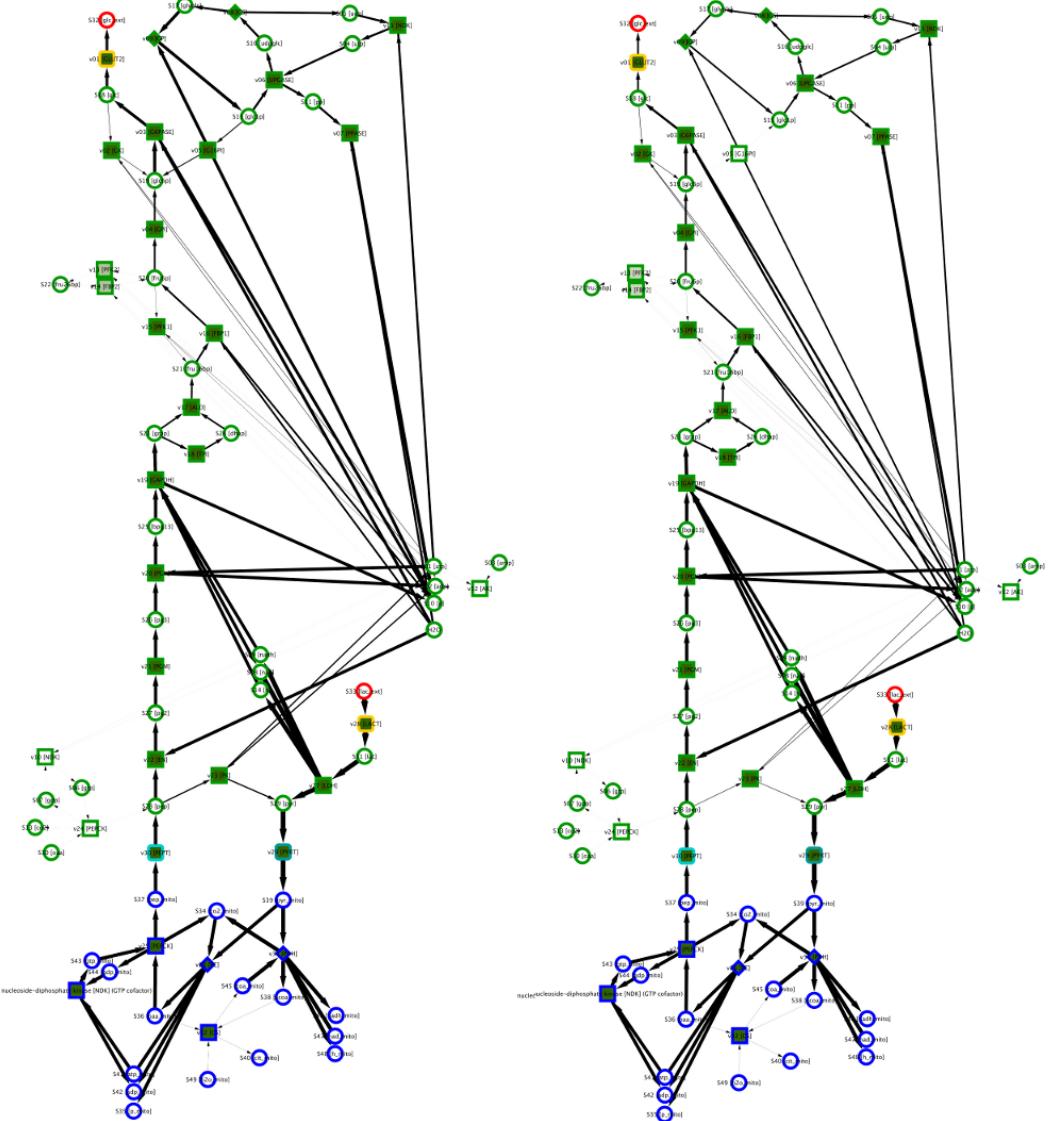


Abbildung 3.14: Flüsse der HGP Simulation zum Zeitpunkt $t=50$ min (links) und $t=980$ min (rechts). Pfeildicken entsprechend der Flussstärken. In der ersten Phase wird die Glucose über Glykogenolyse und Gluconeogenese bereitgestellt ($t=50$ min). Wenn der Glykogenspeicher geleert ist, stammt die Glucose ausschließlich aus der Gluconeogenese. Nettofluss vom Glykogen zum $glc6p$ findet nicht mehr statt ($t=980$ min).

Dieser Effekt ist v.a. auf die allosterischen Effektoren zurückzuführen. Die PK wird sehr stark durch die fru16bp beeinflusst. Bei geleerten Glykogenspeicher sinken die Konzentrationen der Intermediate der Glycolyse, darunter auch fru16bp. Dieses ist ein potenter Aktivator der PEPCK. Der leere Glykogenspeicher und das dadurch erniedrigte fru16bp bewirkt eine deutlich geringe Aktivität der PK, der Fluss durch die Gluconeogenese erhöht sich.

Weiterhin muss aber auch der PFK1-FBP1 Schalter die erhöhte Gluconeogenese unterstützen. Da die Konzentration des wichtigen allosterischen Effektors fru26bp der PFK1 und der FBP1 außer durch den Interkonvertierungszustand von PFK2/FBP2 v.a. auch durch fru6p beeinflusst wird, folgt aus einer erniedrigten fru6p Konzentration auch eine erniedrigte fru26bp Konzentration. Diese verändert den Fluss durch den PFK1-FBP1 Schalter in Richtung Gluconeogenese.

Der Hepatozyt ist in der Lage HGP bei 3.5 mM Blutglucose zu betreiben. Die Leber ist dadurch in der Lage bei hypoglykämischen Bedingungen den Organismus mit Glucose zu versorgen. Der Anteil aus Glykogenolyse und Gluconeogenese an der HGP variiert mit der Zeit, wenn der Glykogenspeicher geleert ist, stammt die gesamte Glucose der HGP aus der Gluconeogenese. Der Zustand des Glykogenspeichers beeinflusst auch den Fluss durch die Gluconeogenese.

HGU Simulation [8 mM] Die zeitabhängigen Veränderungen der Konzentrationen bei HGU sind in Abb. 3.15, die zugehörigen Flüsse in Abb. 3.16 dargestellt. Die Flüsse im Netzwerk zum Zeitpunkt t=50 min und t=980 min sind in Abb. 3.17 abgebildet.

Das Modell ist in der Lage HGU bei Blutglucosekonzentrationen von 8 mM zu betreiben. Der Fluss durch GLUT2 ist über den gesamten Zeitverlauf positiv, Glucose wird aus der Blutbahn aufgenommen. Der Glykogenspeicher wird im Laufe der Zeit vollständig gefüllt. Auch nachdem der Glykogenspeicher voll ist, kann der Hepatozyt weiterhin HGU betreiben, die Glucose wird unter diesen Bedingungen nicht als Glykogen gespeichert, sondern vollständig in der Glycolyse verwendet.

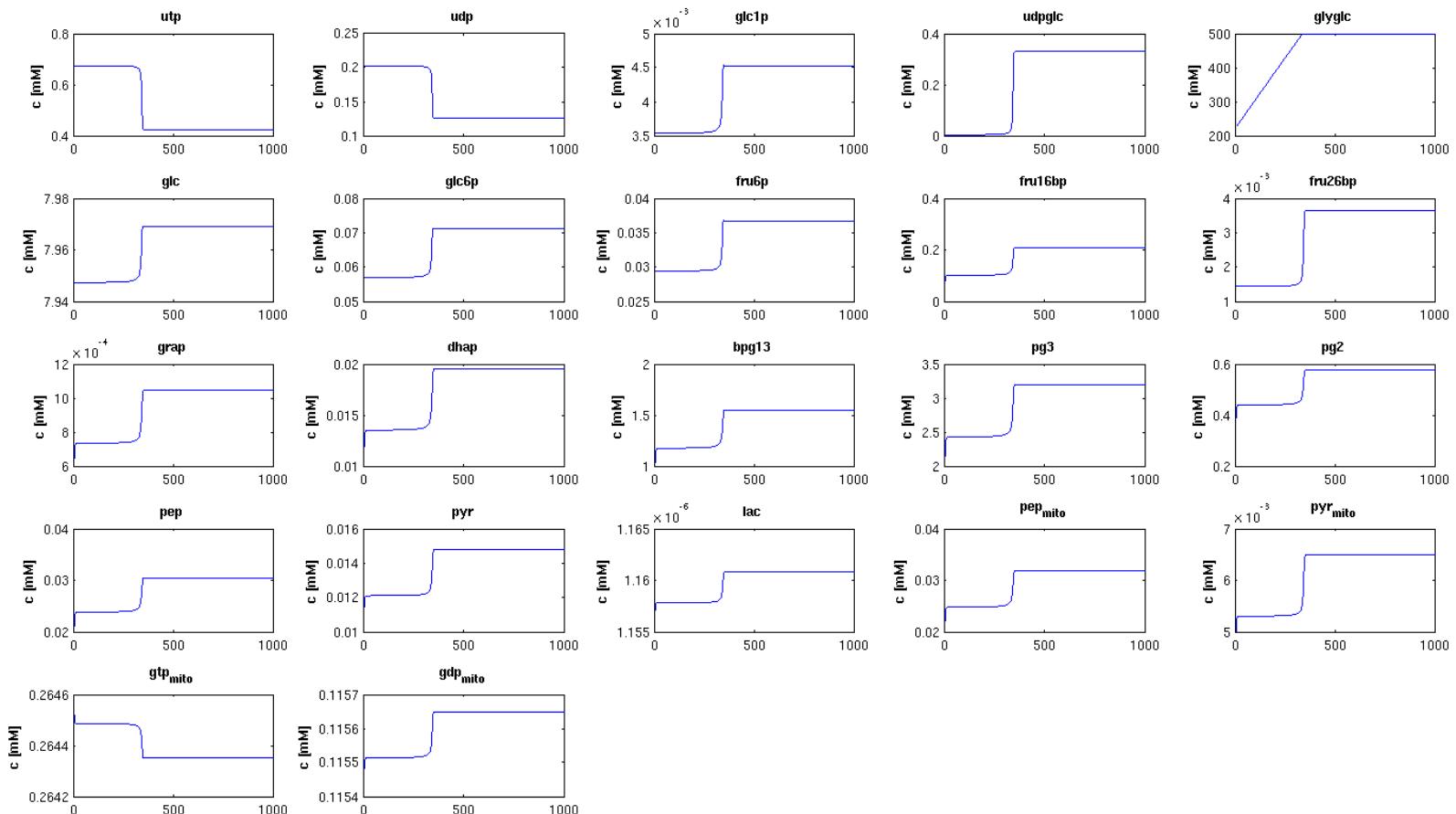


Abbildung 3.15: Konzentrationsverlauf der HGU Simulation [8 mM Blutglucose, 0.8 mM Blutlaktat], Konzentrationen in [mM] von Zeit t in [min]. Deutlich ist eine erste Phase der Glykogensynthese und eine zweite Phase mit gefüllten Glykogenspeichern zu erkennen.

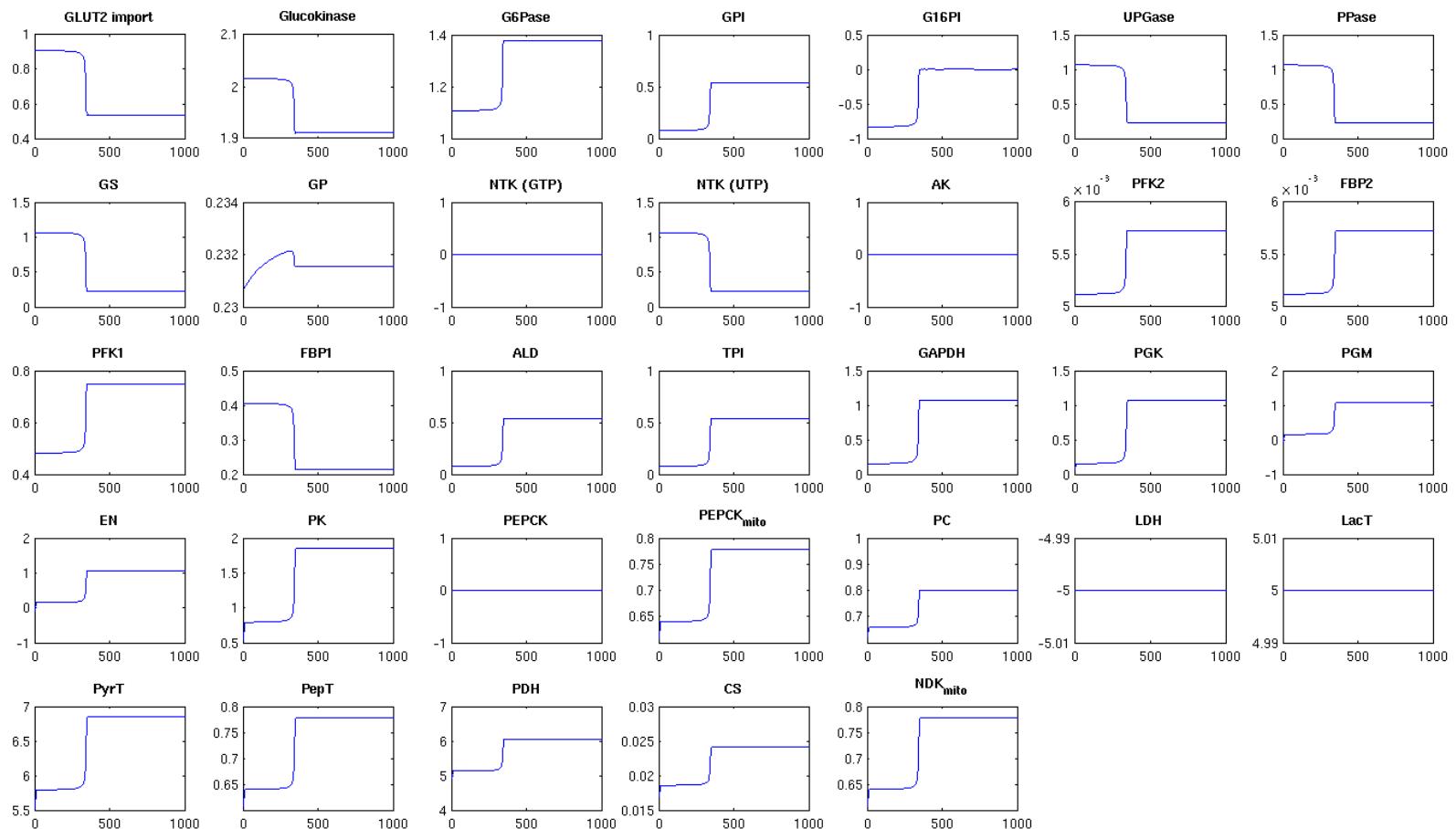


Abbildung 3.16: HGU Flüsse [8 mM Blutglucose, 0.8 mM Blutlaktat], Abhängigkeit der Flüsse in [$\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{min}$] von der Zeit t [min]. Deutlich ist eine erste Phase der Glykogensynthese und eine zweite Phase mit gefüllten Glykogenspeichern zu erkennen. Fluss durch AK ist 0, da ATP und ADP konstant und keine AMP bildenden Reaktionen in dem Modell enthalten sind. Fluss durch PEPCK und NTK (GTP) 0, da mitochondriale PEPCK verwendet wird.

Unter hyperglykämischen Bedingungen ist der Hepatozyt in der Lage zur Blutglucosehomöostase beizutragen, indem Glucose aus der Blutbahn aufgenommen wird.

In der HGU Simulation ist ein zweiphasiges Verhalten zu erkennen. Eine erste Phase, in der die Glykogenspeicher im Laufe von ~400 min gefüllt werden und eine zweite Phasen mit maximaler Glykogenkonzentration. Das Umschalten zwischen den beiden Zuständen erfolgt deutlich schneller, als das Umschalten zwischen Glykogenolyse und der Phase mit leeren Glykogenspeichern in der HGP Simulation.

Ein Großteil der aufgenommenen Glucose wird in der ersten Phase für die Glykogensynthese verwendet, nur ein sehr geringer Teil der Glucose wird über Glycolyse abgebaut, wie durch Vergleich von GPI und G16PI ersichtlich wird.

Während die Glykogenspeicher gefüllt werden, ist die HGU deutlich höher als in der zweiten Phase. Bei gefüllten Glykogenspeichern sinkt die Aufnahme durch GLUT2 deutlich ab. Das Glykogen hat nicht nur eine Funktion in der HGP, sondern dient auch als Puffer im Falle der HGU mittels dem zusätzlichen Glucose aus der Blutbahn entfernt werden kann.

Auch in der HGU Simulation wird die Glycolyse / Gluconeogenese durch den Glykogenzustand beeinflusst. Im Gegensatz zur HGP Simulation, in der die Gluconeogenese bei leeren Glykogenspeichern aktiviert wird, wird bei HGU bei gefüllten Glykogenspeichern die Glycolyse aktiviert. Hierdurch kann auch bei gefüllten Glykogenspeichern weiterhin Glucose aus der Blutbahn entfernt werden.

Für die aktivierte Glycolyse ist einerseits der deutlich erhöhte Fluss durch die PK (durch erhöhten allosterischen Aktivator fru16bp) im Vergleich zur PEPCK verantwortlich, andererseits wird aber auch der PFK1-FBP1 Schalter deutlich in Richtung Glycolyse durch die erhöhte fru26bp Konzentration geschaltet.

Auch in der HGU Simulation, nimmt der Hepatozyt Laktat auf, der Transport ist nahezu unverändert im Vergleich zur HGP Simulation. Auch der Zustand des Glykogenspeichers hat keine Auswirkung auf die Laktataufnahme. Die Laktataufnahme wird v.a. durch die externe Laktatkonzentration beeinflusst (Simulationen nicht gezeigt).

Sowohl unter hypoglykämischen, als auch hyperglykämischen Bedingungen ist der Hepatozyt unveränderter Laktatkonsument. Allerdings unterscheidet sich das metabolische Schicksal des aufgenommenen Laktat in Abhängigkeit von der Blutglucosekonzentration.

Bei hypoglykämischen Bedingungen wird ein großer Teil des aufgenommenen Laktats für die Gluconeogenese verwendet, der restliche Teil wird über die PDH zu Acetyl-CoA und steht damit für Syntheseprozesse zur Verfügung, wie beispielsweise zur Cholesterol- und Fettsäuresynthese (Abb. 3.14).

Bei hyperglykämischen Bedingungen ändert sich die Aufnahme des Laktats nicht, aber die Verteilung auf die Stoffwechselwege ist deutlich unterschiedlich. Nur ein sehr kleiner Teil des Laktat wird nach Umwandlung in Pyruvat zur Synthese von Oxalacetat verwendet. Das Hauptschicksal

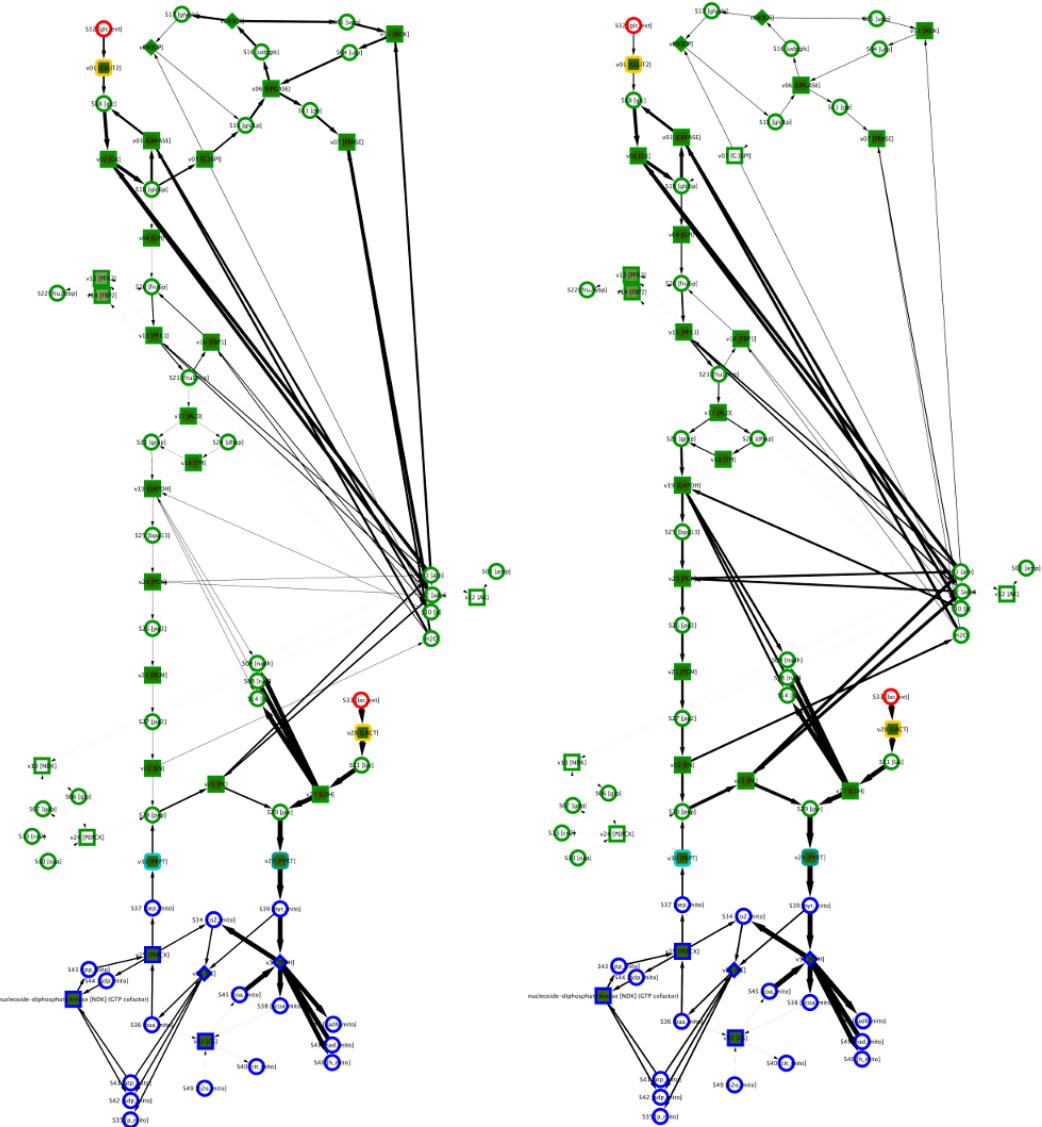


Abbildung 3.17: HGU Flüsse zum Zeitpunkt $t=50$ min (links) und $t=980$ min (rechts). Pfeildicken entsprechen den Flüssen durch die Reaktionen. Zunächst wird die aufgenommene Glucose v.a. zur Synthese von Glykogen verwendet. Der Fluss durch die Glycolyse ist nur sehr gering ($t=50$ min). Wenn der Glykogenspeicher gefüllt ist, wird die aufgenommene Glucose über die Glycolyse zu pep und anschließend zu acoa umgewandelt. Glykogensynthese findet nicht mehr statt ($t=980$ min).

ist die Umwandlung durch die PDH zu Acetyl-CoA (Abb. 3.17).

In den Simulationen hat der Hepatozyt eine feste Rolle als Laktatverbraucher, während er seine Rolle als Glucoseproduzent und Glucosekonsument in Abhängigkeit von der Blutglucosekonzentration variieren kann.

Das kinetische Modell ist sowohl zu HGP, als auch zu HGU in der Lage. Mit einer identischen Enzymausstattung (V_{max}) ist das System je nach externer Glucosekonzentration Glucosekonsument oder Glucoseproduzent. Für das Umschalten sind die allosterischen Effekte und die interkonvertierbaren Enzyme ausreichend, die Genexpression der Schlüsselenzyme muss nicht angepasst werden, um den Umschaltvorgang zu erreichen.

Sowohl in HGU, als auch in HGP hat der Glykogenspeicher eine Pufferrolle, die den jeweiligen Zustand unterstützt und den Glucosefluss in die jeweilige Richtung verstärkt. So kann während HGP mehr Glucose an die Blutbahn abgegeben werden. Im Fall von HGU kann mehr Glucose aufgenommene werden.

Sowohl in HGU, als auch in HGP erkennt man einen starken Effekt des Glykogenspeichers auf die nahezu alle Konzentrationen und Flüsse des Modells. Insbesondere wird der Fluss durch die Glykolyse/Gluconeogenese auf die jeweiligen Erfordernisse angepasst. Bei vollen Glykogenspeichern unter hyperglycämischen Bedingungen wird der Fluss durch die Glykolyse erhöht. Bei leeren Glykogenspeichern unter hypoglycämischen Bedingungen steigt der Fluss durch die Gluconeogenese an.

Schalterenzyme in HGP und HGU Um zwischen HGP und HGU umzuschalten, müssen die Flüsse durch Schalterenzympaare in beiden Zuständen unterschiedlich sein.

GK und G6Pase bilden den Glucoseschalter, der die Glucoseaufnahme bzw. -abgabe bestimmt. Die GS und GP bilden den Glykogenschalter, der zwischen Glykogenabbau und -synthese entscheidet. PFK1 und FBP1 kontrollieren den Fluss durch die Glykolyse und die Gluconeogenese. PK und PEPCK beeinflussen ebenfalls den Fluss durch Glykolyse bzw. Gluconeogenese.

In Abb. 3.18 ist das zeitliche Verhalten der Schalterenzyme für HGP und HGU Simulationen dargestellt.

Bei Vergleich von HGP (Glykogenolyse, Gluconeogenese) und HGU (Glykogensynthese, Glykolyse) wird deutlich, dass das Umschalten über Veränderung der Flüsse durch die reziproken Schalterenzyme erfolgt. Die Enzyme, die im HGP einen geringeren Fluss haben als das zugehörige reziproke Schalterenzym, haben in der HGU Simulation einen größeren Fluss als der Umkehrschritt. Und Enzyme mit größerem Fluss in der HGP Simulation, haben in der HGU Simulation einen geringeren Fluss als der Umkehrschritt.

So ist der Fluss durch die G6PASE in der HGP größer als der Fluss durch die GK, Glucose wird exportiert. In HGU ist dagegen der G6PASE Fluss geringer als der Fluss durch die GK, Glucose wird aufgenommen.

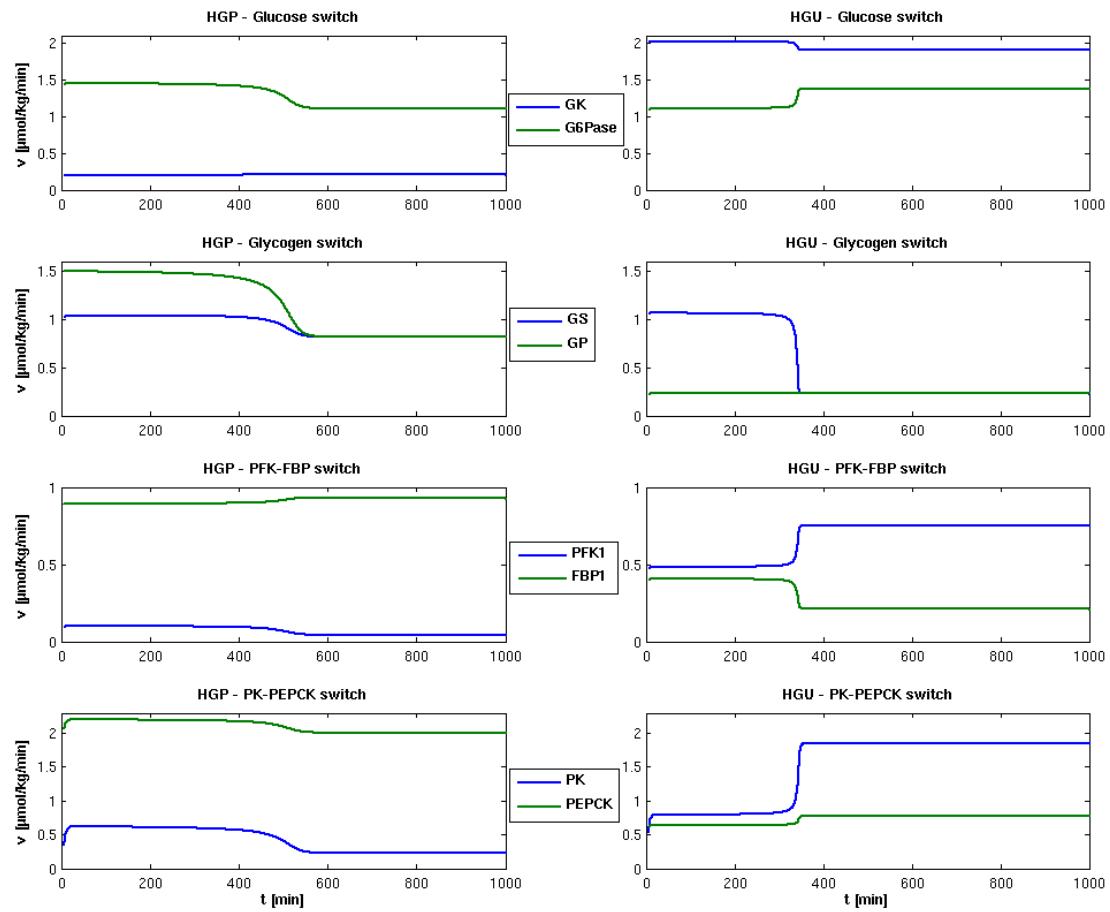


Abbildung 3.18: Schalterenzyme und Futile Cycles im Vergleich von HGP [3.5 mM Blutglucose, 0.8 mM Blutlaktat] und HGU [8 mM Blutglucose, 0.8 mM Blutlaktat]. Flüsse in [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$], Zeit in [min]. Der jeweils geringere Fluss der Schalterenzyme entspricht dem Futile Cycle in dem Schalter.

In der HGP ist der GP Fluss in der ersten Phase größer als der GS Fluss, Glykogen wird abgebaut. In der HGU hat dagegen die GS größeren Fluss als die GP und die Glykogenspeicher werden Initial gefüllt. Der Fluss durch FBP1 ist größer als durch PFK1 in HGP, Gluconeogenese ausgehend von pep wird betrieben. Umgekehrtes gilt für HGU, Glykolyse findet statt.

Und auch der Fluss durch den PK-PEPCK Schalter kehrt sich um. In HGP ist der PEPCK Fluss größer als PK Fluss, umgekehrt in HGU ein größerer Fluss durch die PK als durch die PEPCK. Die Veränderung in der externen Glucosekonzentration zusammen mit den daraus resultierenden Veränderungen in den Konzentrationen der Hormone Insulin und Glucagon ist ausreichend, um alle vier Schalter zwischen HGP und HGU umzuschalten.

Futile Cycles in den Schaltern Da in drei der Schaltern eines der beiden Schalterenzyme eine energiereiche Bindung spaltet (atp-GK, atp-PFK1, udpGlc-GS), die reziproken Schalterenzyme jeweils ohne zusätzlich Energie arbeiten (G6PASE, FBP1, GP), wird bei gleichzeitigem Ablaufen beider Reaktionen Energie verschwendet (Futile Cycle).

PEPCK verbraucht ebenfalls eine energiereiche Bindung vom GTP, in der PK Reaktion wird allerdings ein ATP erzeugt. Da aber für die Erzeugung des Oxalacetat aus Pyruvat in der PC Reaktion ein weiteres ATP notwendig ist, wird in dem Zyklus pep → pyr → pyr_mito → oa_mito → pep_mito → pep insgesamt analog zu den anderen Schaltern eine energiereiche Verbindung verschwendet, wenn PK und PEPCK in dem Modell gleichzeitig ablaufen.

Der geringere Fluss der beiden reziproken Schalterenzyme gibt daher die Futile Cycles in energiereichen Bindungen an, wenn die Schalterenzympaare gleichzeitig aktiv sind.

Für die verschiedenen Schalter und für HGP bzw. HGU unterscheiden sich die Futile Cycles. Auch der Zustand des Glykogenspeichers spielt eine wesentliche Rolle für die Größe der Energieverschwendungen.

Während HGP haben der Glucoseschalter, der PFK1-FBP1 Schalter und der PK-PEPCK Schalter nur geringe Futile Cycles. Der Glykogenschalter verschwendet dagegen sehr viel Energie, sowohl während der anfänglichen Glykogenolyse, aber auch bei leeren Glykogenspeichern. Bei HGU ist die Situation anders. Hier zeigt der Glykogenschalter, sowohl während der Glykogen synthese, aber auch bei gefüllten Glykogenspeichern, relativ geringe Energieverschwendungen. Der Glucoseschalter hat einen sehr hohen Futile Cycle und auch der PFK-FBP und der PK-PEPCK Schalter sind aus energetischer Sicht nicht sehr effizient.

Ein wesentlicher Faktor für die zum Teil sehr hohe Energieverschwendungen ist die Verwendung eines konstanten V_{max} Satzes in den Simulationen für HGP und HGU. Im Hepatozyten werden aber gerade die Flüsse durch viele Schalterenzyme über Genexpression so verändert, dass die Futile Cycles geringer werden. So wird beispielsweise bei erhöhter Blutglucose, niedrigem Glucagon und hohem Insulin, die GK höher exprimiert und die G6PASE geringer exprimiert wodurch der Futile Cycle am Glucoseschalter unter HGU deutlich geringer wird. Ähnliches gilt auch für die anderen Schalter, da neben GK und G6PASE auch PEPCK, PFK1, PFK2, FBP1 und FBP2 über Genexpression reguliert werden. Der Einfluss veränderter Genexpression wurde teilweise in 3.4.4 untersucht.

Die in der Zelle stattfindenden langsamen Anpassungen der Schlüsselenzymkonzentrationen über Veränderung der Genexpression minimiert die Futile Cycles, da die Enzyme, die den Zellzustand unterstützen überexprimiert werden, wohingegen die reziproken Enzyme weniger exprimiert werden.

Umschaltverhalten in Abhängigkeit von der externen Glucosekonzentration Um das Umschaltverhalten in Abhängigkeit von der Blutglucosekonzentration zu untersuchen, wurde diese Schrittweise von 0 bis 20 mM erhöht. Die Blutlaktatkonzentration betrug konstant 0.8 mM, die anfängliche Glykogenkonzentration 220 mM. Der Fluss durch GLUT2 (HPG/HGU) und die Glykogenkonzentration sind in Abb.3.19 und Abb. 3.20 dargestellt.

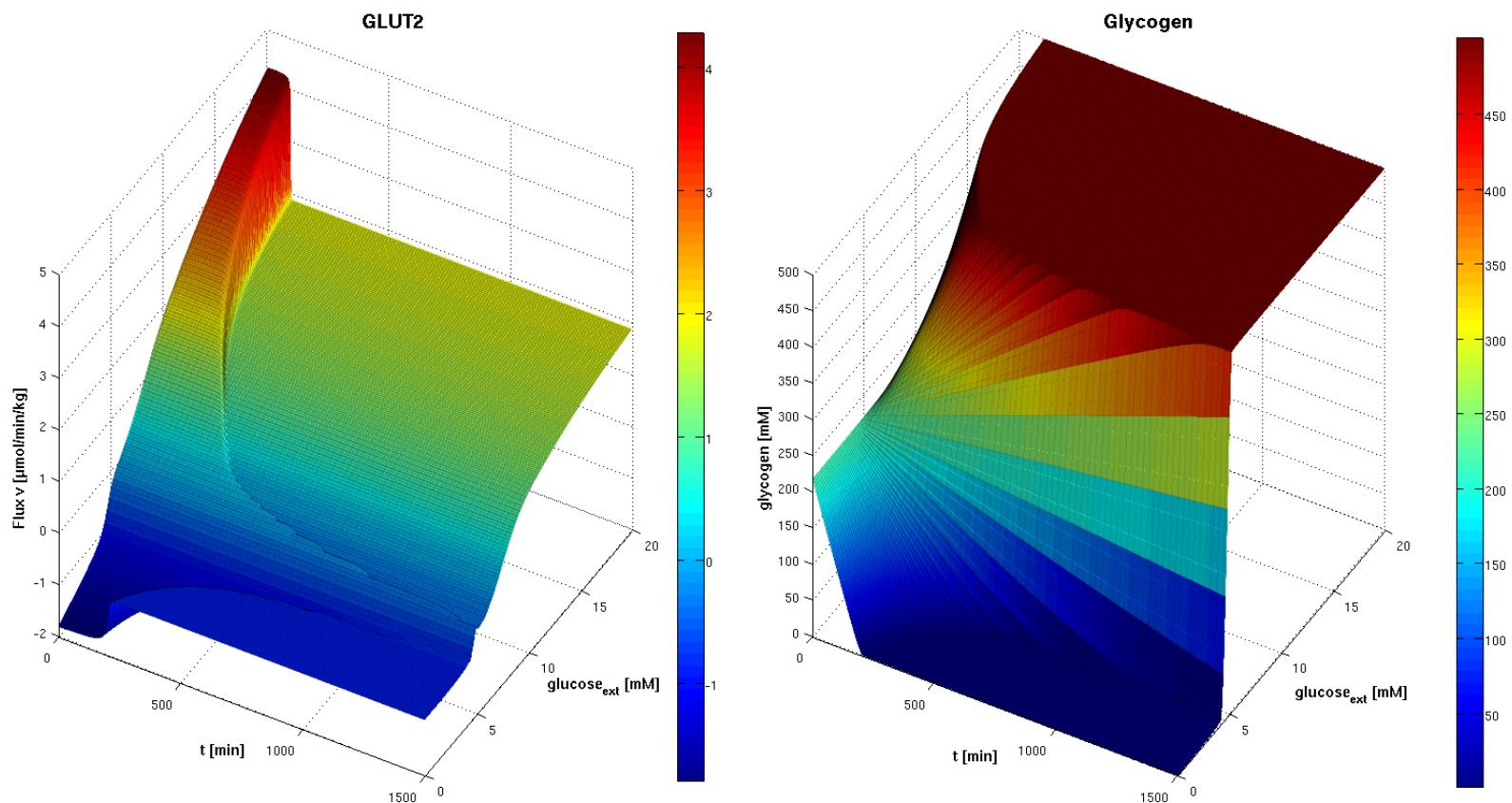


Abbildung 3.19: HGP/HGU (GLUT2) und Glykogen in Abhängigkeit von der Blutglucosekonzentration und der Zeit [min]. Blutglucose wurde schrittweise von 0-20 mM variiert. Blatlaktat 0.8 mM, anfängliche Glykogenkonzentration 220 mM.

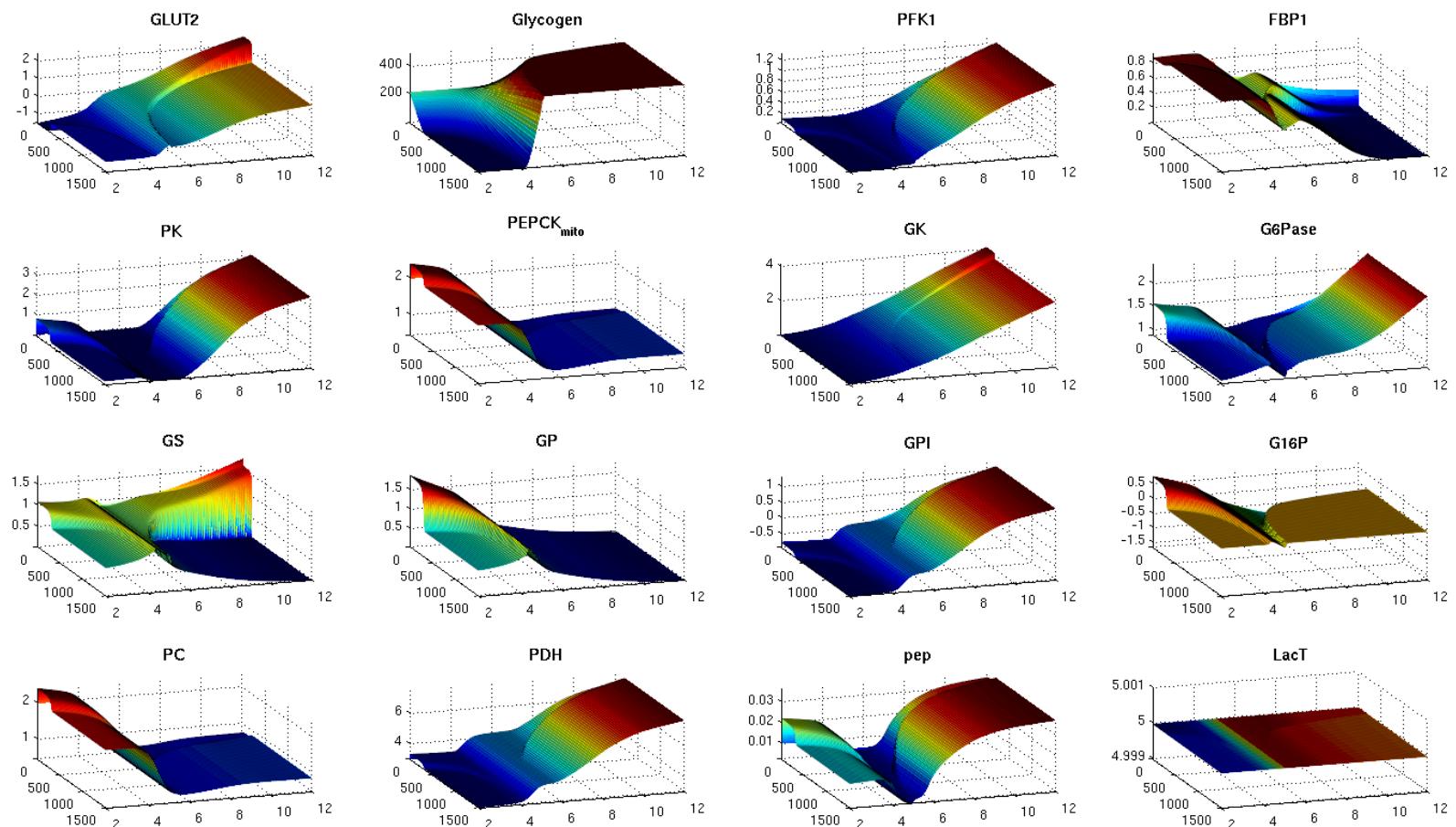


Abbildung 3.20: Zeitliches Verhalten wichtiger Flüsse und Konzentrationen in Abhängigkeit von der Blutglucosekonzentration. Blutglucosekonzentration in [mM], Zeit in [min], Flüsse in [$\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{min}$], Konzentrationen in [mM]. Farbskala individuell für jede Abbildung von blau (Minimalwert) bis rot (Maximalwert).

Bei hypoglycämische Blutglucosekonzentrationen ($< 5 \text{ mM}$) wird der Glykogenspeicher im Laufe der Zeit vollständig geleert. Bei Hyperglycämie ($> 5 \text{ mM}$) wird der Glykogenspeicher vollständig gefüllt. Je größer die Abweichung von 5 mM Blutglucose, desto schneller erfolgt die Glykogensynthese bzw. der Glykogenabbau.

Die Glykogensynthese und Glykogenolyse sich deutlich in den GLUT2-Kurve und der hierdurch veränderten HGP/HGU zu erkennen. Bei hyperglycämischen Bedingungen, wenn Glykogen synthetisiert wird, kann deutlich mehr Glucose aus der Blutbahn aufgenommen werden. Sobald die Glykogenspeicher gefüllt sind, fällt der Transport durch GLUT2 auf ein niedrigeres Niveau. Je stärker die Hyperglycämie, desto schneller wird der Glykogenspeicher gefüllt und desto kleiner der Zeitraum, indem zusätzliche Glucose aus der Blutbahn aufgenommen werden kann.

Bei hypoglycämischen Bedingungen wird der Glykogenspeicher dazu verwendet, die HGP zu erhöhen. In der Anfangsphase kann dadurch deutlich mehr Glucose an die Blutbahn abgegeben werden. Auch bei hypoglycämischen Bedingungen sind zwei Phasen zu erkennen. Eine Phase in der der Glykogenspeicher geleert wird und eine zweite Phase, in der weniger Glucose vom Hepatozyten abgegeben wird, da die Glykogenspeicher aufgebraucht sind und die HGP sinkt auf ein niedrigeres Niveau absinkt.

Der Punkt, an dem GLUT2 weder Glucose importiert noch exportiert, der Umschaltpunkt zwischen HGP und HGU, liegt in Abhängigkeit von Glykogenzustand zwischen 5.5 und 7 mM . Solange der Glykogenspeicher nicht vollständig gefüllt ist liegt dieser bei 5.5 mM , bei gefülltem Speicher, verschiebt dieser sich zu höheren Glucosekonzentrationen.

Bei vollen Glykogenspeichern bildet sich im Glucosebereich zwischen 5.5 und 7 mM ein Plateau von GLUT2 mit nur sehr geringen Glucoseflüssen. Erst bei Anstieg auf über 7 mM steigt auch die Glucoseaufnahme deutlich an.

Dieses Verhalten könnte physiologische Bedeutung haben. Die Leber hat im Vergleich zum Muskel eine weniger wichtige Rolle in der Glucose Clearance und spielt in den Simulationen hierbei erst bei deutlich erhöhten Blutglucosekonzentration oberhalb von 7 mM eine Rolle. In dem Bereich von $5.5 - 7 \text{ mM}$ können andere Verbraucher wie der Muskel die Glucose aus dem System abziehen, um beispielsweise ihre Speicher zu füllen (Muskelglykogen). Erst wenn der Glucosewert deutlich erhöht ist ($> 7 \text{ mM}$ beispielsweise nach Nahrungsaufnahme) und die periphere Clearance nicht ausreicht, übernimmt auch die Leber eine wichtige Funktion in der Glucoseaufnahme mit gefüllten Glykogenspeichern.

Bei noch nicht gefüllten Leberglykogenspeichern, werden diese oberhalb von 5 mM zunächst gefüllt. Sobald der Speicher gefüllt ist, verschiebt sich der Bereich der HGU auf oberhalb von 7 mM .

Wenn der Blutglucosewert unter den Sollwert von 5 mM fällt, erfolgt eine starke Glucagonantwort, die sofort zu HGP führt. Wenn Leberglykogen vorhanden ist unterstützt dieses die HGP, die restliche Glucose stammt aus der Gluconeogenese. Wenn das Leberglykogen verbraucht ist, wird HGP vollständig über Gluconeogenese betrieben. Der Schaltpunkt verschiebt sich nicht in

Abhängigkeit vom Zustand der Glykogenspeicher, das GLUT2 Plateau ist nur bei leicht hyperglycämischen Bedingungen zu beobachten.

Die HGP und HGU funktionieren in dem kinetischen Modell, auch wenn die Blutglucosekonzentrationen auf unphysiologische 0 mM abgesenkt oder auf extreme hyperglycämische Bedingungen erhöht wird. Die Hyperglycämie zeigt einen klaren Dose-Response Effekt, umso höher die Blutglucosekonzentration, desto mehr Glucose wird aufgenommen. Auch bei 20 mM externer Glucose führt eine weitere Erhöhung der Glucose zu einer Erhöhung der HGU. Dagegen erreicht die HGP bei leeren Glykogenspeichern bereits bei 3 mM ein Plateau, eine weitere Absenkung der Blutglucose führt nicht zu einer verstärkten HGP. Hier spiegeln sich die Effekte der unterschiedlichen Dose-Response-Kurven von Insulin und Glucagon deutlich wieder. Eine Absenkung der Glucose unter 3 mM bewirkt keine Veränderung mehr in den Hormonantworten, Glucagon hat bereits seinen Maximalwert erreicht. Dagegen führt eine Erhöhung der Glucosekonzentration selbst bei 15 mM Blutglucose immer noch zu einer Erhöhung der Insulinantwort, wodurch auch die HGU immer noch gesteigert werden kann.

Analyse weiterer Flüsse und Konzentrationen In Abb. 3.20 sind neben GLUT2 und Glykogen weitere wichtige Flüsse und Konzentrationen in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration und der Zeit abgebildet. Bei allen Flüssen und Konzentrationen ist dabei das Umschalten zwischen der initialen Phase, in der sich der Glykogenzustand verändert und der zweiten Phase mit konstantem Glykogen zu erkennen.

Der Fluss durch die G16PI ist ein Maß für den Fluss zwischen Glykogenpool und glc6p Pool. Sobald die Glykogenspeicher vollständig gefüllt bzw. geleert sind findet kein Fluss durch die G16PI mehr statt. Bei Glucosekonzentrationen unterhalb von 5 mM wird der Glykogenspeicher in der Anfangsphase geleert, das entstehende glc1p fließt teilweise in den glc6p Pool (G16PI Fluss > 0). Bei Glucosekonzentrationen oberhalb von 5 mM wird der Glykogenspeicher in der Anfangsphase aus dem glc6p Pool gefüllt (G16PI Fluss < 0). Die zusätzlich aufgenommene Glucose bei HGU wird im Glykogen gespeichert. Die erhöhte Glucoseabgabe bei HGU stammt aus dem Glykogen.

Deutlich erkennt man wie der PFK1-FBP1 Schalter von der externen Glucosekonzentration abhängt. Mit zunehmender externer Glucose nimmt der Fluss durch die PFK1 zu und der Fluss durch die FBP1 ab, allerdings nicht streng monoton, sondern im Zwischenbereich von ~ 6 mM steigt die Aktivität zum Teil auch wieder mit steigender Glucosekonzentration geringfügig an. PFK1 und FBP1 verhalten sich über den gesamten Glucosebereich betrachtet reziprok zueinander. In Abhängigkeit von der Glucosekonzentration kann so auf Ebene der PFK1-FBP1 zwischen Glykolyse und Gluconeogenese umgeschaltet werden.

Das dieser Schalter funktioniert erkennt man bei Betrachtung des GPI Flusses, der ein Maß für den Fluss durch Gluconeogenese und Glykolyse ist. Für Glucosekonzentrationen kleiner als 5

mM findet Gluconeogenese statt, bei Konzentrationen oberhalb von 5 mM ist die Glycolyse bis ungefähr 7 mM sehr gering, steigt bei weiterer Erhöhung der Glucosekonzentration dann aber stark an.

Auch der PK-PEPCK Schalter kann über die externe Glucosekonzentration geschaltet werden. Die PK Aktivität steigt mit steigender Glucosekonzentration (obwohl auch bei hypoglycämischen Bedingungen ein teilweiser Anstieg auftritt v.a. durch die erhöhten fru16bp Konzentrationen während des Glykogenabbaus) und die PEPCK Aktivität sinkt mit steigenden externen Glucosekonzentrationen. Auch hier werden die Schalterenzyme durch die externe Glucose im großen und ganzen reziprok geschaltet.

Da die pep Konzentration sowohl von der PK, der PEPCK und dem Fluss durch die Glycolyse/Gluconeogenese (EN) abhängt, bildet sich eine V-förmige pep-Abhängigkeit von der externen Glucosekonzentration.

Die Umverteilung des aufgenommenen Laktats auf unterschiedliche zelluläre Verwendungszwecke ist gut zu erkennen. Bei niedrigen Glucosekonzentrationen wird ein deutlich größerer Anteil des Laktats nach der Umwandlung in Pyruvat (LDH) und den Transport ins Mitochondrium über die PC und PEPCK Reaktion für die Gluconeogenese verwendet, als bei hyperglycämischen Bedingungen. Dann ist der Fluss durch die PC und die PEPCK sehr gering ist, der Fluss durch die PDH deutlich erhöht.

Bei der Betrachtung des aufgenommenen Laktats (LacT) fällt auf, dass dieser sich nur minimal bei Veränderung der externen Glucosekonzentration verändert. Der Fluss liegt unabhängig von der externen Glucosekonzentration bei $5 \mu\text{mol}/\text{kg}/\text{min}$. Auch zwischen der ersten Phase der Veränderung des Glykogenspeichers und der zweiten Phase mit konstantem Glykogenzustand variiert die Lactataufnahme nicht.

Die Verwendung des aufgenommenen Laktats ist dagegen stark abhängig von der Blutglucosekonzentration.

Einfluss der gluconeogenen Substrate Neben der externen Glucosekonzentration kann auch das Vorhandensein von gluconeogenen Vorstufen ein wichtiger Faktor sein, der den Umschaltprozess beeinflusst. Die Abhängigkeit des GLUT2 Flusses und der Glykogenkonzentration von der externen Laktatkonzentration, der externen Glucosekonzentration und der Zeit ist in Abb. 3.21 dargestellt. Die Blutglucosekonzentration wurde schrittweise zwischen 3 und 12 mM variiert. Die Blutlaktatkonzentration schrittweise zwischen 0 und 2 mM.

Sämtliche Simulationen starten mit einem Glykogenkonzentration von 220 mM. Im Laufe der Zeit füllen sich bei hyperglycämischen Bedingungen die Glykogenspeicher, bei hypoglycämischen Bedingungen leeren sie sich. Unabhängig von den externen Laktatkonzentrationen wird der Glykogenspeicher umso schneller gefüllt je größer die Hyperglycämie ist. Bei hypoglycämischen Bedingungen wird der Glykogenspeicher dagegen geleert. Die Blutglucosekonzentration, die zwischen leeren und vollen Glykogenspeichern umschaltet hängt von der Laktatkonzentration ab.

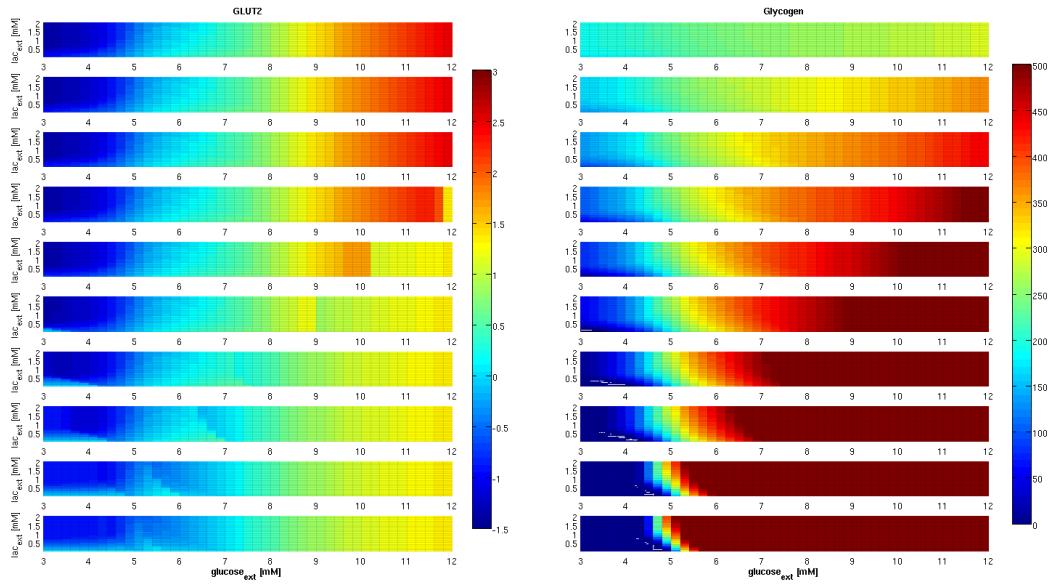


Abbildung 3.21: GLUT2 (HGP/HGU) (links) und Glykogen (rechts) in Abhängigkeit von der Blutglukosekonzentration [3-12 mM], der Laktatkonzentration [0-2 mM] und der Zeit [min]. Bilder sind zeitliche Entwicklung für die jeweiligen Blutlaktat- und Blutglukosekonzentrationen. Zeitpunkte [50 100 150 200 250 300 400 500 1000 1500] min

Wenn kein externes Laktat vorgegeben wird liegt diese bei 5.2 mM bei hohen Laktatkonzentrationen (2 mM) werden erst bei 4.6 mM die Glykogenspeicher geleert. Der Umschaltpunkt zwischen vollen und leeren Glykogenspeicher hängt also nicht nur von der Blutglukosekonzentration, sondern auch geringfügig von der Blutlaktatkonzentration ab.

Bei noch höheren Laktatkonzentrationen (2-5 mM) verändert sich der Glucosefluss und der Glykogenspeicher nur noch minimal, und entspricht der Lösung 2 mM Laktat. Die Beobachtung, dass eine Erhöhung der gluconeogenen Vorstufen nicht zwangsläufig auch den Fluss durch die Gluconeogenese und die HGP vergrößern muss, wurde so auch experimentell gezeigt [100].

Der GLUT2 Fluss ist bei hyperglykämischen Bedingungen ($> 7\text{mM}$) unabhängig von der Blutlaktatkonzentration. Bei hypoglykämischen Bedingungen ist dagegen ein Laktateffekt zu beobachten. Mit zunehmendem Laktat kann mehr HGP betrieben werden. Dies wird besonders deutlich bei $t=1500$ min. Die Glykogenspeicher sind vollständig geleert, HPG findet nur noch über Gluconeogenese statt. Ohne gluconeogene Substrate kann das System keine Glucose synthetisieren, bei externem Laktat von 0 mM verschwindet daher auch die HGP. Eine Erhöhung der Laktatkonzentration von 0 mM ausgehend, bewirkt auf Grund verstärkter Gluconeogenese eine Erhöhung der HGP. Ein Anstieg auf über 1 mM, hat kaum noch Auswirkungen auf die HGP.

Gluconeogene Substrate können ein beschränkender Faktor für die HPG sein, eine Erhöhung muss aber nicht zwangsläufig eine erhöhte HGP bewirken. Dies ist nur bei geringen Laktatkonzentrationen der Fall.

Die Glucosehomöostase wird also nicht nur von der Blutglucosekonzentration beeinflusst. Bei hypoglycämischen Bedingungen spielen auch gluconeogene Substrate (in diesem Fall Laktat) eine Rolle. Insbesondere wenn die Glykogenspeicher verbraucht sind und die einzige Quelle der HGP die Gluconeogenese ist, ist das Vorhandensein von gluconeogenen Vorstufen wichtig.

Zusammenfassung Umschaltung HGP - HGU Der Hepatozyt ist in der Lage zwischen HGP und HGU in Abhängigkeit von der Blutglucose umzuschalten. Für den Schaltprozess sind die schnellen Regulationen über interkonvertierbare Enzyme, die durch Insulin und Glucagon beeinflusst werden, und allosterische Effektoren ausreichend. Veränderung der Genexpression von Schlüsselenzyme ist nicht notwendig für den Schaltprozess.

Bei niedriger Blutglucosekonzentration unterhalb von 5 mM stellt das System Glucose für den Organismus zu Verfügung (HGP). Die Glucose statt aus Glykogenolyse und Gluconeogenese. Auch wenn die Glykogenspeicher geleert sind, ist der Hepatozyt weiterhin in der Lage HGP zu betreiben. Die Glucose stammt unter diesen Bedingungen vollständig aus der Gluconeogenese. Bei hohen Blutglucosekonzentration ist das Modell in der Lage Glucose aus der Blutbahn aufzunehmen (HGU). Die Glucose wird einerseits dazu verwendet die Glykogenspeicher zu füllen, andererseits wird Glykolyse betrieben. Auch mit gefüllten Glykogenspeichern kann weiterhin HGU betrieben werden. Allerdings findet keine Nettoglykogensynthese mehr statt, sondern die aufgenommene Glucose wird vollständig in der Glykolyse verwendet.

Das Modell des humanen Lebermetabolismus von Glykolyse, Gluconeogenese und Glykogenmetabolismus ist daher in der Lage die von der Leber erforderliche Rolle in der Glucosehomöostase zu erfüllen. Der Umschaltpunkt zwischen HGP und HGU, d.h. der Sollwert den der Hepatozyt einstellt ist abhängig von der Glucosekonzentration, von gluconeogenen Substraten aber auch vom Zustand des Glykogenspeichers.

Das Umschalten funktioniert ohne Veränderung der V_{max} -Werte. Die Leber kann mit einem Satz an V_{max} sowohl HGP, als auch HGU betreiben und schaltet schnell zwischen den beiden Zuständen abhängig von der externen Glucose um. Nur Regulation durch allosterische Effektoren und interkonvertierbare Enzyme ist für den Umschaltprozess notwendig

Das Vorhandensein von gluconeogenen Substraten insbesondere bei hypoglycämischen Bedingungen, wenn die Leber HGP betreiben soll, kann ein wichtiger beschränkender Faktor sein.

3.4.2 Glykogenspeicher - Glykogen als Puffer

Hypothese Der Glykogenspeicher wird bei HGP geleert und bei HGU gefüllt. Durch den Glykogenspeicher kann die Aufgabe der Blutglucosehomöostase besser erfüllt werden.

Der Glykogenspeicher hat eine wichtige Rolle in der Glucosehomöostase. Er dient als Glucosespeicher für hypoglycämische Bedingungen, wodurch die Glucoseabgabe ans Blut im Vergleich zur HGP allein durch Gluconeogenese erhöht werden kann.

Weiterhin hat der Glykogenspeicher auch eine wichtige Rolle für die Glucosehomöostase unter hyperglycämischen Bedingungen. Durch die Glykogensynthese und das Speichern der Glucose kann zusätzlich Glucose aus dem Blut entfernt werden, der euglycämische Bereich wird schneller wieder eingestellt. Bei schneller Erhöhung der Blutglucose nach Nahrungsaufnahme beispielsweise nach Übernachtfasten, kann die Leber durch diese zusätzliche Pufferkapazität, den Normalwert schneller wieder einstellen.

Die Geschwindigkeit mit der der Glykogenspeicher je nach externer Glucose gefüllt bzw. geleert wird hängt von der Abweichung vom Umschaltpunkt der Speicherung ab. Je stärker die Hyperglycämie, desto schneller wird der Speicher gefüllt, je größer die Hypoglycämie, desto schneller wird der Speicher geleert. Der Umschaltpunkt liegt im Bereich von 5 mM, hängt aber geringfügig von der externen Laktatkonzentration ab.

Das Umschalten zwischen HGP und HGU funktioniert auch ohne das Glykogensystem, d.h. wenn die Pufferkapazitäten erschöpft sind. HGP kann unter hypoglycämischen Bedingungen auch bei geleerten Glykogenspeichern über Gluconeogenese stattfinden. HGU kann unter hyperglycämischen Bedingungen auch bei vollständig gefüllten Glykogenspeichern über Glykolyse stattfinden. Der Glykogenspeicher bildet eine zusätzliche Reserve bzw. Puffer wodurch HGP und HGU erhöht werden können.

Der Zustand des Glykogenspeichers beeinflusst sowohl HPG, als auch HGU.

3.4.3 Diabetes

Hypothese Bei gestörten Insulin- und Glucagonsignalen ist auch der Umschaltprozess zwischen HGP und HGU gestört. Im Fall von Diabetes Typ II führt diese Störung zu einer erhöhten HGP. Durch Insulingabe kann die Störung teilweise wieder behoben werden.

Um die Effekte von Diabetes und mögliche Therapieansätze zu untersuchen, wurden in dem Modell die aus den gestörten Insulin- und Glucagonsignalen resultierenden Veränderungen der Glucosehomöostase und des Glykogenstoffwechsels untersucht. Diabetes Typ II Patienten haben deutlich unterschiedliche Dose-Response Kurven für Insulin und Glucagon im Vergleich zu gesunden Personen (Kap. 3.3.3). Da diese Hormone über die Veränderung des Phosphorylierungszustands der interkonvertierbaren Enzyme die Kinetiken wichtiger Schlüsselenzyme verändern,

ist zu erwarten, dass die Glucosehomöostase beeinträchtigt wird.

Diabetes Typ II wurde mittels der in Patienten bestimmten, veränderten Dose-Response Kurven für Insulin und Glucagon simuliert (Abb. 3.7). Alle anderen Bedingungen in den verschiedenen Simulationen waren identisch.

Zur Untersuchung möglicher Therapieansätze wurde einerseits nur die Insulin Antwort wiederhergestellt (nur Diabetes Glucagon Dose-Response Kurve, normale Insulin Dose-Response Kurve) und andererseits nur die Glucagon Antwort wiederhergestellt (nur veränderte Insulin Dose-Response Kurve, normale Glucagon Dose-Response Kurve).

Die zeitlichen Verläufe der HGP/HGU (GLUT2) und der Glykogenkonzentration in Abhängigkeit von der Blutglucosekonzentration sind in Abb. 3.22 für gesunde Personen (normal), Diabetes Typ II (diabetes), Insulintherapie (insulin restored) und Glucagontherapie (glucagon restored) dargestellt.

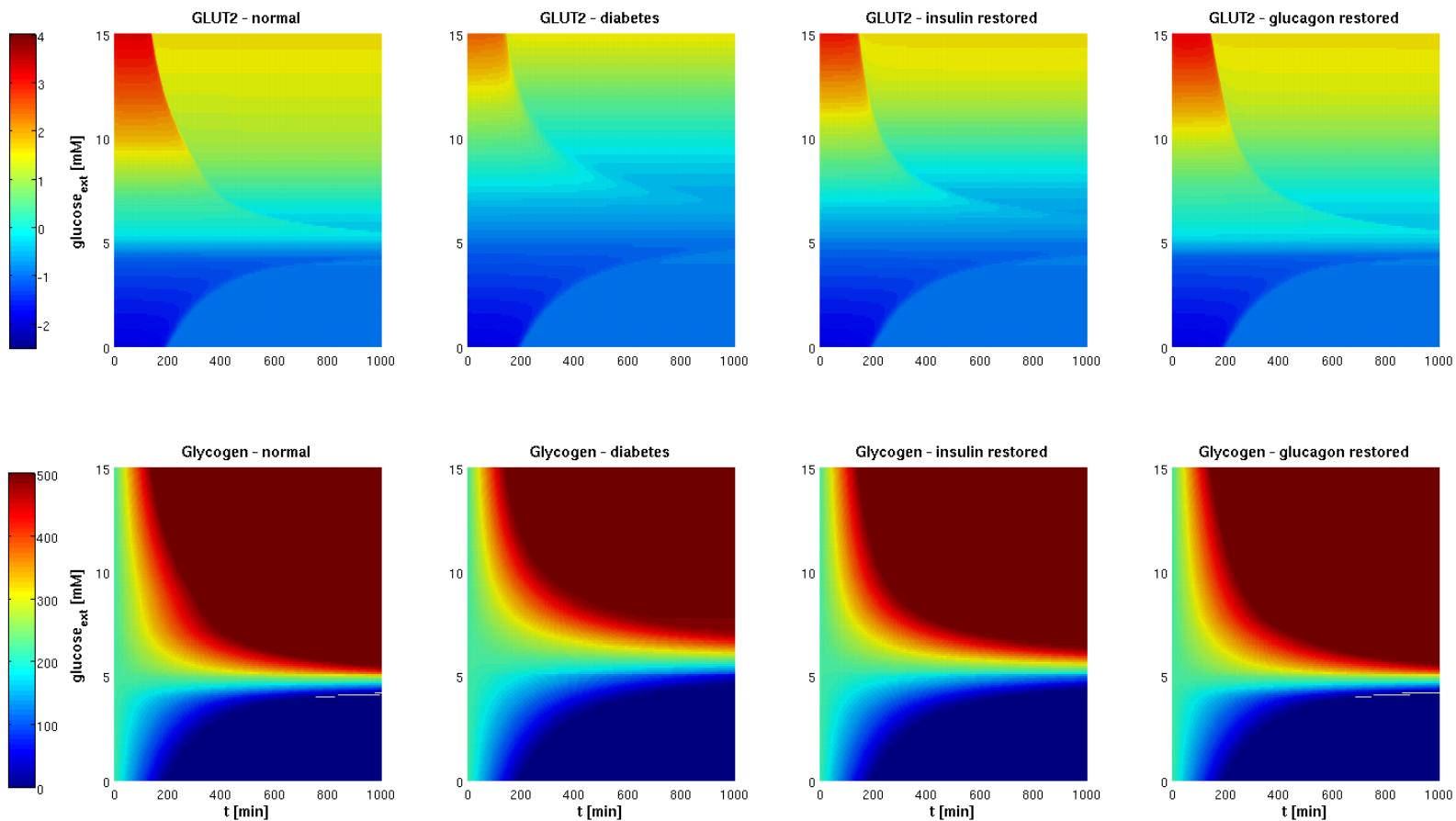


Abbildung 3.22: Zeitlicher Verlauf von HGP/HGU ($\text{GLUT2 } [\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{min}]$) und Glykogen [mM] bei gesunden Personen (normal), Patienten mit Diabetes Typ II (diabetes) und Patienten mit Diabetes Typ II und Insulin (insulin restored) bzw. Glucagontherapie (glucagon restored) in Abhängigkeit von der Blutglucose [mM]. Der Glykogenmetabolismus ist bei Diabetes nur wenig verändert. Der Umschaltpunkt zwischen HGP und HGU ist zu deutlich höheren Glucosekonzentrationen verschoben. Durch Wiederherstellung der Insulinantwort kann ein Teil dieser Effekte umgekehrt werden, ebenso durch Wiederherstellung der Glucagonantwort. Glucagon ist effektiver als die Insulinwiederherstellung.

Diabetes Typ II Die Glucosehomöostase ist bei Diabetes Typ II stark verändert. Die Blutglucosekonzentration, bei der zwischen HGP und HGU umgeschaltet wird, ist zu deutlich höheren Glucosekonzentrationen verschoben. Die HGP ist deutlich erhöht, auch oberhalb von ~ 7 mM wird viel Glucose in die Blutbahn abgegeben.

Das Modell kann die in Diabetes Typ II beobachteten deutlich erhöhten Blutglucosewerte (Abb.3.4) reproduzieren. Durch die gestörten Hormonantworten stellt der Hepatozyt einen Sollwert in Abhängigkeit vom Zustand des Glykogenspeichers zwischen 8-11 mM ein.

Auch der Glykogenstoffwechsel ist im Fall von Diabetes Typ II gestört (Abb. 3.22). Allerdings sind die Effekte deutlich geringer als auf die HGP/HGU. Einerseits werden die Glykogenspeicher langsamer gefüllt bzw. geleert, andererseits ist die Blutglucosekonzentration, bei der zwischen gefüllten und leeren Glykogenspeichern umgeschaltet wird, zu höheren Blutglucosekonzentrationen verschoben. Im Vergleich zur Verschiebung des Umschaltpunkts zwischen HGP und HGU ist die Verschiebung von 5 mM auf ~ 6 mM nur gering.

Insulintherapie Die diabetischen Effekte können durch Gabe von Insulin teilweise normalisiert werden. Bei Wiederherstellung der normalen Insulin-Dose-Response Kurve verschiebt sich der Umschaltpunkt zwischen HGP und HGU im Vergleich zur Diabetes zu niedrigeren Blutglucosekonzentrationen. Auch die diabetischen Effekte auf den Glykogenstoffwechsel können durch Insulingabe in dem Modell teilweise behandelt werden. Allerdings ist eine Wiederherstellung der Insulin-Dose-Response Kurve nicht ausreichend, um die diabetischen Effekte vollständig zu beseitigen.

Glucagontherapie Die diabetischen Effekte können durch Wiederherstellung der Glucagon Dose-Response Kurve teilweise wieder normalisiert werden. Der Umschaltpunkt zwischen HGP und HGU verschiebt sich im Vergleich zur Diabetes zu niedrigeren Blutglucosekonzentrationen. Auch die diabetischen Effekte auf den Glykogenstoffwechsel können durch Glucagonwiederherstellung in dem Modell behandelt werden. Allerdings reicht eine Wiederherstellung der Glucagon-Dose-Response Kurve für die Blutglucosekonzentration nicht aus, um die Effekte umzukehren.

Die Glucagonwiederherstellung ist deutlich effektiver in der Behandlung der diabetischen Effekte als die Insulinwiederherstellung. Dies gilt sowohl für den Glykogenstoffwechsels als auch für die Glucosehomöostase. Die Normalwerte können fast wieder vollständig hergestellt werden. Insbesondere im normalen Bereich der Blutglucose zwischen 3 und 10 mM sind die Glucagoneffekte deutlich besser, als die Insulineffekte.

In dem Modell, ist analog zu experimentellen Befunden [100, 57], eine erhöhte Gluconeogene statt erhöhter Glykogenolyse der dominierende Prozess, der für die erhöhte postabsorptive HGP Rate in Diabetes Typ II verantwortlich ist.

Daher sollten zukünftige therapeutische Ansätze sollten v.a. auf die Unterdrückung der Gluconeogenese abzielen.

genese gerichtet sein [57]. Glucagon, welches in Diabetes Typ II erhöht ist, stimuliert die Enzyme der Gluconeogenese, so dass eine Inhibierung von Glucagon eine wünschenswerte Ziel wäre [57]. Die Simulationen mit dem kinetischen Modell sprechen eindeutig für eine Wiederherstellung der Glucagonantwort beispielsweise über Inhibitoren der Glucagon Sekretion oder Glucagon Rezeptor Antagonisten als effektive Therapie von Diabetes Typ II. Dieser Ansatz scheint auf Basis der Simulationen einer Wiederherstellung der Insulinantwort überlegen zu sein.

Einer der erfolgversprechendsten Ansätze in der Diabetes Typ II Therapie der letzten Jahre sind GLP-1 Analoga, welche unter anderem auch die Glucagonsekretion inhibieren [57]. Auch Glucagon Rezeptor Antagonisten zeigen gute Ergebnisse in der Wiederherstellung der Blutglucosehomöostase bei Diabetes Typ II in Tierversuchen [169]. Glucagon als Angriffspunkt scheint ein vielversprechender Therapieansatz zu sein [170, 171, 172, 173], allerdings existiert trotz großer Anstrengungen derzeit kein therapeutischer Ansatz beim Menschen der den Glucagon / Glucagon Rezeptor Weg direkt inhibiert [169].

3.4.4 Genexpression

Hypothese Die Änderung der Genexpression führt zu einer Optimierung des jeweils geschalteten Zustands. Futile Cycles werden hierdurch minimiert.

Zur Simulation veränderter Genexpression, wurden die V_{max} der Schlüsselenzyme, deren Genexpression durch Insulin und Glucagon beeinflusst wird, variiert (GK, G6PASE, PFK1, FBP1, PFK2, FBP2 und PEPCK).

$$V_{max}^{new} = V_{max} \cdot (1 \pm c) \quad (3.46)$$

c ist dabei die prozentuale Veränderung in Richtung HGU ($c > 0$) bzw. HGP ($c < 0$).

c wird für GK, PFK1, PFK2 addiert (stärker exprimiert bei HGU, und geringer bei HGP) und für PEPCK, G6PASE, FBP1, FBP2 subtrahiert (geringer exprimiert bei HGU und stärker bei HGP).

So haben beispielsweise bei der 10% HGU Simulation die PEPCK, G6PASE, FBP1 und FBP2 nur noch 90% der ursprünglichen V_{max} , GK, PFK1 und PFK2 dagegen 110%. Die V_{max} aller anderen Reaktionen und Transporter bleiben unverändert.

Der relative Futile Cycle für den Glucose-Schalter, PFK1-FBP1-Schalter und PK-PEPCK-Schalter ergibt sich jeweils als Quotient aus kleinerem und größerem Fluss der beiden Schalterenzyme v_1 und v_2 .

$$fc = \frac{\min(v_1, v_2)}{\max(v_1, v_2)} \in [0, 1] \quad (3.47)$$

Die Auswirkungen der veränderten Genexpression auf HGP/HGU (GLUT2) und die relativen Futile Cycles der unterschiedlichen Schalter sind in Abb. 3.23 dargestellt. Dabei wurden 50% HGU, 10% HGU, normal, 10% HGP und 50% HGP untersucht.

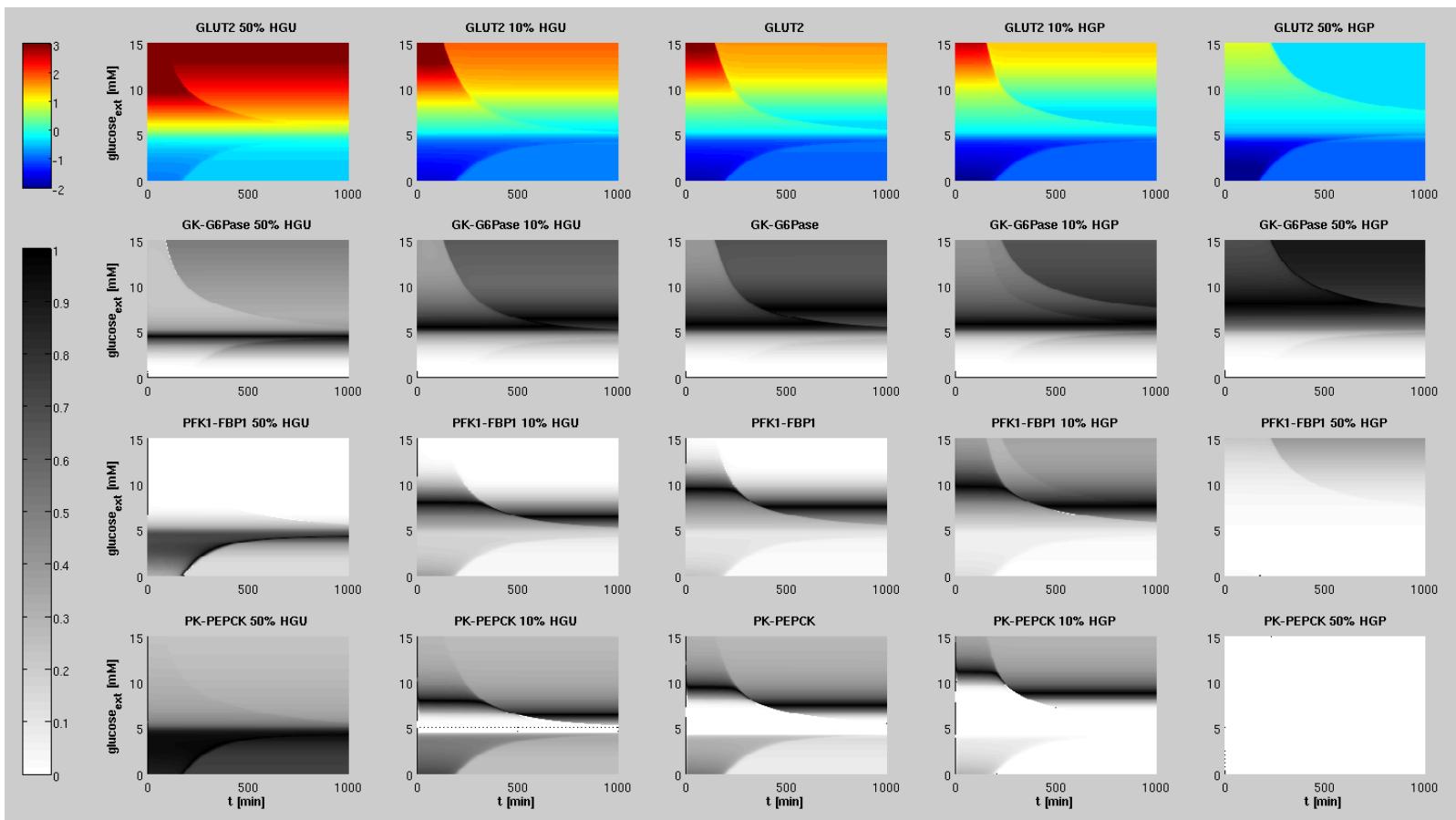


Abbildung 3.23: Zeitliche Veränderung der HGP/HGU und der relativen Futile Cycles bei konzertierter Veränderung der Expression von Schlüsselenzymen in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration. In den HGU Simulationen sind die V_{max} von GK, PFK1, PFK2 erhöht, die V_{max} von PEPCK, G6PASE, FBP1, FBP2 erniedrigt. Umgekehrt im Fall der HGP Simulationen.

Effekte auf HGP und HGU Durch die veränderte Genexpression verändert sich der Fluss durch GLUT2 (HGP/HGU) (Abb. 3.23).

Unterstützt die Genexpression die HGU (10% HGU, 50% HGU), verschiebt sich der Umschaltpunkt zwischen HGP und HGU zu niedrigeren Glucosekonzentrationen. Deutlich mehr Glucose kann über einen weiteren Blutglucosebereich aufgenommen werden. HGP ist allerdings nur noch bei sehr hypoglycämischen Bedingungen möglich, im Fall von 50% HGU fast nur noch mittels des Glykogenspeichers. Sobald kein Glykogen mehr vorhanden ist, kann kaum noch Glucose an die Blutbahn abgegeben werden.

Unterstützt die Genexpression die HGP (10% HGP, 50% HGP), verschiebt sich der Umschaltpunkt dagegen zu höheren Blutglucosekonzentrationen. Der Blutglucosebereich, in dem Glucose an die Blutbahn abgegeben werden kann, wird deutlich größer. HGU kann allerdings nur noch unter hohen Glucosekonzentrationen stattfinden. Bei 50% HGP kann Glucose nur noch zum Auffüllen der Glykogenspeicher aufgenommen werden, bei gefüllten Glykogenspeichern findet keine HGU mehr statt.

Durch Veränderung der Genexpression kann der Umschaltpunkt zwischen HGP und HGU und damit auch der Blutglucosesollwert, den der Hepatozyt einzustellen versucht, deutlich verschoben werden.

Effekte auf Futile Cycles Durch die Veränderung der Genexpression ändern sich auch die relativen Futile Cycles der Schalterenzyme (Abb. 3.23). Die Futile Cycles in dem jeweils durch die Genexpression optimierten Zustand nehmen ab. Wird die Genexpression auf HGU geschaltet, sind die Futile Cycles im hyperglycämischen Bereich geringer, wird auf HGP geschaltet, sind sie im hypoglycämischen Bereich geringer.

So verbraucht der GK-G6Pase Schalter deutlich weniger Energie im hyperglycämischen Bereich, wenn die Genexpression auf HGU optimiert wird und deutlich weniger Energie im hypoglycämischen Bereich, wenn die Genexpression auf HGP optimiert wird.

Durch die Anpassung der Genexpression kann der Umschaltpunkt zwischen HGP und HGU und die Menge an aufgenommener Glucose bei HGU bzw. abgegebener Glucose bei HGP variiert werden. Weiterhin werden durch die Genexpression auch die Futile Cycles an den verschiedenen Schaltern variiert.

Durch die Anpassung der Genexpression kann daher über längere Zeiträume einerseits die Glucoseabgabe und Glucoseaufnahme an die jeweiligen Bedürfnisse des Organismus angepasst werden (insbesondere über längere Zeiträume, wie dem Übernachtfasten), andererseits aber auch die Energieverschwendungen, die an den Schaltern auftritt, für die jeweiligen Zustände minimiert werden.

3.4.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein detailliertes kinetisches Modell der Glykolyse, Gluconeogenese und des Glykogenstoffwechsels des humanen Hepatozyten aufgestellt. Dieses beinhaltet sowohl allosterische Regulationsmechanismen als auch hormonelle Regulation durch Insulin und Glucagon. Die Hormone wirken dabei über Veränderung des Phosphorylierungszustands interkonvertierbarer Enzyme.

Das Modell ist in der Lage das schnelle Umschaltverhalten des Hepatozyten zwischen HGP und HGU in Abhängigkeit von der externen Glucosekonzentration zu zeigen. Eine Veränderung der Genexpression ist für den Umschaltprozess nicht notwendig. Allerdings kann durch die Genexpression sowohl der Umschaltpunkt zwischen HGP und HGU, als auch die Futile Cycles an den Schaltern beeinflusst werden.

Der Glykogenspeicher wird bei HGP geleert und bei HGU gefüllt. Durch den Glykogenspeicher kann die Aufgabe der Blutglucosehomöostase besser erfüllt werden. Glykogen hat sowohl eine Funktion als Glucosereserve für die HGP, spielt aber auch eine wichtige Rolle in der HGU, da durch die Glykogenspeicherung schnell Glucose aus der Blutbahn entfernt werden kann.

Bei gestörten Insulin und Glucagonsignalen ist auch der Umschaltprozess zwischen HGP und HGU gestört. Im Fall von Diabetes Typ II führt diese Störung zu einer erhöhten HGP, der Glykogenstoffwechsel wird nur wenig verändert. Durch Wiederherstellung der Insulin- und Glucagonantwort können diese Störungen teilweise behoben werden. Hierbei ist die Wiederherstellung der Glucagonantwort in den Simulationen ein effizienter Therapieansatz für die Behandlung von Diabetes Typ II, als die Wiederherstellung der Insulinantwort.

3.5 Diskussion

Nach meinem Kenntnisstand ist dies das erste detaillierte humane kinetische Modell von Glykolyse, Gluconeogenese und Glykogenstoffwechsel, welches die hormonelle Wirkung von Insulin und Glucagon integriert. Das Modell zeigt in den Simulationen eine Vielzahl von Effekten, die experimentell gezeigt wurden:

- Die Umschaltung zwischen HGP und HGU in Abhängigkeit von der Blutglucosekonzentration [47, 55].
- Die Rolle des Glykogenspeichers in HGP und HGU. Der Anteil der Glykogenolyse an der HGP nimmt mit der Zeit ab. Bei leeren Glykogenspeichern ist das System in der Lage auch weiterhin HGP zu betreiben, diese findet vollständig über Gluconeogenese statt [46, 47, 58, 57]
- Bei geringen gluconeogenen Substratkonzentrationen (Laktat) können diese limitierend für die HGP sein, eine deutliche Erhöhung der gluconeogenen Substrate muss keine Erhöhung der Gluconeogenese bewirken [47, 61].
- Die veränderten Hormonantworten in Diabetes Typ II bewirken auch einen Diabetes Phänotyp in dem Modell. Dieser besitzt eine deutlich erhöhte HGP, kaum veränderter Glykogenstoffwechsel und einen deutlich erhöhten Glucosesollwert [47]. Eine erhöhte HGP ist ein Hauptfaktor für die Hyperglycämie im gefasteten Zustand [99, 101, 47].
- Durch Wiederherstellung der Insulin- und Glucagonantworten in Patienten mit Diabetes Typ II kann die Glucosehomöostase wieder besser eingestellt werden.

Bei der Bewertung dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass

- das Modell auf einigen Vereinfachungen basiert
- die Veränderung der Genexpression nicht Teil des Modells ist
- die Futile Cycles an einigen Schaltern recht hoch sind
- einiges experimentelles Verhalten noch nicht korrekt wiedergegeben wird.

3.5.1 Vereinfachungen in dem Modell

Konstante Konzentrationen Einige der Metabolitkonzentrationen wurden in den Simulationen auf konstante Werte gesetzt. Dies sind insbesondere die Metabolite, die den Energiezustand des Hepatozyten bestimmen (ATP, ADP, NADH, NAD). Die experimentell bestimmten Konzentrationswerte für diese Metabolite unterscheiden sich zwischen gefasteten und gefüttertem Zustand nur wenig. Der Energiestoffwechsel scheint daher bei HGP und HGU relativ konstant

zu sein.

In den Simulationen wird daher davon ausgegangen, dass die energetische Versorgung auch für die energieaufwenige Gluconeogenese (und Glykogensynthese) gewährleistet wird. Daher sind die Simulationsergebnisse nur für energetisch gut versorgte Hepatozyten gültig.

Die Energieversorgung der Leber erfolgt v.a. über die β -Oxidation von Fettsäuren. In den FBA Simulationen konnte gezeigt werden, dass die Gluconeogenese auch ohne Fettsäuren ablaufen kann. Dabei wird ein Teil des Pyruvats (welches aus dem Laktat über LDH entsteht) über die PDH zu Acetyl-CoA, welches im TCA in Kombination mit der oxidativen Phosphorylierung die Energieversorgung des Hepatozyten gewährleisten kann. Daher sollte der Hepatozyt selbst bei fehlenden Fettsäuren nicht in energetische Probleme kommen und die Energieversorgung kein limitierender Faktor unter normalen Bedingungen für den Hepatozyten sein.

Ein konstantes Energilevel ist daher eine erste gute Näherung für den Hepatozyten, solange die Stoffwechselwege von TCA und oxidativer Phosphorylierung noch nicht Teil des Modells sind.

Weiterhin wurden auch die Schnittstellenmetabolite mit dem TCA konstant gehalten (Citrat und Acetyl-CoA). Diese sind in der Zelle ständigen Veränderungen unterworfen, welche die Glucosehomöostase beeinflussen können. Diese beeinflussen v.a. die Verteilung des Pyruvats auf die PC und PDH Reaktion und daher das Schicksal des aufgenommenen Laktat.

Hormonelle Signaltransduktion Die gesamte hormonelle Signaltransduktion von Insulin und Glucagon ist in einer vereinfachten Signalfunktion γ zusammengefasst, welche darüber hinaus für alle interkonvertierbaren Enzyme identisch ist. Die Signalwege von Insulin und Glucagon unterscheiden sich und auch die Wirkung der Hormone auf die verschiedenen interkonvertierbaren Enzyme ist unterschiedlich. So wirkt Insulin beispielsweise stärker auf den Glykogenstoffwechsel, als auf die Glykolyse / Gluconeogenese. Die verschiedenen Signalkaskaden sind sehr komplex und zum Teil noch gar nicht vollständig aufgeklärt. Die Signalfunktion beeinflusst wesentlich das Verhalten des Systems.

Durch Individualisierung der Signalfunktionen kann das System mit Sicherheit weiter optimiert werden.

Glykogenstoffwechsel Der Glykogenstoffwechsel ist nur sehr vereinfacht beschrieben. Im Hepatozyten spielen neben der GP und der GS auch Branching und Debranching-Enzym eine wesentliche Rolle. Weiterhin ist der Ausgangspunkt der Glykogensynthese, das Glycogenin nicht Teil des Modells.

Außerdem ist nur ein Teil des Glykogen für die Enzyme zugänglich. Geflogen ist ein komplexes Speicherprotein, die Synthese und der Abbau kann jeweils nur an den freien Endketten stattfinden. Die real von den Enzymen des Glykogenstoffwechsels verwendbare Glykogenmenge unterscheidet sich daher deutlich von der Gesamtmenge an Glykogen.

Auch ist die Behandlung der GS als interkonvertierbares Enzym, welches entweder unphospho-

ryliert oder phosphoryliert vorliegen kann vereinfacht. Die GS kann an verschiedenen Stellen phosphoryliert werden, so dass Phosphorylierungszustände von unphosphoryliert, über teilweise phosphoryliert bis zu vollständig phosphoryliert reichen. Besonders interessant ist hierbei auch das Wechselspiel zwischen Interkonvertierung und allosterischer Regulation. So wird die GS erst nach Bindung von glc6p in einen Zustand überführt der die Phosphorylierung und damit die Veränderung des Interkonvertierungszustand ermöglicht. Derzeit sind die allosterischen Effekte und die Interkonvertierung der Enzyme vollkommen unterschiedliche und voneinander unabhängige Effekte.

Zytosolische G6PASE Die G6PASE ist in dem Modell als zytosolisches Enzym beschrieben. Im Hepatozyten ist die G6PASE dagegen ein Membranenzym des endoplasmatischen Retikulums (ER) mit der katalytischen Stelle zur Innenseite des ER Lumens. Transporter für glc6p, p und glc existieren in der ER Membran. Die räumliche Trennung kann von entscheidender Bedeutung für den GK-G6PASE Schalter sein. Hierdurch können die Futile Cycles deutlich reduziert werden, da die gegensätzlichen Reaktionen in räumlich getrennten Kompartimenten ablaufen.

PEPCK In allen Simulationen wurde nur die mitochondriale PEPCK in Kombination mit dem PEP-Transporter in der mitochondrialen Membran zur Gluconeogenese verwendet. Im Hepatozyten existiert sowohl eine mitochondriale, als auch eine zytosolische Isoform der PEPCK. Eine Vielzahl zusätzlicher Reaktionen und Transporter sind notwendig, wenn diese in das Modell integriert werden soll, hierbei v.a. die Reaktionen des Malatshuttle bestehend aus zytosolischer und mitochondrialer MDH und mehrere Transporter. Der Malatshuttle ist dabei für den Transport von Reduktionsenergie für die GAPDH Reaktion zuständig.

Bei Laktat als Ausgangspunkt der Gluconeogenese wird v.a. der Weg über die mitochondriale PEPCK gegangen, da die reduzierten Reduktionsäquivalente für die GAPDH in der LDH Reaktion entstehen [42]. In den FBA Simulationen zur Gluconeogenese wurde deutlich, dass ausgehend von Laktat v.a. die mitochondriale PEPCK für die Gluconeogenese verwendet wurde. Daher wurde zunächst nur das mitochondriale Isoenzym in das Modell integriert. Für eine vollständige Untersuchung muss das System in Zukunft um die zytosolische PEPCK und Malatshuttle erweitert werden.

Mitochondriale Transporter Die Transporte von pep und pyr über die innere Mitochondrienmembran sind an den Protonengradienten gekoppelt. Da dieser nicht Teil des Modells ist, wurden die Transporte vereinfacht als erleichterte Diffusion analog zum GLUT2 Transport beschrieben. Die k_m Werte wurden jeweils auf die physiologischen Konzentrationen der transportierten Metabolite gesetzt, die Transporte sind symmetrisch mit einer Gleichgewichtskonstante von 1.

In dieser Vereinfachung wird davon ausgegangen, dass der Hepatozyt unter allen Bedingungen

energetisch gut versorgt ist und daher auch ein ausreichender Protonengradient für die Transportprozesse über die innere Mitochondrienmembran existiert.

In Realität können die Transporter eine komplexere Kinetik besitzen, die das Verhalten des Systems wesentlich beeinflussen kann. Insbesondere die Kopplung an den Protonengradienten kann die Transportumsätze in Abhängigkeit vom Energiezustand und dem Protonengradienten verändern.

3.5.2 Futile Cycles

Die Futile Cycles sind in einigen der Simulationen sehr hoch. In der Zelle wird mit Sicherheit deutlich weniger Energie an den Schalterenzymen verschwendet werden, als durch die Simulationen vorhergesagt. Die Optimierung kann dabei durch Veränderung der Genexpression oder auch räumliche Trennung reziproken Schalterenzymen erfolgen.

GS und GP In den Simulationen zur HPG fallen die sehr großen Futile Cycles im Glykogenstoffwechsel auf, die durch gleichzeitigen Fluss durch GS und GP entstehen. Die genannten Vereinfachungen des Glykogenstoffwechsels tragen mit Sicherheit wesentlich zu den hohen Energieverschwendungen bei. Eine erweiterte Beschreibung beispielsweise über Integration der Branching- und Debranching Enzyme könnte die Futile Cycles deutlich minimieren.

Auch ein gegenseitiger Ausschluss der gegenläufigen Prozesse könnte in der Zelle wesentlich zur Energieoptimierung beitragen, beispielsweise dadurch, dass die Bindung der GS an die freien Glykogenenden, die Bindung von GP ausschließt und umgekehrt.

Futile Cycles zwischen GK und G6Pase Auch die Futile Cycles an der GK und G6PASE sind sehr hoch. Diese werden mit Sicherheit durch Genexpression reduziert, da G6PASE und GK Expression auf den jeweiligen HGU / HGP Zustand angepasst werden. Weiterhin könnte auch die räumliche Separation von GK und G6PASE in Zytosol und ER die Energieeffizienz des Schalters deutlich verbessern. Die in der Zelle auftretenden Futile Cycles werden vermutlich deutlich geringer sein, als in den Simulationen.

3.5.3 Genexpression

Die Genexpression fehlt bisher in dem Modell. Durch die Genexpression können die Futile Cycles und auch der Schaltpunkt zwischen HGP und HGU verändert werden. Die Expressionsänderungen von Schlüsselenzymen werden über längere Zeiträume als die schnelle Hormonwirkung die jeweiligen Zustände optimieren und die Futile Cycles deutlich verringern. Das schnelle Schaltverhalten wird sich hierdurch nicht verändern, aber die Energieeffizienz des eingestellten Zustands auf längere Sicht.

3.5.4 Abweichungen vom Experiment

Einige experimentelle Befunde können derzeit noch nicht von dem Modell korrekt wiedergegeben werden. Dies ist einerseits das zeitliche Verhalten der Glykogenspeicherung und -Freisetzung und andererseits die Kopplung der Glykogensynthese an die Gluconeogenese.

Zeitliches Verhalten Nach Übernachtfasten trägt die Glykogenolyse ungefähr zu 50% zur HPG bei. In den Simulationen ist dagegen der Glycogenspeicher nach 8-10h bereits vollständig geleert und die Glykogensynthese erfolgt recht langsam. Die Glykogenspeicher sollten bei hyperglycämischen Bedingungen sehr viel schneller gefüllt werden. Eine Ursache für die Unterschiede im zeitlichen Verhalten sind mit Sicherheit die durchgeführten Vereinfachungen des Glykogenstoffwechsels und die daraus resultierenden Veränderungen des Systems.

Weiterhin war der zeitliche Verlauf des Glykogen kein Faktor, der in der Optimierung der V_{max} berücksichtigt wurde. Daher sind mit Sicherheit V_{max} Lösungen möglich, die das zeitliche Verhalten des Glykogenspeichers besser wiedergeben.

Glykogensynthese aus Glucose oder Laktat In den Simulationen findet die Glykogensynthese vollständig aus der aufgenommenen Glucose statt.

Allerdings wird experimentell eine Kopplung der Glykogensynthese an die Gluconeogenese beobachtet [46]. In vivo werden die Glykogenspeicher daher nur zum Teil aus externer Glucose gefüllt, das restliche Glykogen stammt aus gluconeogenen Vorstufen. Die Umschaltung auf Ebene der Gluconeogenese / Glykolyse erfolgt zeitverzögert zum Umschalten auf der Ebene des Glucoseschalters und des Glycogenschalters. Erst wenn der Glycogenspeicher voll ist, wird von Gluconeogenese auf Glykolyse umgeschaltet, der fru26bp Spiegel steigt erst bei gefüllten Glykogenspeichern an.

Dies widerspricht dem Simulationsverhalten, indem keine Glykogensynthese basierend auf der Glucose aus der Gluconeogenese stattfindet.

Allerdings war die Beeinflussung des Schaltprozesses auf Ebene der PFK1 / FBP1 durch den Zustand des Glykogenspeichers deutlich in den Simulationen erkennbar. Nahezu sämtliche Flüsse und Konzentrationen in dem Modell wurden durch den Zustand des Glykogenspeichers beeinflusst. Weiterhin findet die Glykolyse während der Glykogensynthese nur auf einem sehr niedrigen Niveau statt. Durch manuelle Variation der V_{max} war es möglich, Parametersätze zu finden, mit denen der PFK1 / FBP1 Schalter erst bei gefüllten Glykogenspeichern auf die Glykolyse umschaltete. Die Gluconeogenese war dabei für einen nicht unerheblichen Teil der Glykogensynthese verantwortlich. Durch systematische Optimierung der V_{max} - Werte ist es daher mit Sicherheit möglich auch diese Verhalten in Zukunft mit dem Modell zu beschreiben.

3.6 Ausblick

Das aufgestellte kinetische Modell der Glykolyse, Gluconeogenese und des Glykogenstoffwechsels ist nur ein erster Schritt, um die Rolle des Hepatozyten in der humanen Glucosehomöostase zu verstehen. Ausgehend von diesem Startpunkt sind weitere Arbeiten und Erweiterungen des Modells geplant.

3.6.1 Zeitabhängigkeit der Hormonantwort

Im derzeitigen Stand des Modells erfolgt die Veränderung des Phosphorylierungszustands der interkonvertierbaren Enzyme bei veränderten Insulin- und Glucagonantworten instantan. Die Veränderung des Phosphorylierungszustands durch Insulin und Glucagon findet allerdings im Zeitraum einiger Minuten statt. Daher ist ein nächster Schritt die Integration der zeitlichen Verzögerung der Hormonantwort in das Modell und die Untersuchung der daraus resultierenden Effekte. Die schnellen allosterischen Effekte und die Veränderung durch die Hormonantwort bewegen sich dann auf unterschiedlichen Zeitskalen und insbesondere Modellverhalten in den ersten Minuten nach Veränderung der externen Glucose- und Hormonkonzentrationen kann sich deutlich verändern. Von besonderem Interesse sind die Auswirkungen der Zeitabhängigkeit der Hormonwirkung auf die Blutglucosehomöostase und das Umschalten zwischen HGP und HGU.

3.6.2 Optimierung der V_{max}

Die in den bisherigen Simulationen verwendeten V_{max} sind nur basale Optimierungen an die vorhandenen experimentellen Flussdaten und Konzentrationen. Hier besteht noch sehr viel Potential zur Optimierung, da die Optimierung einerseits nur sehr basal durchgeführt wurde, andererseits sehr viele Experimentelle Daten noch nicht berücksichtigt wurden. Diese Optimierung wird in Zukunft deutlich erweitert werden und zusätzliche experimentelle Daten integrieren. Dabei sollen neben quantitativen Fluss- und Konzentrationsdaten auch qualitatives Systemverhalten in der Optimierung berücksichtigt werden. So könnten beispielsweise die quadratischen Abstände zwischen experimentellen Daten und Simulationen minimiert werden bei gleichzeitiger Minimierung der Futile Cycles an den Schaltern als zusätzliche Nebenbedingungen.

So sind mit Sicherheit V_{max} zu erwarten, die die vorhandenen experimentellen Befunde noch besser beschreiben und auch die zum Teil sehr hohen Futile Cycles noch deutlich verringern.

3.6.3 MCA

Von Interesse ist weiterhin, welchen Einfluss die unterschiedlichen Modellparameter auf das Systemverhalten besitzen. Ein nächster Schritt wird daher eine detaillierter Analyse des vorhandenen Modells mittels metabolischer Kontrolltheorie (MCA) sein. Hierdurch kann einerseits das Modell besser verstanden werden, andererseits aber auch besonders sensitive Parameter und Stellgrößen

in dem Modell aufgedeckt werden. Durch MCA und den Vergleich der Ergebnisse bei normalen Hormon Dose-Response Kurven und Patienten mit Diabetes Typ II, können mit der Methode auch mögliche Behandlungsansätze von Diabetes untersucht werden. Von besonderem Interesse sind Parameter, die den diabetischen Effekten entgegenwirken.

3.6.4 Erweiterung des Modells

Das Kernmodell der Glykolyse, Gluconeogenese und des Glykogenstoffwechsels kann in viele unterschiedliche Richtungen erweitert und dadurch verschiedenste Fragestellungen in Angriff genommen werden.

PEPCK und Malatshuttle Ein nächster Schritt ist die Erweiterung um die zytosolische PEPCK, die v.a. auch bei der Verwendung alternativer gluconeogener Substrate zum Laktat eine entscheidende Rolle in der Gluconeogenese spielt. Zusätzlich muss das Modell um die Reaktionen erweitert werden, die das Oxalacetat über den Malatshuttle aus dem Mitochondrium ins Zytosol transportieren. Einerseits können dann auch andere gluconeogene Substrate als Laktat untersucht werden und die Rolle der zytosolischen und mitochondrialen Isoenzyme der PEPCK untersucht werden.

Erweiterung um weitere gluconeogene Substrate Laktat ist die wichtigste Vorstufe der Gluconeogenese. Um ein vollständigeres Bild der Gluconeogenese und der Glucosehomöostase zu bekommen, muss das Modell um weitere Vorstufen der Gluconeogenese und die zugehörigen Stoffwechselwege erweitert werden. Von Interesse sind insbesondere die Einbindung des Glycerolstoffwechsel, der bei längerem Fasten an Bedeutung gewinnt und des Fructosestoffwechsels, der über die Aldolase B und das Intermediat fruc1p, welches die Bindung des GKRP an GK beeinflusst, den Glucosestoffwechsel stark beeinflussen kann.

Weiterhin sind die Verwendung von Aminosäuren als Vorstufen der Gluconeogenese von Interesse, die letztendlich zu Oxalacetat umgewandelt werden und so als Substrat der Gluconeogenese zur Verfügung stehen.

Anbindung des Pentosephosphatwegs (PPP) Bei Anbindung des PPP interessiert, wie die Bereitstellung von NADPH für anabole Prozesse und Ribose-5P für den Purin- und Pyrimidinstoffwechsel, die Glucosehomöostase beeinflusst.

Anbindung an den Fettsäurestoffwechsel Der Fettsäurestoffwechsel ist insbesondere im Hinblick auf die Energieversorgung des Hepatozyten über den Abbau von Fettsäuren wichtig, aber auch die regulatorischen Effekte, die Fettsäuren auf die Glucosehomöostase besitzen spielen eine wichtige Rolle.

Energiestoffwechsel - TCA und Atmungskette In der bisherigen Version des kinetischen Modells wird der energetische Zustand der Zelle über die ATP, ADP, NADH und NAD Konzentrationen vorgegeben. Einer der nächsten Schritte muss die Untersuchung des Modellverhaltens bei unterschiedlichen energetischen Zuständen sein. Eine Anbindung des Energiestoffwechsels und des TCA, der v.a. an die wichtigen Intermediate Oxalacetat und Acetyl-CoA gekoppelt ist, kann insbesondere die Frage, wie der Energiezustand der Zelle und die Intermediate des TCA die Fähigkeit zur Glucosehomöostase beeinflussen, in Angriff nehmen.

3.6.5 Integration von Genexpressionsdaten

Eine interessante Erweiterung ist mit Sicherheit auch die Verwendung von Expressionsdaten für die unterschiedlichen Zustände (overnight fast, fed), falls diese vorhanden sind. So könnten die Effekte der veränderten Genexpression auf die Blutglucosehomöostase und auch die Futile Cycles untersucht werden. Auch die Verwendung von Expressionsdaten aus periportalem und perivenösem Bereich und die Untersuchung der Effekte auf die Zonierung des Glucosemetabolismus sind von Interesse.

3.6.6 Zeitlich veränderliche Blutglucosekonzentrationen

Die Blutglucose- und die Blatlaktatkonzentration sind keine konstanten Größen, sondern ständigen Schwankungen unterworfen. Einerseits durch Nahrungsaufnahme, andererseits aber auch durch unterschiedliche Belastungssituationen, wie beispielsweise sportliche Betätigung. Weiterhin verändern auch die HGP und HGU Aufnahme von Laktat und Abgabe bzw. Aufnahme von Glucose die Blutkonzentrationen.

Eine der nächsten Schritte wird die Erweiterung des Modells um eine Blutkompartiment mit Glucoseverbrauchern und Laktatproduzenten (Muskel), sowie externen Störungen der Glucosekonzentrationen sein (Nahrungsaufnahme). Das kinetische Modell wird so in den systemischen Zusammenhang des Organismus integriert. Dadurch kann untersucht werden, welche Rolle die Leber in der Blutglucosehomöostase hat und wie das Hepatozytenmodell nach Auslenkungen aus der Euglycämie in der Lage ist, den Blutglucosewert wieder auf den Sollwert zurückzubringen.

In diesem Zusammenhang sind besonders die Simulation von Glucosetoleranztests von Interesse, aber auch die Blutglucosehomöostase unter sportlicher Belastung. Im ersten Fall erfolgt eine Störung durch Zufuhr von externer Glucose, im zweiten Fall wird die Rate des Glucoseverbrauchs erhöht.

Auch in diesem erweiterten System sind die Effekte, die durch veränderte Glucagon- und Insulinkurven, wie sei bei Diabetes Typ II auftreten von besonderem Interesse.

In dieser Arbeit wurde ein kinetisches Modell der humanen Glykolyse, Gluconeogenese und des Glykogenstoffwechsels, welches die hormonellen Wirkungen von Insulin und Glucagon beinhaltet.

haltet, aufgestellt.

Das Modell ist in der Lage in Abhängigkeit von der externen Blutglucosekonzentration zwischen HGP und HGU umzuschalten. Glykogen übernimmt eine Pufferfunktion in HGU und HGP. Die Effekte von Diabetes Typ II können korrekt vorhergesagt werden.

Anhang A

Tabellen

Tabelle A.1: Vollständig Liste der durchgeföhrten FBA Simulationen mit dem rekonstruiertem Kern-hepatozyten Modell zur Validierung und Rekonstruktion.

Simulation ID	Ergebnis [+/-]	Evaluator der Simulation
00_test	+	reaction ID_19899_plasma_membrane found in solution.
01_glucose_to_lactate	+	reaction ID_20156_plasma_membrane found in solution.
02_ribose_no_nadph	+	reaction ID_13729_cytosol_tr found in solution.
03_ribose_and_nadph	+	reaction ID_13729_cytosol_tr found in solution.
04_nadph_cyto	+	reaction ID_20797_cytosol found in solution.
05_nadph_mito	+	reaction ID_20797_mitochondrial_matrix found in solution.
06_glycerol_to_lactate	+	reaction ID_19816_plasma_membrane found in solution.
07_glycerol_to_lactate_nadh_unbalanced	+	reaction ID_19816_plasma_membrane found in solution.
08_glycerol_to_lactate_no_nadph_usage	+	reaction ID_19816_plasma_membrane found in solution.
09_fructose_to_pyruvate	+	reaction ID_20177_plasma_membrane found in solution.
10_atp_consumption	+	reaction ID_20827_cytosol found in solution.
11_glycogen_to_pyruvate	+	reaction ID_19256_cytosol found in solution.
12_pep_to_glycogen	+	reaction ID_15924_cytosol_tr found in solution.
13_pep_to_glycogen_1	+	reaction ID_15924_cytosol_tr found in solution.
14_lactate_to_glucose	+	reaction ID_19899_plasma_membrane found in solution.
15_alanine_to_glucose	+	reaction ID_19899_plasma_membrane found in solution.
16_pyruvate_to_glucose	+	reaction ID_19899_plasma_membrane found in solution.
17_oxalacetate_to_glucose	+	reaction ID_19899_plasma_membrane found in solution.
18_glycerol_to_glucose	+	reaction ID_19899_plasma_membrane found in solution.
19_atp_cyto_aerob	+	reaction ID_20827_cytosol found in solution.
20_atp_cyto_anaerob	+	reaction ID_20827_cytosol found in solution.
21_atp_mito_aerob	+	reaction ID_20827_mitochondrial_matrix found in solution.
22_atp_mito_anaerob	+	reaction ID_20827_mitochondrial_matrix found in solution.
23_atp_cyto_minexchange	+	reaction ID_20827_cytosol found in solution.
24_atp_mito_minexchange	+	reaction ID_20827_mitochondrial_matrix found in solution.
24_ethanol_degradation	+	reaction ID_20072_plasma_membrane found in solution.
25_ethanol_degradation_1	+	reaction ID_20072_plasma_membrane found in solution.
26_fatty_acid_synthesis	+	reaction ID_19342_cytosol found in solution.
27_fatty_acid_synthesis_1	+	reaction ID_19342_cytosol found in solution.
28_fatty_acid_synthesis_2	+	reaction ID_19342_cytosol found in solution.
30_beta_oxidation	+	reaction ID_19326_mitochondrial_matrix found in solution.
31_beta_oxidation_1	+	reaction ID_20107_plasma_membrane found in solution.
32_beta_oxidation_2	+	reaction ID_19326_mitochondrial_matrix found in solution.
33_beta_oxidation_3	+	reaction ID_19326_mitochondrial_matrix found in solution.
40_nh3_detoxification	+	reaction ID_22281_plasma_membrane found in solution.
41_nh3_detoxification_1	+	reaction ID_22281_plasma_membrane found in solution.
42_nh3_detoxification_2	+	reaction ID_22281_plasma_membrane found in solution.
43_nh3_detoxification_3	+	reaction ID_22281_plasma_membrane found in solution.
44_nh3_detoxification_anaerob	+	reaction ID_22281_plasma_membrane found in solution.
45_nh3_detoxification_anaerob_2	+	reaction ID_22281_plasma_membrane found in solution.
46_nh3_minexchange	+	reaction ID_22281_plasma_membrane found in solution.
98_arginine	+	reaction ID_19923_plasma_membrane found in solution.

Continued on Next Page...

Tabelle A.1 – Continued

Simulation ID	Ergebnis [+/-]	Evaluator der Simulation
98_glutamate	+	reaction ID_19930_plasma_membrane found in solution.
98_alanine	+	reaction ID_19916_plasma_membrane found in solution.
98_cysteine	+	reaction ID_19989_plasma_membrane found in solution.
98_serine	+	reaction ID_19975_plasma_membrane found in solution.
98_histidine	+	reaction ID_19954_plasma_membrane found in solution.
98_tyrosine	+	reaction ID_20029_plasma_membrane found in solution.
98_glycine	+	reaction ID_19968_plasma_membrane found in solution.
98_proline	+	reaction ID_19994_plasma_membrane found in solution.
98_asparagine	+	reaction ID_19942_plasma_membrane found in solution.
98_aspartate	+	reaction ID_19949_plasma_membrane found in solution.
98_glutamine	+	reaction ID_19935_plasma_membrane found in solution.
98_glutamate	+	reaction ID_19930_plasma_membrane found in solution.
98_phenylalanine	+	reaction ID_20022_plasma_membrane found in solution.
98_valin	+	reaction ID_20008_plasma_membrane found in solution.
98_isoleucin	+	reaction ID_20015_plasma_membrane found in solution.
98_leucin	+	reaction ID_20001_plasma_membrane found in solution.
98_threonine	+	reaction ID_19982_plasma_membrane found in solution.
98_trypophan	+	reaction ID_20036_plasma_membrane found in solution.
98_methionine	+	reaction ID_19961_plasma_membrane found in solution.
98_methionine_1	+	reaction ID_19961_plasma_membrane found in solution.
98_methionine_2	+	reaction ID_19961_plasma_membrane found in solution.
98_lysine	+	reaction ID_20043_plasma_membrane found in solution.
99_arginine_01	+	reaction ID_13885_blood_circulation_tr found in solution.
99_glutamate	+	reaction ID_13650_blood_circulation_tr found in solution.
99_alanine	+	reaction ID_13663_blood_circulation_tr found in solution.
99_cysteine	+	reaction ID_13795_blood_circulation_tr found in solution.
99_serine	+	reaction ID_13704_blood_circulation_tr found in solution.
99_histidine	+	reaction ID_13787_blood_circulation_tr found in solution.
99_tyrosine	+	reaction ID_13781_blood_circulation_tr found in solution.
99_glycine	+	reaction ID_14131_blood_circulation_tr found in solution.
99_proline	+	reaction ID_14215_blood_circulation_tr found in solution.
99_asparagine	+	reaction ID_15065_blood_circulation_tr found in solution.
99_aspartate	+	reaction ID_14072_blood_circulation_tr found in solution.
99_glutamine	+	reaction ID_20050_plasma_membrane found in solution.
99_glutamate	+	reaction ID_13650_blood_circulation_tr found in solution.
99_phenylalanine	+	non producability assured.
99_valin	+	non producability assured.
99_isoleucin	+	non producability assured.
99_leucin	+	non producability assured.
99_threonine	+	non producability assured.
99_trypophan	+	non producability assured.
99_methionine	+	non producability assured.
99_lysine	+	non producability assured.
300_prpp_synthesis	+	reaction ID_13937_cytosol_tr found in solution.
300_utp_synthesis	+	reaction ID_14675_cytosol_tr found in solution.
300_ctp_synthesis	+	reaction ID_14669_cytosol_tr found in solution.
300_gtp_synthesis	+	reaction ID_13710_cytosol_tr found in solution.
300_atp_synthesis	+	reaction ID_13648_cytosol_tr found in solution.
350_atp_degradation	+	reaction ID_15523_blood_circulation_tr found in solution.
350_gtp_degradation	+	reaction ID_15523_blood_circulation_tr found in solution.
350_utp_degradation	+	reaction ID_18509_cytosol found in solution.
350_ctp_degradation	+	reaction ID_18509_cytosol found in solution.
350_utp_degradation	+	reaction ID_18509_cytosol found in solution.
350_ctp_degradation	+	reaction ID_18509_cytosol found in solution.
900_ketone_bodies_acetoacetate	+	reaction ID_13809_blood_circulation_tr found in solution.
900_ketone_bodies_acetone	+	reaction ID_13810_blood_circulation_tr found in solution.
900_ketone_bodies_hydroxybutyrate	+	reaction ID_13832_blood_circulation_tr found in solution.
000_test_protein	+	reaction ID_22334_cytosol found in solution.
000_test_protein_1	+	reaction ID_22334_cytosol found in solution.
000_test_protein_2	+	reaction ID_22334_cytosol found in solution.
000_test_protein_3	+	reaction ID_22334_cytosol found in solution.

$$\begin{aligned}
\frac{dS_1}{dt} &= -v_2 - v_{10} - v_{11} - v_{12} - v_{13} - v_{15} + v_{20} + v_{23} \\
\frac{dS_2}{dt} &= +v_2 + v_{10} + v_{11} + 2v_{12} + v_{13} + v_{15} - v_{20} - v_{23} \\
\frac{dS_3}{dt} &= -v_{12} \\
\frac{dS_4}{dt} &= -v_6 + v_{11} \\
\frac{dS_5}{dt} &= +v_8 - v_{11} \\
\frac{dS_6}{dt} &= +v_{10} - v_{24} \\
\frac{dS_7}{dt} &= -v_{10} + v_{24} \\
\frac{dS_8}{dt} &= -v_{19} + v_{27} \\
\frac{dS_9}{dt} &= +v_{19} - v_{27} \\
\frac{dS_{10}}{dt} &= +v_3 + 2v_7 - v_9 + v_{14} + v_{16} - v_{19} \\
\frac{dS_{11}}{dt} &= +v_6 - v_7 \\
\frac{dS_{12}}{dt} &= -v_3 - v_7 - v_{14} - v_{16} + v_{22} \\
\frac{dS_{13}}{dt} &= +v_{24} \\
\frac{dS_{14}}{dt} &= +v_{19} - v_{27} \\
\frac{dS_{15}}{dt} &= -v_5 - v_6 + v_9 \\
\frac{dS_{16}}{dt} &= +v_6 - v_8 \\
\frac{dS_{17}}{dt} &= +v_8 - v_9 \\
\frac{dS_{18}}{dt} &= +v_1 - v_2 + v_3 \\
\frac{dS_{19}}{dt} &= +v_2 - v_3 - v_4 + v_5 \\
\frac{dS_{20}}{dt} &= +v_4 - v_{13} + v_{14} - v_{15} + v_{16} \\
\frac{dS_{21}}{dt} &= +v_{15} - v_{16} - v_{17} \\
\frac{dS_{22}}{dt} &= +v_{13} - v_{14} \\
\frac{dS_{23}}{dt} &= +v_{17} + v_{18} - v_{19} \\
\frac{dS_{24}}{dt} &= +v_{17} - v_{18} \\
\frac{dS_{25}}{dt} &= +v_{19} - v_{20} \\
\frac{dS_{26}}{dt} &= +v_{20} - v_{21} \\
\frac{dS_{27}}{dt} &= +v_{21} - v_{22} \\
\frac{dS_{28}}{dt} &= +v_{22} - v_{23} + v_{24} + v_{30} \\
\frac{dS_{29}}{dt} &= +v_{23} - v_{27} - v_{29} \\
\frac{dS_{30}}{dt} &= -v_{24} \\
\frac{dS_{31}}{dt} &= +v_{27} + v_{28} \\
\frac{dS_{32}}{dt} &= -v_1 \\
\frac{dS_{33}}{dt} &= -v_{28} \\
\frac{dS_{34}}{dt} &= +5v_{25} - 5v_{26} + 5v_{31} \\
\frac{dS_{35}}{dt} &= +5v_{26} \\
\frac{dS_{36}}{dt} &= -5v_{25} + 5v_{26} - 5v_{32} + 5v_{34} \\
\frac{dS_{37}}{dt} &= +5v_{25} - 5v_{30} \\
\frac{dS_{38}}{dt} &= +5v_{31} - 5v_{32} - 5v_{35} \\
\frac{dS_{39}}{dt} &= -5v_{26} + 5v_{29} - 5v_{31} \\
\frac{dS_{40}}{dt} &= +5v_{32} - 5v_{36} \\
\frac{dS_{41}}{dt} &= -5v_{26} - 5v_{33} \\
\frac{dS_{42}}{dt} &= +5v_{26} + 5v_{33} \\
\frac{dS_{43}}{dt} &= -5v_{25} + 5v_{33} \\
\frac{dS_{44}}{dt} &= +5v_{25} - 5v_{33} \\
\frac{dS_{45}}{dt} &= -5v_{31} + 5v_{32} \\
\frac{dS_{46}}{dt} &= +5v_{25} + 5v_{31} \\
\frac{dS_{47}}{dt} &= +5v_{25} - 5v_{31} \\
\frac{dS_{48}}{dt} &= +5v_{25} + 5v_{31} \\
\frac{dS_{49}}{dt} &= -5v_{32}
\end{aligned}$$

Tabelle A.2: Stöchiometrische Matrix des kinetischen Modells von Glykolyse, Gluconeogenese und Glykogenstoffwechsel. Die Flüsse im Mitochondrium sind mit dem Faktor $\alpha = 5$ (Volumen Zytosol/Volumen Mitochondrium) skaliert.

Literaturverzeichnis

- [1] Christoph Gille, Christian Bölling, Andreas Hoppe, Sascha Bulik, Sabrina Hoffmann, Katrin Hübner, Anja Karlstädt, Ramanan Ganeshan, Matthias König, Kristian Rother, Michael Weidlich, Jörn Behre, and Herrmann-Georg Holzhütter. Hepatonet1: A comprehensive stoichiometric network of human hepatocyte metabolism as basis for the computational analysis of physiological liver functions. 2009 (submitted).
- [2] Natalie C Duarte, Markus J Herrgård, and Bernhard Ø Palsson. Reconstruction and validation of *saccharomyces cerevisiae* ind750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model. *Genome Res.*, 14(7):1298–1309, Jul 2004.
- [3] Matthias Heinemann, Anne Kümmel, Reto Ruinatscha, and Sven Panke. In silico genome-scale reconstruction and validation of the *staphylococcus aureus* metabolic network. *Biotechnol Bioeng.*, 92(7):850–864, Dec 2005.
- [4] Adam M Feist, Christopher S Henry, Jennifer L Reed, Markus Krummenacker, Andrew R Joyce, Peter D Karp, Linda J Broadbelt, Vassily Hatzimanikatis, and Bernhard Ø Palsson. A genome-scale metabolic reconstruction for *escherichia coli* k-12 mg1655 that accounts for 1260 orfs and thermodynamic information. *Mol Syst Biol.*, 3:121, 2007.
- [5] Christof Francke, Roland J Siezen, and Bas Teusink. Reconstructing the metabolic network of a bacterium from its genome. *Trends Microbiol.*, 13(11):550–558, Nov 2005.
- [6] Réka Albert. Scale-free networks in cell biology. *J Cell Sci.*, 118(Pt 21):4947–4957, Nov 2005.
- [7] Raya Khanin and Ernst Wit. How scale-free are biological networks. *J Comput Biol.*, 13(3):810–818, Apr 2006.
- [8] Jörg Stelling, Steffen Klamt, Katja Bettenbrock, Stefan Schuster, and Ernst Dieter Gilles. Metabolic network structure determines key aspects of functionality and regulation. *Nature.*, 420(6912):190–193, Nov 2002.
- [9] Vincent Lacroix, Ludovic Cottret, Patricia Thébault, and Marie-France Sagot. An introduction to metabolic networks and their structural analysis. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform.*, 5(4):594–617, 2008.
- [10] Erwin Kuntz and Hans-Dieter Kuntz. *Hepatology - Principles and Practice*. Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- [11] M. Kanehisa and S. Goto. Kegg: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.*, 28(1):27–30, Jan 2000.
- [12] Lisa Matthews, Gopal Gopinath, Marc Gillespie, Michael Caudy, David Croft, Bernard de Bono, Phani Garapati, Jill Hemish, Henning Hermjakob, Bijay Jassal, Alex Kanapin, Suzanna Lewis, Shahana Mahajan, Bruce May, Esther Schmidt, Imre Vastrik, Guanming Wu, Ewan Birney, Lincoln Stein, and Peter D'Eustachio. Reactome knowledgebase of human biological pathways and processes. *Nucleic Acids Res.*, 37(Database issue):D619–D622, Jan 2009.
- [13] Ron Caspi, Tomer Altman, Joseph M Dale, Kate Dreher, Carol A Fulcher, Fred Gilham, Pallavi Kaipa, Athikkattuvalasu S Karthikeyan, Anamika Kothari, Markus Krummenacker, Mario Latendresse, Lukas A Mueller, Suzanne Paley, Liviu Popescu, Anuradha Pujar, Alexander G Shearer, Peifen Zhang, and Peter D Karp. The metacyc database of metabolic pathways and enzymes and the biocyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res.*, Oct 2009.
- [14] Antje Chang, Maurice Scheer, Andreas Grote, Ida Schomburg, and Dietmar Schomburg. Brenda, amenda and frenda the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Res.*, 37(Database issue):D588–D592, Jan 2009.
- [15] Christiane Hertz-Fowler, Chris S Peacock, Valerie Wood, Martin Aslett, Arnaud Kerhornou, Paul Mooney, Adrian Tivey, Matthew Berriman, Neil Hall, Kim Rutherford, Julian Parkhill, Alasdair C Ivens, Marie-Adele Rajandream, and Bart Barrell. Genedb: a resource for prokaryotic and eukaryotic organisms. *Nucleic Acids Res.*, 32(Database issue):D339–D343, Jan 2004.
- [16] UniProt Consortium. The universal protein resource (uniprot) 2009. *Nucleic Acids Res.*, 37(Database issue):D169–D174, Jan 2009.
- [17] Jong Min Lee, Erwin P Gianchandani, and Jason A Papin. Flux balance analysis in the era of metabolomics. *Brief Bioinform.*, 7(2):140–150, Jun 2006.
- [18] Radhakrishnan Mahadevan, Jeremy S Edwards, and Francis J Doyle. Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in *escherichia coli*. *Biophys J.*, 83(3):1331–1340, Sep 2002.

- [19] Hermann-Georg Holzhütter. The principle of flux minimization and its application to estimate stationary fluxes in metabolic networks. *Eur J Biochem*, 271(14):2905–2922, Jul 2004.
- [20] Markus W Covert, Iman Famili, and Bernhard O Palsson. Identifying constraints that govern cell behavior: a key to converting conceptual to computational models in biology? *Biotechnol Bioeng*, 84(7):763–772, Dec 2003.
- [21] Nathan D Price, Jennifer L Reed, and Bernhard Ø Palsson. Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints. *Nat Rev Microbiol*, 2(11):886–897, Nov 2004.
- [22] Andreas Hoppe, Sabrina Hoffmann, and Hermann-Georg Holzhütter. Including metabolite concentrations into flux balance analysis: thermodynamic realizability as a constraint on flux distributions in metabolic networks. *BMC Syst Biol*, 1:23, 2007.
- [23] Matthew A Oberhardt, Arvind K Chavali, and Jason A Papin. Flux balance analysis: interrogating genome-scale metabolic networks. *Methods Mol Biol*, 500:61–80, 2009.
- [24] Kenneth J Kauffman, Purusharth Prakash, and Jeremy S Edwards. Advances in flux balance analysis. *Curr Opin Biotechnol*, 14(5):491–496, Oct 2003.
- [25] C. H. Schilling, J. S. Edwards, D. Letscher, and B. Ø. Palsson. Combining pathway analysis with flux balance analysis for the comprehensive study of metabolic systems. *Biotechnol Bioeng*, 71(4):286–306, 2000.
- [26] Jason A Papin, Nathan D Price, Jeremy S Edwards, and Bernhard Ø Palsson B. The genome-scale metabolic extreme pathway structure in haemophilus influenzae shows significant network redundancy. *J Theor Biol*, 215(1):67–82, Mar 2002.
- [27] Stephen J Van Dien and Mary E Lidstrom. Stoichiometric model for evaluating the metabolic capabilities of the facultative methylotroph methylobacterium extorquens am1, with application to reconstruction of c(3) and c(4) metabolism. *Biotechnol Bioeng*, 78(3):296–312, May 2002.
- [28] R. Ramakrishna, J. S. Edwards, A. McCulloch, and B. O. Palsson. Flux-balance analysis of mitochondrial energy metabolism: consequences of systemic stoichiometric constraints. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280(3):R695–R704, Mar 2001.
- [29] A. Varma, B. W. Boesch, and B. O. Palsson. Biochemical production capabilities of escherichia coli. *Biotechnol Bioeng*, 42(1):59–73, Jun 1993.
- [30] Rafael U Ibarra, Jeremy S Edwards, and Bernhard O Palsson. Escherichia coli k-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth. *Nature*, 420(6912):186–189, Nov 2002.
- [31] Anthony P Burgard and Costas D Maranas. Optimization-based framework for inferring and testing hypothesized metabolic objective functions. *Biotechnol Bioeng*, 82(6):670–677, Jun 2003.
- [32] J. S. Edwards and B. O. Palsson. The escherichia coli mg1655 in silico metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(10):5528–5533, May 2000.
- [33] Daniel Segrè, Dennis Vitkup, and George M Church. Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(23):15112–15117, Nov 2002.
- [34] Christopher S Henry, Linda J Broadbelt, and Vassily Hatzimanikatis. Thermodynamics-based metabolic flux analysis. *Biophys J*, 92(5):1792–1805, Mar 2007.
- [35] Anne Kümmel, Sven Panke, and Matthias Heinemann. Systematic assignment of thermodynamic constraints in metabolic network models. *BMC Bioinformatics*, 7:512, 2006.
- [36] Matthew D Jankowski, Christopher S Henry, Linda J Broadbelt, and Vassily Hatzimanikatis. Group contribution method for thermodynamic analysis of complex metabolic networks. *Biophys J*, 95(3):1487–1499, Aug 2008.
- [37] M. L. Mavrovouniotis. Group contributions for estimating standard gibbs energies of formation of biochemical compounds in aqueous solution. *Biotechnol Bioeng*, 36(10):1070–1082, Dec 1990.
- [38] M. L. Mavrovouniotis. Estimation of standard gibbs energy changes of biotransformations. *J Biol Chem*, 266(22):14440–14445, Aug 1991.
- [39]
- [40] Sarawut Jitrapakdee, Martin St Maurice, Ivan Rayment, W. Wallace Cleland, John C Wallace, and Paul V Attwood. Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J*, 413(3):369–387, Aug 2008.
- [41] Ann Saada Reisch and Orly Elpeleg. Biochemical assays for mitochondrial activity: assays of tca cycle enzymes and pdhc. *Methods Cell Biol*, 80:199–222, 2007.
- [42] David L. Nelson and Michael M. Cox. *Lehninger - Principles of biochemistry*. W.H. Freeman and company, 2008.
- [43] Sophie Curbo, Clotilde Lagier-Tourenne, Rosalba Carrozzo, Lluís Palenzuela, Simona Lucioli, Michio Hirano, Filippo Santorelli, Joaquín Arenas, Anna Karlsson, and Magnus Johansson. Human mitochondrial pyrophosphatase: cdna cloning and analysis of the gene in patients with mtDNA depletion syndromes. *Genomics*, 87(3):410–416, Mar 2006.

- [44] M. M C Wamelink, E. A. Struys, and C. Jakobs. The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. *J Inherit Metab Dis*, 31(6):703–717, Dec 2008.
- [45] Nadine Pollak, Christian Dölle, and Mathias Ziegler. The power to reduce: pyridine nucleotides—small molecules with a multitude of functions. *Biochem J*, 402(2):205–218, Mar 2007.
- [46] Frank Q. Nuttall, Angela Ngo, and Mary C Gannon. Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant? *Diabetes Metab Res Rev*, 24(6):438–458, Sep 2008.
- [47] J. E. Gerich. Control of glycaemia. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 7(3):551–586, Jul 1993.
- [48] E. P. Corssmit, J. A. Romijn, and H. P. Sauerwein. Review article: Regulation of glucose production with special attention to nonclassical regulatory mechanisms: a review. *Metabolism*, 50(7):742–755, Jul 2001.
- [49] B. K. Siesjö. Hypoglycemia, brain metabolism, and brain damage. *Diabetes Metab Rev*, 4(2):113–144, Mar 1988.
- [50] Shinji Kawahito, Hiroshi Kitahata, and Shuzo Oshita. Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World J Gastroenterol*, 15(33):4137–4142, Sep 2009.
- [51] A. Giaccari, G. Sorice, and G. Muscogiuri. Glucose toxicity: the leading actor in the pathogenesis and clinical history of type 2 diabetes - mechanisms and potentials for treatment. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 19(5):365–377, Jun 2009.
- [52] T. P. Degenhardt, S. R. Thorpe, and J. W. Baynes. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 44(7):1139–1145, Nov 1998.
- [53] J. S. Skyler. Diabetic complications. the importance of glucose control. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 25(2):243–254, Jun 1996.
- [54] The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. the diabetes control and complications trial research group. *N Engl J Med*, 329(14):977–986, Sep 1993.
- [55] Peter J Klover and Robert A Mooney. Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(5):753–758, May 2004.
- [56] S. J. Pilkis and D. K. Granner. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol*, 54:885–909, 1992.
- [57] D. Raddatz and G. Ramadori. Carbohydrate metabolism and the liver: actual aspects from physiology and disease. *Z Gastroenterol*, 45(1):51–62, Jan 2007.
- [58] D. L. Rothman, I. Magnusson, L. D. Katz, R. G. Shulman, and G. I. Shulman. Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with ¹³C nmr. *Science*, 254(5031):573–576, Oct 1991.
- [59] Stephen F Previs, Daniel Z Brunengraber, and Henri Brunengraber. Is there glucose production outside of the liver and kidney? *Annu Rev Nutr*, 29:43–57, 2009.
- [60] O. E. Owen, P. Felig, A. P. Morgan, J. Wahren, and G. F. Cahill. Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest*, 48(3):574–583, Mar 1969.
- [61] T. Jenssen, N. Nurjhan, A. Consoli, and J. E. Gerich. Failure of substrate-induced gluconeogenesis to increase overall glucose appearance in normal humans. demonstration of hepatic autoregulation without a change in plasma glucose concentration. *J Clin Invest*, 86(2):489–497, Aug 1990.
- [62] A. D. Cherrington, D. Edgerton, and D. K. Sindelar. The direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production in vivo. *Diabetologia*, 41(9):987–996, Sep 1998.
- [63] Guoqiang Jiang and Bei B Zhang. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284(4):E671–E678, Apr 2003.
- [64] E. Ferrannini, A. Q. Galvan, A. Gastaldelli, S. Camasta, A. M. Sironi, E. Toschi, S. Baldi, S. Frascerra, F. Monzani, A. Antonelli, M. Nannipieri, A. Mari, G. Seghieri, and A. Natali. Insulin: new roles for an ancient hormone. *Eur J Clin Invest*, 29(10):842–852, Oct 1999.
- [65] E. Ferrannini and A. Pilo. Pattern of insulin delivery after intravenous glucose injection in man and its relation to plasma glucose disappearance. *J Clin Invest*, 64(1):243–254, Jul 1979.
- [66] M. M. Byrne, J. Sturis, and K. S. Polonsky. Insulin secretion and clearance during low-dose graded glucose infusion. *Am J Physiol*, 268(1 Pt 1):E21–E27, Jan 1995.
- [67] A. Giacca, S. J. Fisher, Z. Q. Shi, R. Gupta, H. L. Lickley, and M. Vranic. Importance of peripheral insulin levels for insulin-induced suppression of glucose production in pancreatized dogs. *J Clin Invest*, 90(5):1769–1777, Nov 1992.
- [68] G. F. Lewis, B. Zinman, Y. Groenewoud, M. Vranic, and A. Giacca. Hepatic glucose production is regulated both by direct hepatic and extrahepatic effects of insulin in humans. *Diabetes*, 45(4):454–462, Apr 1996.

- [69] David T Duong, Mary E Waltner-Law, Rosalie Sears, Linda Sealy, and Daryl K Granner. Insulin inhibits hepatocellular glucose production by utilizing liver-enriched transcriptional inhibitory protein to disrupt the association of creb-binding protein and rna polymerase ii with the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *J Biol Chem*, 277(35):32234–32242, Aug 2002.
- [70] R. M. O'Brien and D. K. Granner. Regulation of gene expression by insulin. *Physiol Rev*, 76(4):1109–1161, Oct 1996.
- [71] D. K. Sindelar, C. A. Chu, P. Venson, E. P. Donahue, D. W. Neal, and A. D. Cherrington. Basal hepatic glucose production is regulated by the portal vein insulin concentration. *Diabetes*, 47(4):523–529, Apr 1998.
- [72] G. Boden, X. Chen, J. Ruiz, J. V. White, and L. Rossetti. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest*, 93(6):2438–2446, Jun 1994.
- [73] S. Bevilacqua, R. Bonadonna, G. Buzzigoli, C. Boni, D. Ciociaro, F. Maccari, M. A. Giorico, and E. Ferrannini. Acute elevation of free fatty acid levels leads to hepatic insulin resistance in obese subjects. *Metabolism*, 36(5):502–506, May 1987.
- [74] G. F. Lewis, M. Vranic, and A. Giacca. Role of free fatty acids and glucagon in the peripheral effect of insulin on glucose production in humans. *Am J Physiol*, 275(1 Pt 1):E177–E186, Jul 1998.
- [75] Silvana Obici, Bei B Zhang, George Karkanias, and Luciano Rossetti. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med*, 8(12):1376–1382, Dec 2002.
- [76] S. R. Myers, M. P. Diamond, B. A. Adkins-Marshall, P. E. Williams, R. Stinsen, and A. D. Cherrington. Effects of small changes in glucagon on glucose production during a euglycemic, hyperinsulinemic clamp. *Metabolism*, 40(1):66–71, Jan 1991.
- [77] A. A. Young, G. J. Cooper, P. Carlo, T. J. Rink, and M. W. Wang. Response to intravenous injections of amylin and glucagon in fasted, fed, and hypoglycemic rats. *Am J Physiol*, 264(6 Pt 1):E943–E950, Jun 1993.
- [78] L. Freychet, S. W. Rizkalla, N. Desplanque, A. Basdevant, P. Zirinis, G. Tchobroutsky, and G. Slama. Effect of intranasal glucagon on blood glucose levels in healthy subjects and hypoglycaemic patients with insulin-dependent diabetes. *Lancet*, 1(8599):1364–1366, Jun 1988.
- [79] A. Hvidberg, R. Djurup, and J. Hilsted. Glucose recovery after intranasal glucagon during hypoglycaemia in man. *Eur J Clin Pharmacol*, 46(1):15–17, 1994.
- [80] P. E. Lins, A. Wajngot, U. Adamson, M. Vranic, and S. Efendić. Minimal increases in glucagon levels enhance glucose production in man with partial hypoinsulinemia. *Diabetes*, 32(7):633–636, Jul 1983.
- [81] N. Ercan, M. C. Gannon, and F. Q. Nuttall. Allosteric regulation of liver phosphorylase a: revisited under approximated physiological conditions. *Arch Biochem Biophys*, 328(2):255–264, Apr 1996.
- [82] Nacide Ercan-Fang, Mary C Gannon, Virginia L Rath, Judith L Treadway, Miriam R Taylor, and Frank Q Nuttall. Integrated effects of multiple modulators on human liver glycogen phosphorylase a. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283(1):E29–E37, Jul 2002.
- [83] Loranne Agius. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J*, 414(1):1–18, Aug 2008.
- [84] H. Ishibashi and G. L. Cottam. Glucagon-stimulated phosphorylation of pyruvate kinase in hepatocytes. *J Biol Chem*, 253(24):8767–8771, Dec 1978.
- [85] W. Flory, B. D. Peczon, R. E. Koeppe, and H. O. Spivey. Kinetic properties of rat liver pyruvate kinase at cellular concentrations of enzyme, substrates and modifiers. *Biochem J*, 141(1):127–131, Jul 1974.
- [86] Mark H Rider, Luc Bertrand, Didier Vertommen, Paul A Michels, Guy G Rousseau, and Louis Hue. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J*, 381(Pt 3):561–579, Aug 2004.
- [87] E. Van Schaftingen, M. F. Jett, L. Hue, and H. G. Hers. Control of liver 6-phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate and other effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(6):3483–3486, Jun 1981.
- [88] A. Adams, C. Redden, and S. Menahem. Characterization of human fructose-1,6-bisphosphatase in control and deficient tissues. *J Inher Metab Dis*, 13(6):829–848, 1990.
- [89] Yong-Hwan Lee, Yang Li, Kosaku Uyeda, and Charles A Hasemann. Tissue-specific structure/function differentiation of the liver isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J Biol Chem*, 278(1):523–530, Jan 2003.
- [90] R. Sakakibara, S. Kitajima, and K. Uyeda. Differences in kinetic properties of phospho and dephospho forms of fructose-6-phosphate, 2-kinase and fructose 2,6-bisphosphatase. *J Biol Chem*, 259(1):41–46, Jan 1984.
- [91] S. Jitrapakdee, M. E. Walker, and J. C. Wallace. Functional expression, purification, and characterization of recombinant human pyruvate carboxylase. *Biochem Biophys Res Commun*, 266(2):512–517, Dec 1999.
- [92] Y. V. Kiselevsky, S. A. Ostrovtsova, and S. A. Strumilo. Kinetic characterization of the pyruvate and oxoglutarate dehydrogenase complexes from human heart. *Acta Biochim Pol*, 37(1):135–139, 1990.
- [93] W. Stalmans and G. Gevers. The catalytic activity of phosphorylase b in the liver, with a note on the assay in the glycogenolytic direction. *Biochem J*, 200(2):327–336, Nov 1981.

- [94] B. Lederer and W. Stalmans. Human liver glycogen phosphorylase. kinetic properties and assay in biopsy specimens. *Biochem J*, 159(3):689–695, Dec 1976.
- [95] G. Buzzelli, E. Chiarantini, G. Cotrozzi, P. Relli, L. Matassi, R. G. Romanelli, and P. Gentilini. Estimate of prevalence of glucose intolerance in chronic liver disease. degree of agreement among some diagnostic criteria. *Liver*, 8(6):354–359, Dec 1988.
- [96] W. Creutzfeldt, H. Frerichs, and K. Sickinger. Liver diseases and diabetes mellitus. *Prog Liver Dis*, 3:371–407, 1970.
- [97] Andreas Holstein, S. Hinze, E. Thiessen, A. Plaschke, and E-H. Egberts. Clinical implications of hepatogenous diabetes in liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*, 17(6):677–681, Jun 2002.
- [98] G. Bianchi, G. Marchesini, M. Zoli, E. Bugianesi, A. Fabbri, and E. Pisi. Prognostic significance of diabetes in patients with cirrhosis. *Hepatology*, 20(1 Pt 1):119–125, Jul 1994.
- [99] A. Consoli, N. Nurjhan, F. Capanni, and J. Gerich. Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in niddm. *Diabetes*, 38(5):550–557, May 1989.
- [100] I. Magnusson, D. L. Rothman, L. D. Katz, R. G. Shulman, and G. I. Shulman. Increased rate of gluconeogenesis in type ii diabetes mellitus. a ^{13}C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest*, 90(4):1323–1327, Oct 1992.
- [101] A. Consoli, N. Nurjhan, J. J. Reilly, D. M. Bier, and J. E. Gerich. Mechanism of increased gluconeogenesis in noninsulin-dependent diabetes mellitus. role of alterations in systemic, hepatic, and muscle lactate and alanine metabolism. *J Clin Invest*, 86(6):2038–2045, Dec 1990.
- [102] Ida Schomburg, Antje Chang, and Dietmar Schomburg. Brenda, enzyme data and metabolic information. *Nucleic Acids Res*, 30(1):47–49, Jan 2002.
- [103] U. Wittig, M. Golebiewski, R. Kania, O. Krebs, S. Mir, A. Weidemann, S. Anstein, J. Saric, and I. Rojas. Sabio-rk: Integration and curation of reaction kinetics data. *Lecture Notes in Computer Science*, 2006.
- [104] R. L. Veech, D. Veloso, and M. A. Mehlman. Thiamin deficiency: liver metabolite levels and redox and phosphorylation states in thiamin-deficient rats. *J Nutr*, 103(2):267–272, Feb 1973.
- [105] A. K. Rawat. Effects of ethanol infusion on the redox state and metabolite levels in rat liver in vivo. *Eur J Biochem*, 6(4):585–592, Dec 1968.
- [106] T. Bartel and H. G. Holzhütter. Mathematical modelling of the purine metabolism of the rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 1035(3):331–339, Sep 1990.
- [107] Elie Chalhoub, Richard W Hanson, and Joanne M Belovich. A computer model of gluconeogenesis and lipid metabolism in the perfused liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(6):E1676–E1686, Dec 2007.
- [108] E. Chalhoub, L. Xie, V. Balasubramanian, J. Kim, and J. Belovich. A distributed model of carbohydrate transport and metabolism in the liver during rest and high-intensity exercise. *Ann Biomed Eng*, 35(3):474–491, Mar 2007.
- [109] Armelle Leturque, Edith Brot-Laroche, and Maude Le Gall. Glut2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296(5):E985–E992, May 2009.
- [110] G. W. Gould, H. M. Thomas, T. J. Jess, and G. I. Bell. Expression of human glucose transporters in xenopus oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry*, 30(21):5139–5145, May 1991.
- [111] T. P. Ciaraldi, R. Horuk, and S. Matthaei. Biochemical and functional characterization of the rat liver glucose-transport system. comparisons with the adipocyte glucose-transport system. *Biochem J*, 240(1):115–123, Nov 1986.
- [112] B. Thorens. Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *Am J Physiol*, 270(4 Pt 1):G541–G553, Apr 1996.
- [113] A. C. Storer and A. Cornish-Bowden. Kinetics of rat liver glucokinase. co-operative interactions with glucose at physiologically significant concentrations. *Biochem J*, 159(1):7–14, Oct 1976.
- [114] H. Morita, Y. Yano, K. D. Niswender, J. M. May, R. R. Whitesell, L. Wu, R. L. Printz, D. K. Granner, M. A. Magnuson, and A. C. Powers. Coexpression of glucose transporters and glucokinase in xenopus oocytes indicates that both glucose transport and phosphorylation determine glucose utilization. *J Clin Invest*, 94(4):1373–1382, Oct 1994.
- [115] Katy J Brocklehurst, Rick A Davies, and Loranne Agius. Differences in regulatory properties between human and rat glucokinase regulatory protein. *Biochem J*, 378(Pt 2):693–697, Mar 2004.
- [116] L. Agius and M. Peak. Intracellular binding of glucokinase in hepatocytes and translocation by glucose, fructose and insulin. *Biochem J*, 296 (Pt 3):785–796, Dec 1993.
- [117] E. Van Schaftingen. A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate. *Eur J Biochem*, 179(1):179–184, Jan 1989.
- [118] P. R. Reczek and C. A. Villee. A purification of microsomal glucose-6-phosphatase from human tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 107(3):1158–1165, Aug 1982.

- [119] W. J. Arion, B. K. Wallin, P. W. Carlson, and A. J. Lange. The specificity of glucose 6-phosphatase of intact liver microsomes. *J Biol Chem*, 247(8):2558–2565, Apr 1972.
- [120] R. C. Nordlie. Some properties and possible physiological functions of phosphotransferase activities of microsomal glucose-6-phosphatase. *Ann N Y Acad Sci*, 166(2):699–718, Oct 1969.
- [121] S. E. KAHANA, O. H. LOWRY, D. W. SCHULZ, J. V. PASSONNEAU, and E. J. CRAWFORD. The kinetics of phosphoglucoisomerase. *J Biol Chem*, 235:2178–2184, Aug 1960.
- [122] R. Schuster and H. G. Holzhütter. Use of mathematical models for predicting the metabolic effect of large-scale enzyme activity alterations. application to enzyme deficiencies of red blood cells. *Eur J Biochem*, 229(2):403–418, Apr 1995.
- [123] Y. Kashiwaya, K. Sato, N. Tsuchiya, S. Thomas, D. A. Fell, R. L. Veech, and J. V. Passonneau. Control of glucose utilization in working perfused rat heart. *J Biol Chem*, 269(41):25502–25514, Oct 1994.
- [124] R. G. Duggleby, Y. C. Chao, J. G. Huang, H. L. Peng, and H. Y. Chang. Sequence differences between human muscle and liver cdnas for udpglucose pyrophosphorylase and kinetic properties of the recombinant enzymes expressed in escherichia coli. *Eur J Biochem*, 235(1-2):173–179, Jan 1996.
- [125] R. L. Turnquist, T. A. Gillett, and R. G. Hansen. Uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase. crystallization and properties of the enzyme from rabbit liver and species comparisons. *J Biol Chem*, 249(23):7695–7700, Dec 1974.
- [126] H. Y. Chang, H. L. Peng, Y. C. Chao, and R. G. Duggleby. The importance of conserved residues in human liver udpglucose pyrophosphorylase. *Eur J Biochem*, 236(2):723–728, Mar 1996.
- [127] T. Tamura, H. Shiraki, and H. Nakagawa. Purification and characterization of adenylylate kinase isozymes from rat muscle and liver. *Biochim Biophys Acta*, 612(1):56–66, Mar 1980.
- [128] W. H. Reichert, C. J. Lauter, and E. G. Trams. Inorganic pyrophosphatase in cultured cells. *Biochim Biophys Acta*, 370(2):556–563, Dec 1974.
- [129] S. A. Westphal and F. Q. Nuttall. Comparative characterization of human and rat liver glycogen synthase. *Arch Biochem Biophys*, 292(2):479–486, Feb 1992.
- [130] F. Bosch, C. J. Ciudad, and J. J. Guinovart. Different effects of glucagon and epinephrine on the kinetic properties of liver glycogen synthase. *FEBS Lett*, 151(1):76–78, Jan 1983.
- [131] Juan C Ferrer, Cristián Favre, Roger R Gomis, Josep M Fernández-Novell, Mar García-Rocha, Núria de la Iglesia, Emili Cid, and Joan Guinovart. Control of glycogen deposition. *FEBS Lett*, 546(1):127–132, Jul 2003.
- [132] A. W. Tan and F. Q. Nuttall. Characteristics of the dephosphorylated form of phosphorylase purified from rat liver and measurement of its activity in crude liver preparations. *Biochim Biophys Acta*, 410(1):45–60, Nov 1975.
- [133] W. Stalmans and H. G. Hers. The stimulation of liver phosphorylase b by amp, fluoride and sulfate. a technical note on the specific determination of the a and b forms of liver glycogen phosphorylase. *Eur J Biochem*, 54(2):341–350, Jun 1975.
- [134] V. T. Maddaiah and N. B. Madsen. Kinetics of purified liver phosphorylase. *J Biol Chem*, 241(17):3873–3881, Sep 1966.
- [135] T. Fukuchi, N. Shimada, N. Hanai, N. Ishikawa, K. Watanabe, and N. Kimura. Recombinant rat nucleoside diphosphate kinase isoforms (alpha and beta): purification, properties and application to immunological detection of native isoforms in rat tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1205(1):113–122, Mar 1994.
- [136] N. Kimura and N. Shimada. Membrane-associated nucleoside diphosphate kinase from rat liver. purification, characterization, and comparison with cytosolic enzyme. *J Biol Chem*, 263(10):4647–4653, Apr 1988.
- [137] S. C. Lam and M. A. Packham. Isolation and kinetic studies of nucleoside diphosphokinase from human platelets and effects of camp phosphodiesterase inhibitors. *Biochem Pharmacol*, 35(24):4449–4455, Dec 1986.
- [138] J. M. Blair. Magnesium, potassium, and the adenylylate kinase equilibrium. magnesium as a feedback signal from the adenine nucleotide pool. *Eur J Biochem*, 13(2):384–390, Apr 1970.
- [139] K. K. Tsuboi and C. H. Chervenka. Adenylylate kinase of human erythrocyte. isolation and properties of the predominant inherited form. *J Biol Chem*, 250(1):132–140, Jan 1975.
- [140] J. Sakata, Y. Abe, and K. Uyeda. Molecular cloning of the dna and expression and characterization of rat testes fructose-6-phosphate,2-kinase:fructose-2,6-bisphosphatase. *J Biol Chem*, 266(24):15764–15770, Aug 1991.
- [141] C. S. Richards, M. Yokoyama, E. Furuya, and K. Uyeda. Reciprocal changes in fructose-6-phosphate,2-kinase and fructose-2,6-bisphosphatase activity in response to glucagon and epinephrine. *Biochem Biophys Res Commun*, 104(3):1073–1079, Feb 1982.
- [142] C. S. Richards, E. Furuya, and K. Uyeda. Regulation of fructose 2,6-p2 concentration in isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 100(4):1673–1679, Jun 1981.
- [143] P. Durante, X. Raleigh, M. E. Gomez, G. Campos, and E. Ryder. Isozyme analysis of human normal polymorphonuclear leukocyte phosphofructokinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 216(3):898–905, Nov 1995.

- [144] I. A. Brand and H. D. Söling. Rat liver phosphofructokinase. purification and characterization of its reaction mechanism. *J Biol Chem*, 249(24):7824–7831, Dec 1974.
- [145] G. A. Dunaway and H. L. Segal. Purification and physiological role of a peptide stabilizing factor of rat liver phosphofructokinase. *J Biol Chem*, 251(8):2323–2329, Apr 1976.
- [146] A. Dzugaj and M. Kochman. Purification of human liver fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochim Biophys Acta*, 614(2):407–412, Aug 1980.
- [147] S. A. Doyle and D. R. Tolan. Characterization of recombinant human aldolase b and purification by metal chelate chromatography. *Biochem Biophys Res Commun*, 206(3):902–908, Jan 1995.
- [148] Ali D Malay, Sheri L Procious, and Dean R Tolan. The temperature dependence of activity and structure for the most prevalent mutant aldolase b associated with hereditary fructose intolerance. *Arch Biochem Biophys*, 408(2):295–304, Dec 2002.
- [149] R. Bais, H. M. James, A. M. Rose, and R. A. Conyers. The purification and properties of human liver ketohexokinase. a role for ketohexokinase and fructose-bisphosphate aldolase in the metabolic production of oxalate from xylitol. *Biochem J*, 230(1):53–60, Aug 1985.
- [150] R. Snyder and E. W. Lee. Triosephosphate isomerase from human and horse liver. *Methods Enzymol*, 41:430–434, 1975.
- [151] P. M. Yuan, R. N. Dewan, M. Zaun, R. E. Thompson, and R. W. Gracy. Isolation and characterization of triosephosphate isomerase isozymes from human placenta. *Arch Biochem Biophys*, 198(1):42–52, Nov 1979.
- [152] T. J. Van Berkel, J. K. Kruijt, G. B. Van den Berg, and J. F. Koster. Difference in the effect of glucagon and starvation upon l-type pyruvate kinase from rat liver. *Eur J Biochem*, 92(2):553–561, Dec 1978.
- [153] A. M. REYNARD, L. F. HASS, D. D. JACOBSEN, and P. D. BOYER. The correlation of reaction kinetics and substrate binding with the mechanism of pyruvate kinase. *J Biol Chem*, 236:2277–2283, Aug 1961.
- [154] Jianqi Yang, Satish C Kalhan, and Richard W Hanson. What is the metabolic role of phosphoenolpyruvate carboxykinase? *J Biol Chem*, 284(40):27025–27029, Oct 2009.
- [155] Christopher L Case and Biswarup Mukhopadhyay. Kinetic characterization of recombinant human cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase with and without a his10-tag. *Biochim Biophys Acta*, 1770(11):1576–1584, Nov 2007.
- [156] M. C. Scrutton and M. D. White. Purification and properties of human liver pyruvate carboxylase. *Biochem Med*, 9(3):217–292, Mar 1974.
- [157] C. H. Ketchum, C. A. Robinson, L. M. Hall, and W. E. Grizzle. Lactate dehydrogenase isolated from human liver mitochondria: its purification and partial biochemical characterization. *Clin Biochem*, 21(4):231–237, Aug 1988.
- [158] Laura O Saad, Sandra R Mirandola, Evelise N Maciel, and Roger F Castilho. Lactate dehydrogenase activity is inhibited by methylmalonate in vitro. *Neurochem Res*, 31(4):541–548, Apr 2006.
- [159] S. M. Pettit, D. A. Nealon, and A. R. Henderson. Purification of lactate dehydrogenase isoenzyme-5 from human liver. *Clin Chem*, 27(1):88–93, Jan 1981.
- [160] M. Hamada, K. Koike, Y. Nakaula, T. Hiraoka, and M. Koike. A kinetic study of the alpha-keto acid dehydrogenase complexes from pig heart mitochondria. *J Biochem*, 77(5):1047–1056, May 1975.
- [161] Lioubov G Korotchkina, Sukhdeep Sidhu, and Mulchand S Patel. Characterization of testis-specific isoenzyme of human pyruvate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 281(14):9688–9696, Apr 2006.
- [162] M. J. Holness, P. A. MacLennan, T. N. Palmer, and M. C. Sugden. The disposition of carbohydrate between glycogenesis, lipogenesis and oxidation in liver during the starved-to-fed transition. *Biochem J*, 252(2):325–330, Jun 1988.
- [163] D. Shepherd and P. B. Garland. The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J*, 114(3):597–610, Sep 1969.
- [164] T. C. Smitherman, A. Mukherjee, J. B. Robinson, R. W. Butsch, E. G. Richards, and P. A. Srere. Human heart citrate synthase: purification, properties, kinetic and immunologic studies. *J Mol Cell Cardiol*, 11(2):149–160, Feb 1979.
- [165] Y. Matsuoka and P. A. Srere. Kinetic studies of citrate synthase from rat kidney and rat brain. *J Biol Chem*, 248(23):8022–8030, Dec 1973.
- [166] Jose A L Calbet and Dave A MacLean. Plasma glucagon and insulin responses depend on the rate of appearance of amino acids after ingestion of different protein solutions in humans. *J Nutr*, 132(8):2174–2182, Aug 2002.
- [167] G. M. Grodsky. A threshold distribution hypothesis for packet storage of insulin and its mathematical modeling. *J Clin Invest*, 51(8):2047–2059, Aug 1972.
- [168] J. C. Levy, A. Rudenski, M. Burnett, R. Knight, D. R. Matthews, and R. C. Turner. Simple empirical assessment of beta-cell function by a constant infusion of glucose test in normal and type 2 (non-insulin-dependent) diabetic subjects. *Diabetologia*, 34(7):488–499, Jul 1991.

- [169] Hai Yan, Wei Gu, Jie Yang, Vivian Bi, Yuqing Shen, Eunkyoung Lee, Katherine A Winters, Renée Komorowski, Cheng Zhang, Jennifer J Patel, Dorothy Caughey, Gary S Elliott, Yvonne Y Lau, Jin Wang, Yue-Sheng Li, Tom Boone, Richard A Lindberg, Sylvia Hu, and Murielle M Véniant. Fully human monoclonal antibodies antagonizing the glucagon receptor improve glucose homeostasis in mice and monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 329(1):102–111, Apr 2009.
- [170] Kyle W Sloop, M. Dodson Michael, and Julie S Moyers. Glucagon as a target for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opin Ther Targets*, 9(3):593–600, Jun 2005.
- [171] Stevan W Djuric, Nelson Gribalde, and Chun Wel Lin. Glucagon receptor antagonists for the treatment of type ii diabetes: current prospects. *Curr Opin Investig Drugs*, 3(11):1617–1623, Nov 2002.
- [172] Peter Madsen, János T Kodra, Carsten Behrens, Erica Nishimura, Claus B Jeppesen, Lone Pridal, Birgitte Andersen, Lotte B Knudsen, Carmen Valcarce-Aspøren, Mette Guldbrandt, Inge T Christensen, Anker S Jørgensen, Lars Ynddal, Christian L Brand, Morten Aa Bagger, and Jesper Lau. Human glucagon receptor antagonists with thiazole cores. a novel series with superior pharmacokinetic properties. *J Med Chem*, 52(9):2989–3000, May 2009.
- [173] Safina Ali and Daniel J Drucker. Benefits and limitations of reducing glucagon action for the treatment of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296(3):E415–E421, Mar 2009.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 11. Dezember 2009