

**Modellgestützte Analyse der Dynamik des
Phosphofruktokinase-Systems in
*Saccharomyces cerevisiae***

Von der Fakultät Verfahrenstechnik
der Universität Stuttgart zum Erlangen der Würde
eines Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von Sam Vaseghi
aus Teheran/Iran

Hauptberichter: Prof. Dr.-Ing. M. Reuss
Mitberichter: Prof. dr. ir. J. J. Heijnen, TU Delft, Niederlande
Tag der Einreichung: 30.6.1999
Tag der mündlichen Prüfung: 18.1.2000

Institut für Bioverfahrenstechnik
der Universität Stuttgart
2000

II

für Manfred

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung 1	
2	Stand des Wissens	5
2.1	Das PFK1 System	5
2.1.1	Aspekte der Regulation	6
2.1.2	Reaktionskinetische Ansätze der PFK1	9
2.2	Das PFK2-System	25
2.2.1	Das glucoseinduzierte cAMP Signal	25
2.2.2	Der Signaltransduktionsweg cAMP/PKA/PFK2	29
3	Material und Methoden	32
3.1	Mikroorganismus	32
3.2	Nährmedien	32
3.3	Chemikalien	33
3.4	Versuchsanlage	34
3.5	Züchtungsbedingungen und Prozeßführung	35
3.6	Pulsartige Zugabe der Glucose	36
3.6.1	Probenahme	37
3.6.2	Desaktivierung und Extraktion	37
3.7	Methoden zur Untersuchung der Desaktivierung	40
3.7.1	Methode zur Untersuchung der Dynamik des Kühlvorgangs	40
3.7.2	Methode zur Bestimmung der Aufschlußkinetik	41
3.8	Analytische Methoden	43
3.8.1	Extrazelluläre Metabolite	43
3.8.2	Intrazelluläre Metabolite (Gesamtzelle)	44
3.8.3	Intrazelluläre Metabolite (Cytoplasmatisch)	44
3.9	Bestimmung der Biomassekonzentration	45
3.10	Bestimmung der intrazellulären Proteinkonzentration	46
3.10.1	Herstellung des Zellextrakts	46
3.10.2	Messung der intrazellulären Proteinkonzentration	46
3.11	Bestimmung der Enzymaktivitäten unter <i>in-vitro</i> Bedingungen	46
3.11.1	Aktivität der Alkohol-dehydrogenase (ADH)	46
3.11.2	Aktivität der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G6PDH)	46
3.11.3	Bestimmung der Enzymaktivitäten bei 30, 0, -5 und -10°C	46
3.12	Bestimmung der Enzymaktivität unter <i>in-situ</i> Bedingungen	47
3.12.1	Permeabilisierung der Zellmembran	47
3.12.2	Assay der PFK1 unter <i>in-situ</i> Bedingungen	49
3.12.3	Assay der PGI unter <i>in-situ</i> Bedingungen	51
3.12.4	Assay der FBPase1 unter <i>in-situ</i> Bedingungen	52
3.12.5	Assay der F-2,6-BP-Degradation unter <i>in-situ</i> Bedingungen	53
3.13	Bestimmung der PFK2 Aktivität unter <i>in-vitro</i> Bedingungen	53
3.13.1	Quenching	54
3.13.2	Zellaufschluß und Extraktion	54
3.13.3	Assay der PFK2 unter <i>in-vitro</i> Bedingungen	55
4	Ergebnisse und Diskussion	56

4.1	Desaktivierung und Extraktion	56
4.1.1	Untersuchung der Dynamik der thermischen Desaktivierung	56
4.1.2	Untersuchung der Aufschlußkinetik	60
4.2	Kryofiltration	62
4.3	Zusammenfassung der Desaktivierungs- und Extraktionsmethoden	64
4.4	Das PFK1 Systems	65
4.4.1	Das V-Modell	65
4.4.2	Parameteridentifikation des V-Modells für <i>in-vitro</i> und <i>in-situ</i> Bedingungen	67
4.4.3	Vergleich der kinetischen Parameter für <i>in-vitro</i> und <i>in-situ</i> Bedingungen	80
4.4.4	Das V _{situ} -Modell	88
4.4.5	Kinetische Charakterisierung der PFK1 unter <i>in-vivo</i> Bedingungen	92
4.5	Das PFK2 System	121
4.5.1	Reaktionskinetischer Ansatz für die PFK2	121
4.5.2	Dynamik der PFK2 Aktivität	124
4.5.3	Die Degradation des F-2,6-BP	132
4.6	Regulation des PFK1/PFK2 Systems: Zusammenfassung der Beobachtungen	134
4.6.1	<i>In-vivo</i> Regulation der PFK1	134
4.6.2	<i>In-vivo</i> Regulation der PFK2	134
4.6.3	<i>In-vivo</i> Regulation des PFK1/PFK2 Systems	135
Anhang 1	138	
Anhang 2	139	
Anhang 3	140	
Literatur	143	

Symbolverzeichnis

Mathematische Symbole:

c	-	Nicht-exklusiver Bindungskoeffizient
C_i	mM	Cytoplasmatische Konzentration des Metabolits i
C_i^{GG}	mM	Konzentration des Metabolits i im Zustand des thermodynamischen Gleichgewichts
C_i^0	mM	Anfangskonzentration des Metabolits i
\tilde{C}_i	mM	Cytoplasmatische Konzentration des Metabolits i im stationären Zustand des Fließgleichgewichts
\hat{C}_i	mM	Gemessene Konzentration des Metabolits i
$C_{Effektor}$	mM	Konzentration eines Effektors
C_X	mM	Biomassekonzentration
$C_{X,Perm}$	mM	Biomassekonzentration des Permeabilisats
$C_{X,Probe}$	mM	Biomassekonzentration des Probe
d	cm	Schichtdicke der Küvette
E	-	Extinktion
E_i	sec ⁻¹	Zeitlicher Mittelwert des Elastizitäts-Koeffizienten bezüglich des Metaboliten i
f_{Verd}	-	Verdünnungsfaktor
$F_{n,i}^B$	-	Statistischer Faktor zur Berücksichtigung der bereits belegten Bindungsstellen am Enzym bei der Teilreaktion i
F_i^S	-	Statistischer Faktor zur Berücksichtigung der symmetrischen Anordnung der Protomere des Enzyms bei der Teilreaktion i
$F_{n,i}$	-	Statistischer Faktor zur Berücksichtigung verschiedenen Bindungsmöglichkeiten am Enzym bei der Teilreaktion i
$K_{F6P,R,0}$	mM ⁻¹	Affinitätskonstante bezüglich des Substrats F6P für das Enzym im Zustand R
$K_{F6P,T,0}$	mM ⁻¹	Affinitätskonstante bezüglich des Substrats F6P für das Enzym im Zustand T
$K_{Eq,j}$	-	Gleichgewichts-Konzentration der Reaktion j
$K_{Diss,F6P,R}^P$	mM	Dissoziationskonstante bezüglich des Substrats F6P für das Enzym im Zustand R für ein Protomer
$K_{Diss,F6P,T}^P$	mM	Dissoziationskonstante bezüglich des Substrats F6P für das Enzym im Zustand T für ein Protomer
$K_{Diss,F6P,R}$	mM	Dissoziationskonstante bezüglich des Substrats F6P für das Enzym im Zustand R
$K_{Diss,F6P,T}$	mM	Dissoziationskonstante bezüglich des Substrats F6P für das Enzym im Zustand T
$K_{Diss,1}$	μM ⁻²	Dissoziationskonstante der PFK1 Untereinheiten vom Oktamer zu Tetramer

VI

$K_{Diss,2}$	μM^{-2}	Dissoziationskonstante der PFK1 Untereinheiten vom Tetramer zu Dimer
K_i	mM	Affinitätskonstante bezüglich des Metabolits i
$K_{Effektor}$	mM	Affinitätskonstante bezüglich eines Effektors
L	-	Allosterie-Funktion
L_0	-	Gleichgewichtskonstante der Allosterie in Abwesenheit von Liganden
L_i	-	Gleichgewichtskonstante der Teilreaktion i
$M_{F6P,R}$	-	Michaelis-Menten Term bezüglich des Substrats F6P für den Zustand R
$M_{F6P,T}$	-	Michaelis-Menten Term bezüglich des Substrats F6P für den Zustand T
n	-	Anzahl der Protomere des allosterischen Enzyms
N	-	Nenner der Effektor-Funktion
N_{F6P}	-	Sättigungsfunktion bezüglich F6P
N_{MgATP}	-	Sättigungsfunktion bezüglich MgATP
OD_{620}	-	Optische Dichte bei 620 nm
pO ₂	%	Partialdruck des Sauerstoffs
Q	-	Effektor-Funktion
R	-	Molanteil des Enzyms im Zustand R
R_1	-	Molanteil des Enzyms in der Grundkonformation R1
R_2	-	Molanteil des Enzyms in der Subkonformation R2
R_i^*	-	Molzahl des R-Komplexes für die Teilreaktion i
r_j	mM/sec	Reaktionsrate bzw. Enzymaktivität der Reaktion j
r_j^{\max}	mM/sec	Maximale Rate der Reaktion j
\hat{r}_j	mM/sec	Gemessene Aktivität des Enzyms j
S	-	Substrat
t	sec	Zeit
T	-	Molanteil des Enzyms im Zustand T
T_1	-	Molanteil des Enzyms in der Grundkonformation T1
T_2	-	Molanteil des Enzyms in der Subkonformation T2
T_i^*	-	Molzahl des T-Komplexes für die Teilreaktion i
V_{Probe}	ml	Volumen der Probe
V_{Perm}	ml	Volumen des Permeabilisats
V_{Med}	l	Volumen des Quenching-Mediums
V_{rel}	-	Auf die Maximalaktivität bezogene Enzymaktivität
YO ₂	%	Molanteil des Sauerstoffs
YCO ₂	%	Molanteil des Kohlendioxids
Z	-	Zähler der Effektor-Funktion

VII

Griechische Symbole:

$\alpha_{i,A}$	-	Der exklusive Bindungskoeffizient für den Effektor i in der Grundkonformation
$\alpha_{ADP,C}$	-	Der exklusive Bindungskoeffizient für ADP als kompetitiver Inhibitor
$\alpha_{i,I}$	-	Der exklusive Bindungskoeffizient für den Effektor i in der Subkonformation
$\alpha_{F6P,R}$	-	Der exklusive Bindungskoeffizient des Substrats F6P bezüglich Zustand R
$\alpha_{F6P,T}$	-	Der exklusive Bindungskoeffizient des Substrats F6P bezüglich Zustand T
α_{MgATP}	-	Der exklusive Bindungskoeffizient des Substrats MgATP
ϵ_{spez}	-	Molarer spezifischer Extinktionskoeffizient bei 340 nm
$\epsilon_{rel,k}$	%	Relative Fehlerquadratsumme bezüglich der Meßreihe k
Ξ_j	mM ² /sec	Zeitlicher Mittelwert der globalen Fluß-Kontrollkoeffizienten bezüglich des Parameters j

Bezeichnung der Enzyme:

ACyclase	EC 4.6.1.1	Adenylat-cyclase
ADH	EC 1.1.1.1	Alkohol-dehydrogenase
ALDO	EC 4.1.2.13	Aldolase
FBPase-1	EC 3.1.3.11	Fructose-1,6-bisphosphatase
G6PDH	EC 1.1.1.49	Glucose-6-phosphat-dehydrogenase
GDH	EC 1.1.1.8	Glycerol-3-phosphat-dehydrogenase
PDE	EC 3.1.4.17	Phosphodiesterase
PFK1	EC 2.7.1.11	Phosphofruktokinase-1
PFK2	EC 2.7.1.105	Phosphofruktokinase-2
PGI	EC 5.3.1.9	Phosphoglucose-isomerase
PKA	EC 2.7.1.37	Proteinkinase-A
PP _i -PFK	EC 2.7.1.90	Pyrophosphat abhängige Phosphofruktokinase
TIM	EC 5.3.1.1	Triose-phosphat-isomerase

Bezeichnung der Gene:

<i>CYR1</i>	Adenylat-cyclase
<i>BCZ1</i>	R-PKA, Regulatorische Untereinheit
<i>CDC25</i>	Cdc25
<i>PDE1</i>	Phosphodiesterase Untereinheit 1
<i>PDE2</i>	Phosphodiesterase Untereinheit 2
<i>PFK26</i>	PFK2-1
<i>PFK27</i>	PFK2-2
<i>PFK1</i>	α -Untereinheit der PFK1
<i>PFK2</i>	β -Untereinheit der PFK1
<i>RAS1</i>	Ras-Protein 1

VIII

<i>RAS2</i>	Ras-Protein 2
<i>TPK1</i>	C-PKA-1, Katalytische Untereinheit
<i>TPK2</i>	C-PKA2, Katalytische Untereinheit
<i>TPK3</i>	C-PKA-3, Katalytische Untereinheit

Bezeichnung der Metabolite:

ADP	Adenosin-diphosphat
AMP	Adenosin-monophosphat
ATP	Adenosin-triphosphat
cAMP	Cyklisches Adenosin-monophosphat
DHAP	Dihydroxyaceton-phosphat
F-1,6-BP	Fructose-1,6-bisphosphat
F-2,6-BP	Fructose-2,6-bisphosphat
F6P	Fructose-6-phosphat
FBP	Fructose-1,6-bisphosphat
G3P	Glycerol-3-phosphat
G6P	Glucose-6-phosphat
MgATP	Magnesiumkomplex des Adenosin-triphosphats
NAD(H)	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid oxidiert (reduziert)
NADP(H)	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat oxidiert (reduziert)
P _i	Anorganischer Phosphat
PP _i	Pyrophosphat

Weitere Indizes:

BSA	Bovine Serum Albumin
CTAB	Cetyl-triethyl-ammoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetracetat
FS	Frische Substanz
KPi	Kaliumphosphat Puffer
MES	2-(N)-Morpholino-ethansulfonsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Trockene Substanz
PI	Propiumiodid
FD	Fluoreszeindiazetat
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird das Phosphofruktokinase-System in *S. cerevisiae* hinsichtlich seiner dynamischen Eigenschaften unter *in-vivo* Bedingungen untersucht. Dieses System läßt sich als ein funktionaler Modul der Glycolyse in zwei weitere Untereinheiten, nämlich das Phosphofruktokinase-1- und das Phosphofruktokinase-2-System, aufgliedern. In einem ersten Schritt wird jede dieser Untereinheiten aus reaktionskinetischer Sicht getrennt untersucht. Anschließend läßt sich aus der gewonnenen Information ein zusammenhängendes Bild zur Beschreibung der Dynamik des gesamten Phosphofruktokinase-Systems unter *in-vivo* Bedingungen rekonstruieren.

Hierzu wurden sowohl theoretische als auch experimentelle methodische Werkzeuge entwickelt und zum Einsatz gebracht. Zur Untersuchung der Dynamik des Systems wurden glucoselimitierte kontinuierliche Kulturen von *Saccharomyces cerevisiae* durch das Auftragen eines extrazellulären Glucosepulses im stationären Zustand angeregt. In Antwort auf eine solche Anregung wurden Veränderungen der intrazellulären Metabolitkonzentrationen bzw. Enzymaktivitäten beobachtet. Diese Beobachtungen ermöglichen anhand modellgestützter Untersuchungen die Erfassung dynamischer Eigenschaften des betreffenden reaktionskinetischen Systems unter *in-vivo* Bedingungen.

Es läßt sich zeigen, daß eine Übertragung der unter *in-vitro* Bedingungen gewonnenen Erkenntnisse auf die *in-vivo* Bedingungen der lebenden Zelle außerordentlich kritisch zu betrachten ist. In diesem Zusammenhang nehmen sogenannte *in-situ* Untersuchungen in permeabilisierten Zellen eine bedeutende Zwischenstellung ein. Bei diesen Untersuchungen wird die Zellmembran permeabilisiert und das Cytoplasma für niedermolekulare Substanzen zugänglich gemacht. Somit lassen sich Enzymaktivitäten direkt im cytoplasmatischen Proteinverband bestimmen. Phosphofruktokinase-1 unterliegt im Cytosol den homologen und heterologen Protein-Protein-Wechselwirkungen. Durch diese Wechselwirkungen werden kinetische Eigenschaften des Enzyms signifikant beeinflusst. Diese Tatsache konnte sowohl unter *in-situ* als auch unter *in-vivo* Bedingungen beobachtet werden. Mit Ausnahme von Fructose-1,6-bisphosphat ist der Einfluß der Effektoren in beiden Fällen deutlich geringer ausgeprägt als *in-vitro*. Darüber hinaus zeigt sich unter *in-situ* bzw. *in-vivo* Bedingungen eine deutliche Stabilisierung des Konformationszustands R (*engl. relaxed*) gegenüber T (*engl. tensed*). Hinzu kommt, daß die Kooperativität zwischen den Protomeren der Phosphofruktokinase-1 an Bedeutung verliert. Diese Beobachtung kann auf eine übergreifende Kooperativität im intrazellulären Proteinverband der Zelle zurück geführt werden.

Es konnte gezeigt werden, daß die Phosphofruktokinase-1 unter *in-vivo* Bedingungen nur vom positiven Effektor Fructose-2,6-bisphosphat bzw. dem negativen Effektor MgATP beeinflusst wird. Fructose-2,6-bisphosphat koppelt das Enzym an die Signaltransduktionsebene während MgATP das Bindeglied zum Energiestatus der Zelle darstellt. Hierbei zeigt sich ein signifikanter Unterschied zu den *in-vitro* Bedingungen, wo weitere Modulatoren (z.Bsp. AMP, ADP) hinzutreten.

Die Phosphofruktokinase-2 ist unter *in-vivo* Bedingungen durch die Substrate Fructose-6-phosphat und MgATP gesättigt. Damit erreicht die Zelle eine gezielte Entkopplung des

glycolytischen Stoffflusses vom Signaltransduktionsweg des cAMP/Proteinkinase-A/Phosphofruktokinase-2. Die Aktivierung der Phosphofruktokinase-2 nach einem extrazellulären Glucosepuls erfolgt ausschließlich über eine Phosphorylierung durch Proteinkinase-A. Die Proteinkinase-A wird seinerseits durch die ansteigende cAMP Konzentration aktiviert. Die Übertragung des cAMP Signals auf die Phosphofruktokinase-2 weist zwei charakteristische Eigenschaften auf. Zum einen liegt bei dieser Übertragung ein positiver Feed-back-Mechanismus vor, dessen biochemischer Hintergrund derzeit noch ungeklärt ist, zum zweiten weist die Übertragung des Signals über Proteinkinase-A ausgeprägte Hystereseigenschaften auf. Demnach wird die Proteinkinase-A mit ansteigenden cAMP-Konzentrationen erst beim Erreichen einer kritischen Konzentration aktiviert. Nach der Aktivierung nimmt die Signalübertragung seinen eigenen Lauf unabhängig vom weiteren Verlauf der Konzentration des cAMP. Ist die Signaltransduktionskaskade einmal eingeschaltet, ist sie nicht mehr aufzuhalten bis sie ihren Ausgangspunkt erreicht hat, in anderen Worten wenn ein vollständiges Signalmodul übertragen worden ist. Dies ermöglicht der Zelle eine Autonomie und Entkopplung der Phosphofruktokinase-2 Aktivität vom Eingangssignal des cAMP. Der Vorteil dieses Mechanismus liegt in der Tatsache, daß eine erneute Aktivierung der Kaskade durch cAMP erst dann möglich ist, wenn die Übertragung des ersten Signalmoduls abgeschlossen ist.

Das dynamische Verhalten des gesamten Phosphofruktokinase-Systems läßt sich entsprechend den Beobachtungen wie folgt beschreiben. In Antwort auf einen externen Glucosepuls steigt die Aktivität der Phosphofruktokinase-1 in den ersten 30 sec in Folge eines Anstiegs der Sensitivität bezüglich Fructose-2,6-bisphosphat. Verantwortlich hierfür ist jedoch der Anstieg der Konzentration des Substrats Fructose-6-phosphat bei konstant anhaltender Konzentrationen des Fructose-2,6-bisphosphats. Demnach wird die Phosphofruktokinase-1 direkt nach dem Puls auf der Ebene des Substrats jedoch indirekt durch die Wirkung des Effektors Fructose-2,6-bisphosphat reguliert. Die Signaltransduktionsebene nimmt also in diesem Zeitraum keinen Einfluß auf die Phosphofruktokinase-1. Nach Ablauf von 30 sec nimmt der Einfluß von Fructose-6-phosphat signifikant ab, hingegen steigt die Konzentration des Fructose-2,6-bisphosphats dramatisch an und vermeidet ein schnelles Sinken der Phosphofruktokinase-1 Aktivität. Die Aktivität der Phosphofruktokinase-1 erreicht erst bei 500 sec wieder den stationären Zustand. In diesem Zeitraum wird die Aktivität der Phosphofruktokinase-1 direkt durch den Einfluß des Fructose-2,6-bisphosphat und der damit verbundenen Signaltransduktionskaskade reguliert. Im gesamten Zeitraum nach dem Glucosepuls wird der Beitrag seitens MgATP unterdrückt, indem die Konzentration als auch die entsprechende Sensitivität gleichzeitig reduziert wird. Damit wird für eine Dämpfung des Einflusses der Phosphofruktokinase-1 Aktivität durch MgATP gesorgt. Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß das Substrat Fructose-6-phosphat und der Effektor Fructose-2,6-bisphosphat den wichtigsten Beitrag zur Regulation der Phosphofruktokinase-1 Aktivität leisten. Die Rate des Enzyms wird in der ersten Phase überwiegend von Fructose-6-phosphat und somit dem glycolytischen Fluß beeinflusst. Anschließend an dieser Phase gewinnt die Modulation über die Signaltransduktionskaskade an Bedeutung.

Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß die Aktivität der Phosphofruktokinase-1 in der zweiten Phase nach dem Glucosepuls ausschließlich durch die Signaltransduktionskaskade über Phosphofruktokinase-2 bzw. Fructose-2,6-bisphosphat moduliert wird. Die Modulation der Aktivität der Phosphofruktokinase-1 wird in der zweiten Phase weder direkt, über

glycolytische Metabolite, noch indirekt, über die Aktivität der Phosphofruktokinase-2, vom glycolytischen Fluß beeinflußt. Somit besteht innerhalb dieser Phase eine Entkopplung zwischen Regulation der Phosphofruktokinase-1 Aktivität und dem glycolytischen Fluß. Berücksichtigt man ferner, daß auch eine Dämpfung der Kopplung zwischen der Phosphofruktokinase-1 Aktivität und des Energiestatus der Zelle beobachtet wird, kann man folgern, daß während dieser Phase die Phosphofruktokinase-1 streng durch die Wirkung der Signaltransduktionskaskade moduliert wird.

Aus den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit läßt sich exemplarisch auf einen gezielten und höchst organisierten Bauplan der zellulären Regulation schließen, welcher die verschiedenen physiologischen Ebenen, nämlich der Stoffflüsse, des Energiehaushalts, der Signal- bzw. Informationsverarbeitung und der Struktur bzw. Gestalt der Zelle koordiniert verbindet. Zwar befolgt dieser Bauplan prinzipiellen Grundmechanismen auf der Ebene der Enzymregulation, der Signaltransduktion, des Stoffwechsels usw., dennoch wird die Einheit und die Flexibilität des gesamten Systems aufrecht erhalten, um jederzeit auf äußere Einflüsse eine optimale Antwort zu gewährleisten.

1 Einleitung

Die quantitative Analyse *metabolischer Netzwerke* in Mikroorganismen und deren gezielte Veränderung für einen effizienten technologischen Einsatz, hat sich in den letzten Jahren über den Begriff des *Metabolic-engineerings* (BAILEY, 1991) (STEPHANOPOULOS AND SINSKEY, 1993) zu einer bedeutenden Disziplin innerhalb der Biotechnologie entwickelt. Einen entscheidenden Beitrag hierzu leistete die Entwicklung strukturierter mathematischer Modelle im wechselseitigen Zusammenhang mit geeigneten experimentellen Strategien zur gezielten Untersuchung höher organisierter metabolischer Netzwerke.

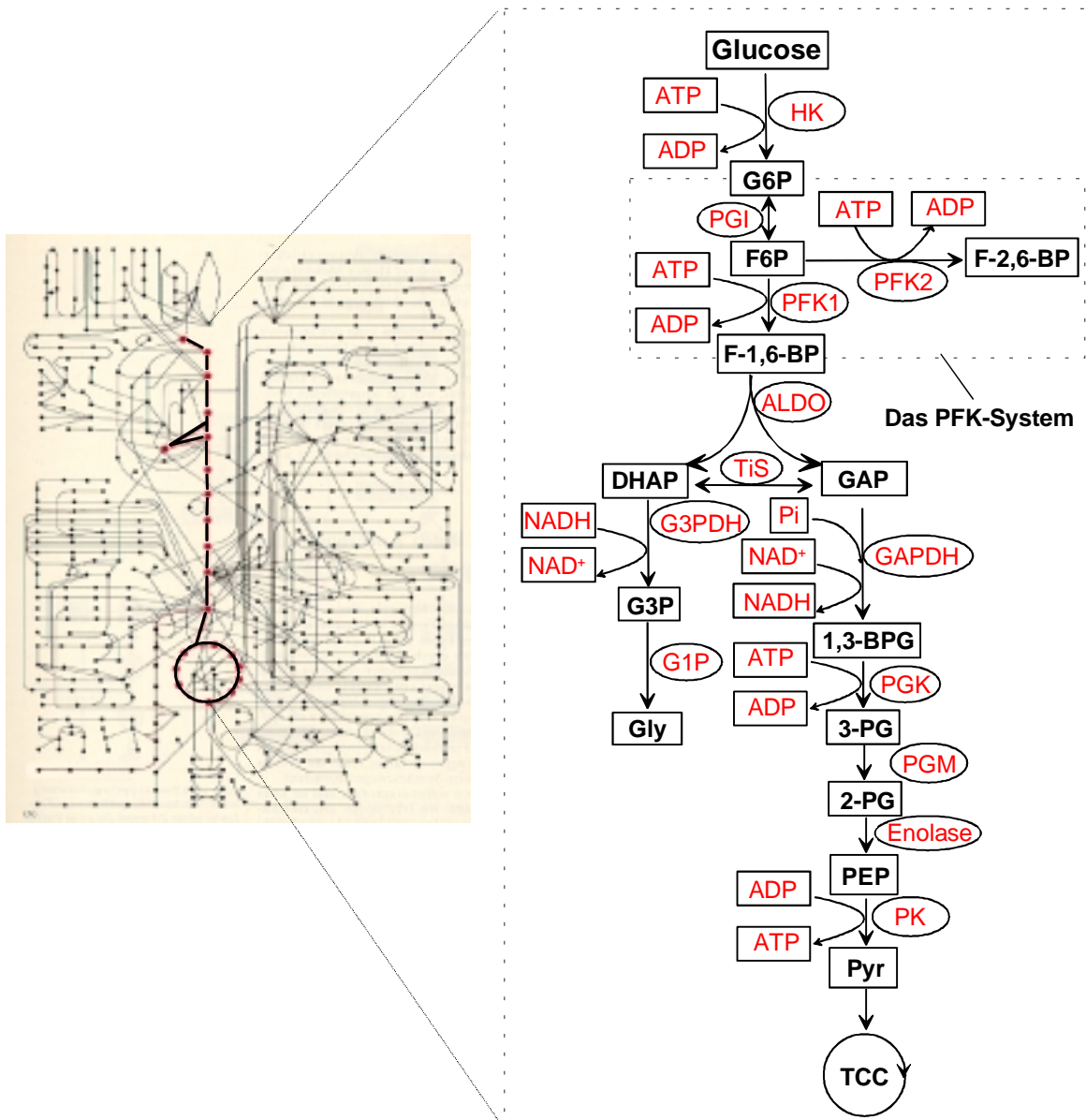


Abbildung 1. Die Rolle des Funktionsmoduls PFK1/PFK2 (PFK-System) im zentralen Stoffwechsel der Hefe *S. cerevisiae* (links nach ALBERTS, 1989).

Bei der Untersuchung solcher Netzwerke kann ein funktionales Wissen über einzelne Reaktionen, Reaktionsketten bzw. einfache Reaktionsnetzwerke einen entscheidenden Beitrag zum ganzheitlichen Verständnis der Netzwerkeigenschaften leisten. In diesem Zusammenhang nimmt die gezielte *Dekomposition* komplex strukturierter Netzwerke in ihre funktionalen Untereinheiten und deren quantitative Charakterisierung unter definierten physiologischen Bedingungen eine bedeutende Stellung ein. Diese pragmatische Vorgehensweise wurde bereits von BALTES (1995), RIZZI ET AL. (1997) und THEOBALD ET AL. (1997) zur Untersuchung des zentralen Stoffwechselwegs und deren Untereinheiten erfolgreich zum Einsatz gebracht. Das Prinzip der Dekomposition ist in der Abbildung 1 am Beispiel des Phosphofruktolinase-Systems (PFK-Systems) und der Glycolyse dargestellt. Während die Glycolyse eine Untereinheit des zentralen Stoffwechselwegs darstellt, kann das PFK-System als eine funktionale Untereinheit der Glycolyse abgebildet werden. Setzt man am Beispiel des PFK-Systems die Dekomposition fort, so läßt sich dieses System entsprechend Abbildung 2 in zwei weitere Untereinheiten gliedern, nämlich das PFK1- und das PFK2-System.

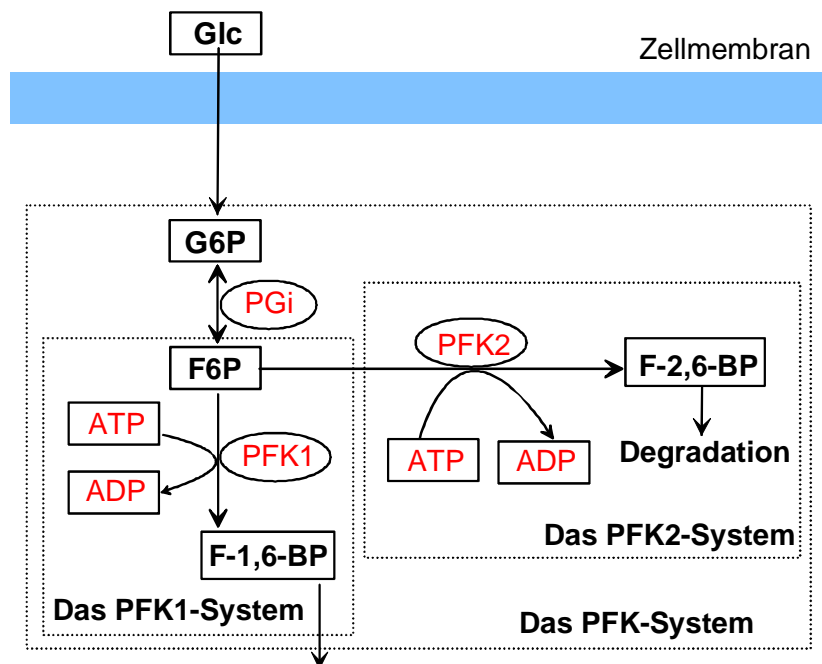


Abbildung 2. Dekomposition des PFK-Systems in die Untereinheiten PFK1 und PFK2.

Zwar erlaubt die Dekomposition aus theoretischer Sicht einen pragmatischen Modellierungsansatz durch eine klare Reduktion bzw. Abgrenzung der Problemstellung, dennoch stellen die Grenzen bestehender experimenteller Methoden die entscheidende Schwelle zur quantitativen Erfassung der betreffenden Systeme dar. Die bestehenden experimentellen Methoden aus der Biologie bzw. Biochemie genügen nur selten den tatsächlichen Anforderungen einer "Quantitativen Physiologie". Vor diesem Hintergrund treten insbesondere bei der Untersuchung dynamischer Systemeigenschaften erhebliche Schwierigkeiten auf. Die Entwicklung neuer methodischer Werkzeuge zur gezielten Gestaltung von Experimenten gilt als eine zentrale Herausforderung der "Quantitativen

Physiologie". Entsprechend der Problemstellung und der Zielsetzung lassen sich die experimentellen Ansprüche in folgende allgemeine Kategorien aufteilen:

- Zuverlässige Prozeßführung, um einen definierten und reproduzierbaren physiologischen Zustand der Zelle zu gewährleisten,
- Probenahmetechnik, die der interessierenden Dynamik gerecht wird,
- Technik zum Abstoppen (*engl. quenching*) des Metabolismus,
- Technik zur gezielten Extraktion von Metaboliten bzw. Enzymen,
- Bio-analytische Methoden zur Bestimmung von Metaboliten und Enzymaktivitäten,

Die Wahl, Entwicklung bzw. übergreifende Kombination der jeweiligen Werkzeuge richtet sich nach den zu untersuchenden Systemen bzw. den herrschenden physiologischen Bedingungen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit umfaßt die Untersuchung der dynamischen Eigenschaften des PFK-Systems in *S. cerevisiae* unter *in-vivo* Bedingungen. Wie bereits erwähnt läßt sich das PFK-System als ein funktionaler Modul der Glycolyse in zwei weitere Untereinheiten, nämlich das PFK1- und das PFK2-System, aufgliedern. Jede dieser Untereinheiten wird bezüglich seiner dynamischen Eigenschaften unter *in-vivo* Bedingungen auf quantitativer Grundlage untersucht. Im Anschluß läßt sich aus der gewonnenen Information ein zusammenhängendes Bild zur Beschreibung der Dynamik des gesamten PFK-Systems unter *in-vivo* Bedingungen rekonstruieren. Hierzu wurden sowohl theoretische als auch experimentelle methodische Werkzeuge entwickelt und zum Einsatz gebracht. Die gesamte Studie liefert schließlich ein abgeschlossenes und quantitativ verifiziertes Bild der Regulation des PFK-Systems unter *in-vivo* Bedingungen.

SRERE (1967) hat in einer umfassenden Studie gezeigt, daß die Konzentration glycolytischer Enzyme unter *in-vivo* Bedingungen bis zu 100-fach höher liegen als im Ansatz gewöhnlicher *in-vitro* Assays. Der Einfluß hoher intrazellulärer Konzentrationen des Enzymproteins auf die Regulation glycolytischer Enzyme ist von verschiedenen Autoren untersucht worden (s. als Zusammenfassung OVADI, 1995). Assoziation glycolytischer Enzyme untereinander sowie mit Strukturproteinen des Cytoskeletts wurde bereits von unabhängigen Autoren für verschiedene eukaryotische Enzyme untersucht (LUTHER UND LEE, 1986) (ROBERTS UND SOMERO, 1987) (KARKHOFF-SCHWEIZER UND KNULL, 1987) (AON, 1989) (GELFAND UND BERSHADSKZ, 1991) (CARLIER, 1992) (BREITER HAHN ET AL., 1989) (CORTASSA ET AL., 1994). Diese Beobachtungen machen deutlich, daß eine Übertragung der unter *in-vitro* Bedingungen gewonnene Erkenntnisse auf die *in-vivo* Bedingungen der lebenden Zelle (Cytoplasma) außerordentlich kritisch zu betrachten ist. Sogenannte *in-situ* Untersuchungen (s. Abbildung 3) nehmen in diesem Zusammenhang eine bedeutende Zwischenstellung ein. Bei diesen Untersuchungen wird die Zellmembran permeabilisiert und das Cytoplasma für niedermolekulare Substanzen (Substrate, Co-Substrate) zugänglich gemacht. Somit lassen sich Enzymaktivitäten direkt im cytoplasmatischen Proteinverband bestimmen. Die kinetische Charakterisierung der PFK1 unter *in-situ* Bedingungen nimmt im Zusammenhang mit dieser Arbeit eine besondere Stellung ein, um den Einfluß cytoplasmatischer Proteine auf Enzyme mit zu berücksichtigen.

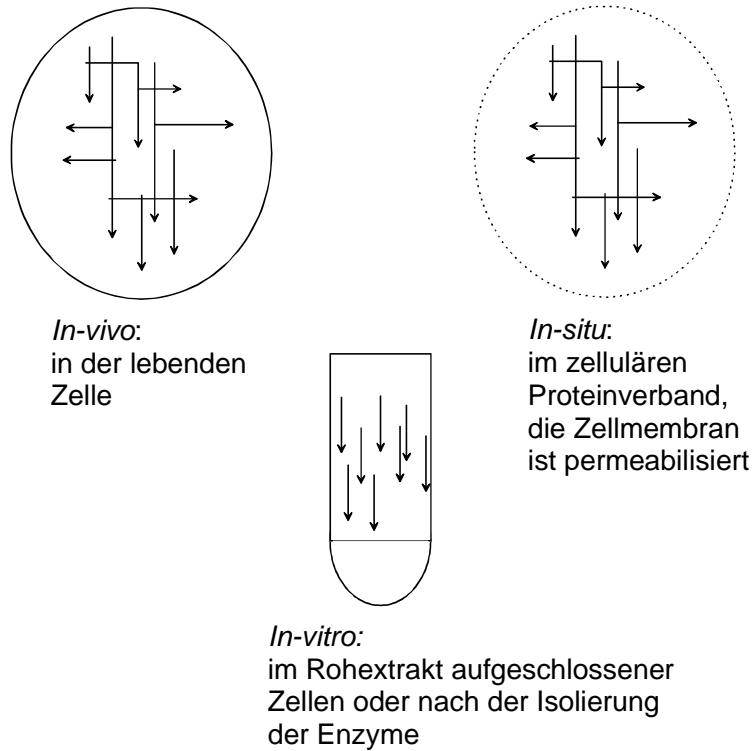


Abbildung 3. Die kinetischen Eigenschaften der Enzyme können unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden: Unter *in-vivo* Bedingungen in der lebenden Zelle (oben links), unter *in-situ* Bedingungen im zellulären Proteinverband in permeabilisierten Zellen (oben rechts) oder unter *in-vitro* Bedingungen im Rohextrakt aufgeschlossener Zellen oder nach der Isolierung der Enzyme (unten). Die Pfeile kennzeichnen enzymatische Reaktionen bzw. Reaktionsnetzwerke.

2 Stand des Wissens

2.1 Das PFK1 System

Das Enzym Phosphofruktokinase-1 (PFK1) katalysiert in der Glycolyse den irreversiblen Reaktionsschritt der Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat (F6P) zu Fructose-1,6-bisphosphat (F-1,6-BP).

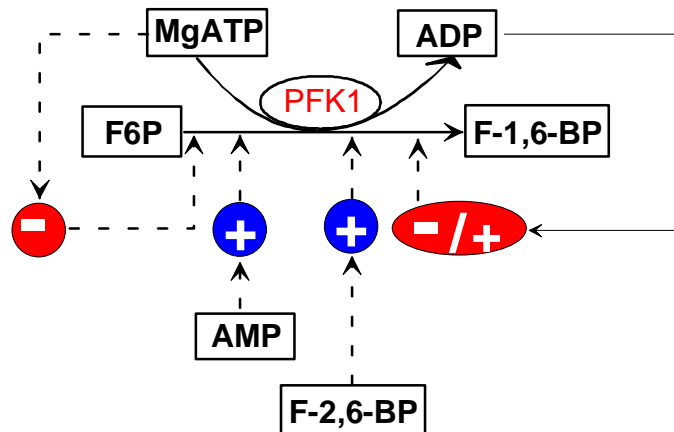


Abbildung 4. Reaktion der PFK1 mit den zugehörigen Effektoren.

Die PFK1 ermöglicht die Übertragung der Phosphatgruppe des MgATP zur C-1-Hydroxyl-Gruppe des F6P. Hierbei sind die Ionen Mg^{2+} , NH_4^+ und K^+ für die Aktivität des Enzyms essentiell. PFK1 aus *S. cerevisiae* zeigt allosterisches Verhalten gegenüber seinem Substrat F6P. Seine Quartärstruktur wurde anhand elektronen-mikroskopischer Studien sowie Röntgenbeugungsanalyse ausführlich untersucht (PLIETZ ET AL., 1978) (NISSLER ET AL., 1985). Beide Studien bestätigen, daß das Enzym einen Dimer zweier Tetramere (α und β) darstellt, welche 60° um einen gemeinsamen Schwerpunkt gedreht vorliegen. Man spricht von einem $4\alpha\beta$ -Arrangement.

Die zwei Untereinheiten α und β stehen im äquimolaren Verhältnis zu einander. Bei einer Enzymkonzentration unterhalb 1 mg/ml kommt es zu einer Dissoziation des Oktamers (O) in zwei Tetramere (T) bzw. 4 Dimere (D) (KRIEGEL ET AL., 1987). Es handelt sich hierbei um eine reversible Reaktion (s. Abbildung 5).

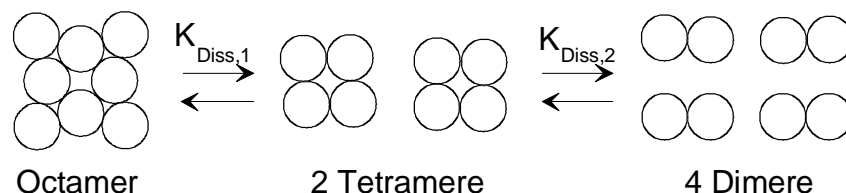


Abbildung 5. Assoziation bzw. Dissoziation der PFK1 Untereinheiten.

Die Dissoziationskonstanten der zwei Reaktionsschritte wurden von KRIEGEL ET AL. (1987) zu $K_{Diss,1} = 0.37 \mu M^{-2}$ bzw. $K_{Diss,2} = 0.73 \mu M^{-2}$ bestimmt. In Gegenwart von F6P wird das

Gleichgewicht der Gesamtreaktion in Richtung der oktameren Form verschoben, damit konnte unter *in-vitro* Bedingungen eine Stabilität des Oktamers bei Enzymkonzentrationen bis 0.25 µg/ml nachgewiesen werden (KRIEGEL ET AL., 1987) (KOPPERSCHLÄGER UND HEINISCH, 1997).

Die Untereinheiten α bzw. β werden von den zwei Genen *PFK1* bzw. *PFK2* kodiert (HEINISCH ET AL., 1989). Das aus der kodierten Sequenz errechnete Molekulargewicht beträgt für die α bzw. β Polypeptidkette 108 bzw. 105 kD (HEINISCH ET AL., 1989).

2.1.1 Aspekte der Regulation

2.1.1.1 Die wichtigsten Effektoren

Die Reaktion der PFK1 stellt einen wichtigen Knotenpunkt der Regulation in der Glycolyse dar. Kennzeichnend hierfür sind vor allem die Irreversibilität dieser Reaktion und die Vielzahl ihrer Effektoren (s. Abbildung 4). Die wichtigsten Effektoren der PFK1 sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1. Die wichtigsten Effektoren der PFK1

Gruppe I	Adenylate	MgATP	Inhibitor	VIÑUELA ET AL. (1963)
		ADP	Inhibitor/ Aktivator	NISSLER (1985)
		AMP	Aktivator	LAURENT ET AL. (1989)
Gruppe II	F-2,6-BP		Aktivator	KESSLER ET AL. (1988)
	F-1,6-BP		Inhibitor	LEDERER ET AL. (1981)

MgATP wurde bereits von VIÑUELA ET AL. (1963) sowie POGSON UND RANDLE (1966) als ein signifikanter Inhibitor der PFK1 aus *S. cerevisiae* nachgewiesen. Bei niedrigen Konzentrationen spielt MgATP vorwiegend die Rolle des Substrats, dessen Bindung an das Enzym einer Michaelis-Menten Kinetik entspricht, höhere Konzentrationen von MgATP wirken hingegen auf das Enzym inhibierend.

Es existieren zwei Typen von Bindungsstellen für MgATP, nämlich eine Bindungsstelle mit hoher und eine mit niedriger Affinität. Die erste stellt eine katalytische und die zweite eine regulatorische Bindungsstelle dar. Nach dem aktuellen Stand der Literatur ist noch nicht geklärt, ob die Bindungsstöchiometrie 8 oder 16 pro Oligomer beträgt (NISSLER ET AL., 1977).

Entsprechend der Abbildung 6 bewirkt der Effektor ADP eine Verschiebung der MgATP-Aktivitätskurve nach rechts. Somit wirkt ADP bei niedrigen MgATP Konzentrationen (C_{ATP}) als negativer hingegen bei hohen MgATP Konzentrationen als positiver Effektor (NISSLER ET AL., 1985) (REIBSTEIN ET AL., 1986).

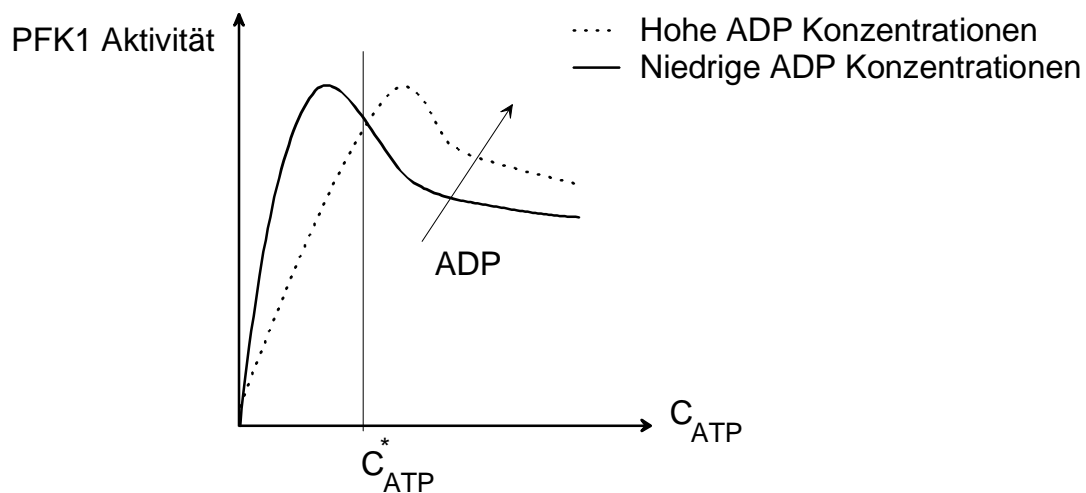


Abbildung 6. Wirkung des ADP auf die MgATP-Aktivitätskurve der PFK1. Für $C_{ATP} < C_{ATP}^*$ wirkt ADP als Inhibitor, für $C_{ATP} > C_{ATP}^*$ wirkt ADP als Aktivator.

Der positive Effektor AMP bindet gemäß einer einfachen Michaelis-Menten Kinetik mit einer Bindungsstöchiometrie von 4 pro Oligomer an PFK1. Der Mechanismus der Aktivierung der PFK1 durch AMP wird kontrovers interpretiert. Nach LAURENT ET AL. (1989) kompetiert AMP mit der regulatorischen Bindungsstelle von MgATP und vermindert dadurch die Inhibition durch MgATP. Die Ergebnisse von NISSLER ET AL. (1976 und 1977) und KESSLER ET AL. (1982) bestätigen hingegen die Existenz einer individuellen Bindungsstelle für AMP. Die Aufklärung der Verhältnisse ist derzeit noch Gegenstand von Untersuchungen.

Fructose-2,6-bisphosphat (F-2,6-BP) stellt einen positiven Effektor der PFK1 dar, welcher in der Lage ist, das Enzym bereits bei Konzentrationen im mikromolaren Bereich zu aktivieren (AVIGAD, 1981) (LEDERER ET AL., 1981) (HERS UND VAN SCHAFTINGEN, 1982) (KESSLER ET AL., 1988). Die Aktivierung führt sowohl zu einer Erhöhung der maximalen Aktivität als auch der Affinität des Enzyms bezüglich F6P (NISSLER ET AL., 1983). Die Bindungsstöchiometrie für F-2,6-BP beträgt 4 pro Oligomer. F-1,6-BP wirkt als kompetitiver Inhibitor des Enzyms gegen F-2,6-BP (LEDERER ET AL., 1981) (KESSLER ET AL., 1982) (PRZYBZLSKY ET AL., 1985) (PRZYBYLSKI, 1986) (KESSLER ET AL., 1988).

Während die Adenylate eine regulatorische Kopplung der PFK1 zum energetischen Status der Zelle ermöglichen, stellt F-2,6-BP das Bindeglied zu den Signaltransduktionswegen dar (s. Abbildung 7).

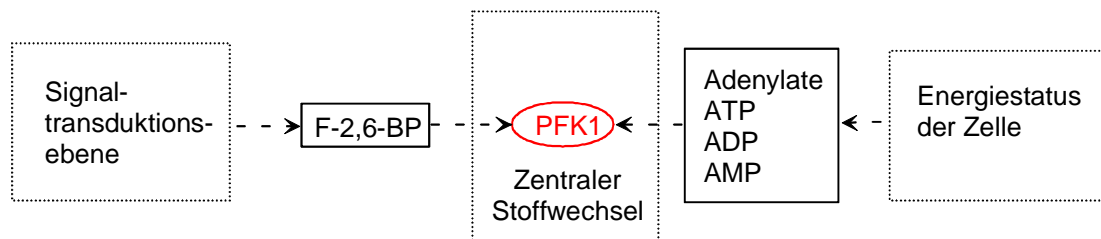


Abbildung 7. Kopplung der Glycolyse über die PFK1 an den Energiestatus der Zelle sowie der Signaltransduktionsebene.

2.1.1.2 Einfluß der Enzymkonzentration

SRERE (1967) hat in einer umfassenden Studie gezeigt, daß die Konzentrationen glycolytischer Enzyme unter *in-vivo* Bedingungen bis zu 100-fach höher liegen als im Ansatz gewöhnlicher *in-vitro* Assays. Nach ARAGÓN UND SÁNCHEZ (1985) liegt die Konzentration der PFK1 in *S. cerevisiae* zwischen 95 und 270 µg/g Feuchtmasse, d.h. zwischen 190 und 550 µg/ml. Hierzu wurde angenommen, daß 1 g Feuchtmasse ca. 0.2 gTS ergibt (ARAGÓN UND SÁNCHEZ 1985) und daß die volumenbezogene Zellmasse 420 gTS/l beträgt (THEOBALD, 1995). Gewöhnliche *In-vitro* Assays werden bei einer Enzymkonzentration von 1 bis 10 µg/ml durchgeführt. Die Konzentrationen liegen somit weit unterhalb der kritischen Konzentration von 1 mg/ml, bei der eine Dissoziation des Oktamers einsetzen würde. Eine Dissoziation wird dennoch in solchen Assays durch die hohe Konzentration an F6P unterdrückt (KRIEGEL ET AL., 1987).

Der Einfluß hoher intrazellulärer Konzentrationen des Enzymproteins auf die allosterische Regulation von PFK1 konnte sowohl mit dem Enzym aus Säugertiermuskelzellen (HULME UND TIPTON, 1971) als auch *S. cerevisiae* (ARAGÓN UND SÁNCHEZ, 1985) bestätigt werden. In beiden Fällen geben die Autoren an, daß bei hohen Enzymkonzentrationen die Inhibition durch MgATP verringert wird. Bei *S. cerevisiae* wird allerdings im Gegensatz zu dem Enzym aus Säugertierzellen keine Veränderung der F6P-Affinität durch Erhöhung der Enzymkonzentration beobachtet (BÄR ET AL., 1990).

Gerade in diesem Zusammenhang wird die Bedeutung von *in-situ* Messungen im Vergleich zu *in-vitro* Messungen deutlich (SERRANO ET AL., 1973) (BAÑUELOS ET AL., 1978). Ein besonderer Vorteil von *in-situ* Messungen besteht in dem Erhalt der cytoplasmatischen Enzym- bzw. Proteinkonzentration. Bei *in-situ* Untersuchungen können nämlich neben den homologen Protein-Protein-Wechselwirkungen, zwischen denselben Enzymmolekülen, auch heterologe Protein-Protein-Wechselwirkungen, zwischen den Enzymmolekülen und Strukturproteinen des Cytoskeletts, aufrechterhalten werden.

Assoziationen zwischen glycolytischen Enzymen und Struktur-Proteinen des Cytoskeletts wurden bereits von unabhängigen Autoren für verschiedene eukaryotische Organismen untersucht (LUTHER UND LEE, 1986) (ROBERTS UND SOMERO, 1987) (KARKHOFF-SCHWEIZER UND KNULL, 1987) (AON ET AL., 1989) (GELFAND UND BERSHADSKY, 1991) (CARLIER, 1992) (BREITER HAHN ET AL., 1989) (CORTASSA ET AL., 1994). In Bezug auf PFK1 aus *S. cerevisiae* konnten schließlich KOPPERSCHLÄGER ET AL. (1999, persönliche Mitteilung) erstmals *in-vivo*

eine organisierte Assoziation zwischen dem Enzymmolekül und den Mikrotubuli nachweisen. Die Untersuchung des Einflusses einer solchen gerichteten Assoziation auf die Quartärstruktur des Enzyms und deren Eigenschaften ist derzeit Gegenstand von Untersuchungen (KOPPERSCHLÄGER ET AL., 1999, persönliche Mitteilung).

All diese Beobachtungen machen deutlich, daß eine Übertragung der unter *in-vitro* Bedingungen gewonnenen Erkenntnisse auf die *in-vivo* Bedingungen der lebenden Zelle außerordentlich problematisch ist. Der *in-situ* Zustand der permeabilisierten Zellen nimmt hier eine interessante Zwischenstellung ein (s. Abbildung 3).

2.1.2 Reaktionskinetische Ansätze der PFK1

PFK1 aus *S. cerevisiae* ist ein allosterisches Enzym, das durch Bindung von Liganden seine Konformation und folglich seine kinetische Eigenschaften ändert. Eine Grunddefinition für allosterische Enzyme wurde erstmals von MONOD ET AL. (1965) eingeführt, welche sich in vier Punkten gliedern läßt:

- Ein allosterisches Enzym ist ein Oligomer, welches aus einer begrenzten Zahl identischer Einheiten, den Protomeren, besteht (s. Abbildung 8 A und B). Jedes Protomer besitzt nur eine einzige Bindungsstelle je Ligand. Das Protomer kann sich aus mehreren nicht-identischen Untereinheiten zusammensetzen.
- Das geometrische Arrangement der Protomere innerhalb des gesamten Oligomers weist mindestens eine Symmetrieachse auf (s. Abbildung 8 C). Die Protomere besetzen hierbei gleichberechtigte (äquivalente) Positionen im Enzymmolekül. Damit sind auch die Bindungsstellen für einen Liganden innerhalb des Enzymmoleküls symmetrisch verteilt.
- Das Enzym kann durch die Anbindung des Substrats zwei verschiedene Grundkonformationen einnehmen, die als T (engl. *tensed*) bzw. R (engl. *relaxed*) bezeichnet werden (s. Abbildung 8 D). Zwischen den Grundkonformationen herrscht eine sogenannte schnelle Gleichgewichtsreaktion (engl. *rapid equilibrium*). Der Gleichgewichtszustand wird als das allosterische Grundgleichgewicht bezeichnet. Aufgrund des symmetrischen Aufbaus des Enzymmoleküls sind alle Protomere zur gleichen Zeit entweder in der T- oder in der R-Form (DALZIEL 1968) (POPOVA UND SEL'KOV 1976).
- Die zwei Grundkonformationen des Enzyms unterscheiden sich in ihrer Affinität zum Liganden. Die Grundkonformation T ist *per definitio* die weniger affine Form.

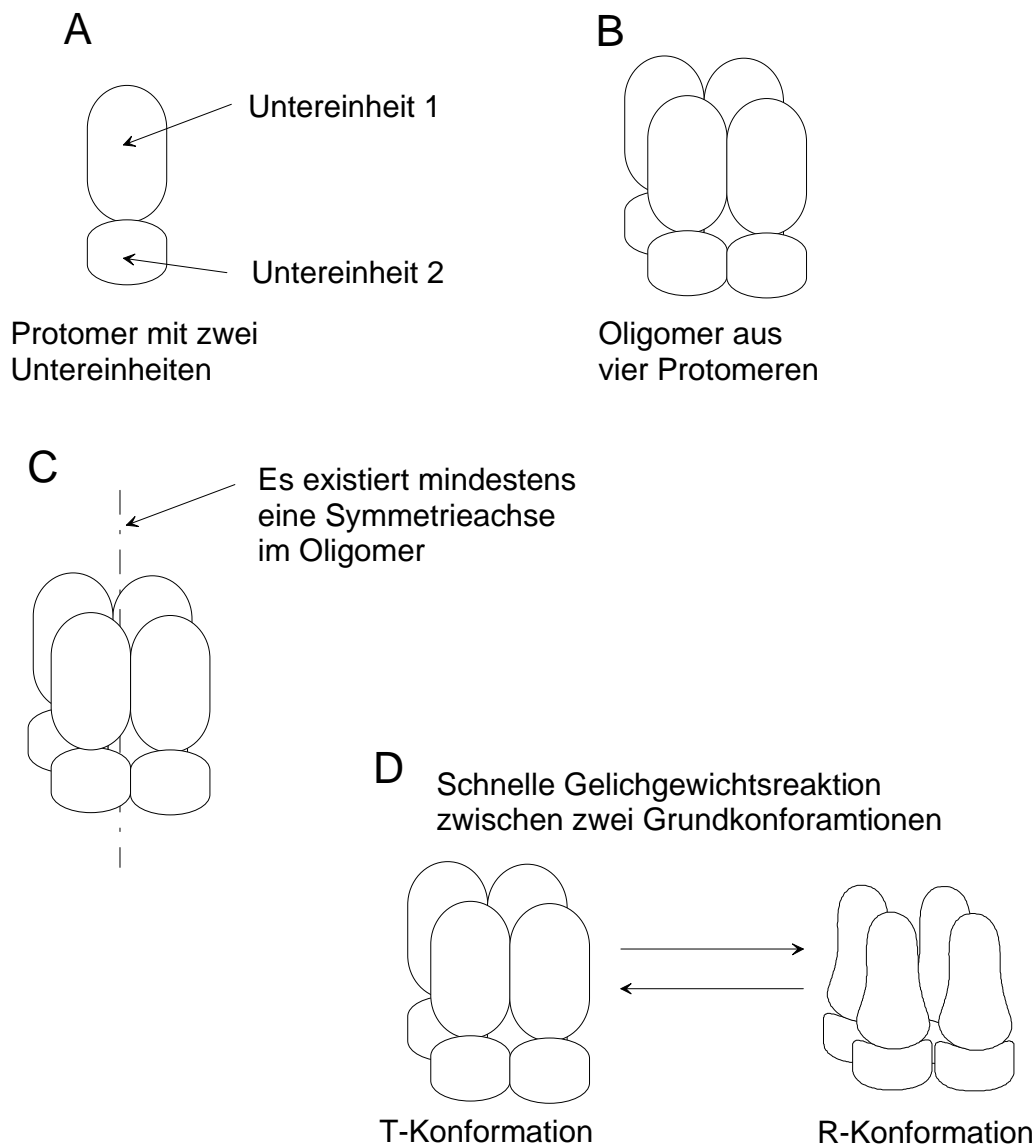


Abbildung 8. Grundeigenschaften eines allosterischen Enzyms: A) Das oligomere Enzym besteht aus einer Anzahl identischer Protomere. B) Das Protomer kann aus verschiedenen Untereinheiten bestehen. C) Das oligomere Enzym besitzt mindestens eine Symmetrieachse. D) Das Enzym kann zwei verschiedene Grundkonformationen annehmen. Zwischen diesen Konformationen herrscht eine schnelle Gleichgewichtsreaktion.

Vor diesem Hintergrund stellten MONOD ET AL. (1965) "ein allgemeines mathematisches Grundmodell zur Beschreibung der kinetischen Eigenschaften allosterischer Enzyme" auf. Dieses Grundmodell wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als das M-Modell bezeichnet.

Aufgrund des sehr hohen Molekulargewichts der PFK1 liegt bis zum heutigen Zeitpunkt weder eine Kristallisierung des oligomeren Enzyms noch eine vollständige Röntgenstrukturanalyse vor. Dennoch zeigten KOPPERSCHLÄGER ET AL., (1990) durch

Affinitätspartitionierung des Enzyms in wässrigen Zweiphasensystemen und Einsatz biomimetischer Farbstoffe als Liganden, daß das Enzym nach der Anbindung von F6P in einen Zustand niederer Affinität übergeht. Diese Veränderung der Konformation erweist sich beim entfernen des Substrats als reversibel. In Übereinstimmung mit dem Grundmodell von MONOD ET AL. (1965) unterstützen diese Beobachtungen die Existenz zweier allosterischer Grundzustände mit unterschiedlichen Affinitäten zum Substrat F6P.

Zwar haben FREYER ET AL. (1977) später gezeigt, daß die kinetischen Eigenschaften der PFK1 in *S. cerevisiae* nur begrenzt durch das M-Modell beschrieben werden können, dennoch dient das M-Modell als Grundlage zur Entwicklung aller weiterer Modelle. Da bezüglich der Unterschiede in den verschiedenen Modellansätze nebst ihrer mechanistischen Deutung im Schrifttum keine klaren Darstellungen existieren, wird nachfolgend die Herleitung der drei Grundmodelle von MONOD ET AL. (1965) (M-Modell), FREYER ET AL. (1977) (F-Modell) und HOFMANN UND KOPPERSCHLÄGER (1982) (HK-Modell) detailliert erläutert.

2.1.2.1 Der Modellansatz von Monod (M-Modell)

Wie bereits im vorangehenden Abschnitt beschrieben, unterscheiden MONOD ET AL. (1965) in ihrem Modell (M-Modell) zwischen zwei Grundkonformationen T und R des Enzyms (s. Abbildung 9), wobei T die nieder-affine und R die hoch-affine Grundkonformation des Enzyms bezüglich des Substrats F6P darstellt.

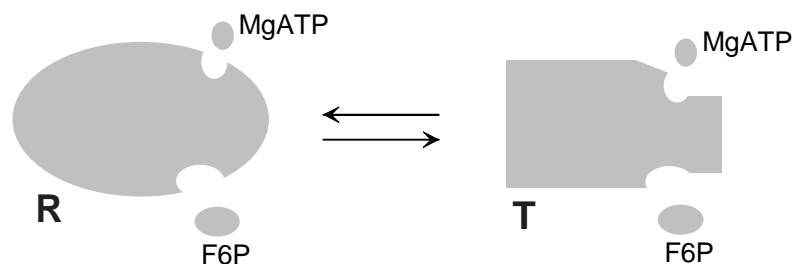
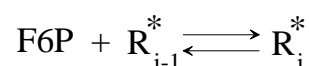


Abbildung 9. PFK1 als allosterisches Enzym entsprechend Monod et al. (1965).

Die Bindung des Substrats an den $n=8$ Untereinheiten verläuft über eine Folge schneller Gleichgewichtsreaktionen, deren Komplexe mit R_i^* bzw. T_i^* ($1 \leq i \leq n = 8$) (s. Abbildung 10) bezeichnet werden. Nach MONOD ET AL. (1965) verlaufen diese Teilreaktionen so schnell, daß man von einer konzertierten Reaktion spricht und die Teilreaktionen zu einer einzigen Gesamtreaktion zusammenfaßt (s. Abbildung 10, unten).

Die Dissoziationskonstanten des Substrats F6P am Protomer i ($1 \leq i \leq n = 8$) im Zustand R_i^* bzw. T_i^* , werden für die Teilreaktion i :



wie folgt definiert:

$$K_{Diss,F6P,R,0} = F_i^S F_{n,i}^B C_{F6P} \frac{R_{i-1}^*}{R_i^*} \quad (2.1)$$

$$K_{Diss,F6P,T,0} = F_i^S F_{n,i}^B C_{F6P} \frac{T_{i-1}^*}{T_i^*} \quad (2.2)$$

mit:

$$F_{n,i}^B = n - (i - 1) \quad (2.3)$$

$$F_i^S = \frac{1}{i} \quad (2.4)$$

Durch den Faktor $F_{n,i}^B$ wird berücksichtigt, daß von n Protomeren eines oligomeren Enzyms, bereits $(i-1)$ Protomere in den vorangehenden Teilreaktionen mit dem Substrat belegt worden sind (vergl. Abbildung 10). Somit nimmt ein Enzymmolekül mit $(n-(i-1))$ unbesetzten Bindungsstellen an der Reaktion i teil. Durch den Faktor F_i^S wird berücksichtigt, daß in der Reaktion i das Substratmolekül aufgrund der symmetrischen Anordnung der Protomere über i verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten an das Oligomer binden kann. SEGEL (1975) faßt beide Faktoren in einem sogenannten *statistischen Faktor* zusammen:

$$F_{n,i} = F_{n,i}^S F_i^B = \frac{n - (i - 1)}{i} \quad (2.5)$$

Im Anhang 3 wird diese Berechnung anhand eines einfachen Beispiels näher erklärt. Aus den Gleichungen (2.1-2.4) lassen sich die Molzahlen des R- bzw. T-Komplexes für die Teilreaktion i wie folgt darstellen:

$$R_i^* = \frac{n - (i - 1)}{i} \frac{C_{F6P}}{K_{Diss,F6P,R,0}} R_{i-1}^* \quad (2.6)$$

$$T_i^* = \frac{n - (i - 1)}{i} \frac{C_{F6P}}{K_{Diss,F6P,T,0}} T_{i-1}^* \quad (2.7)$$

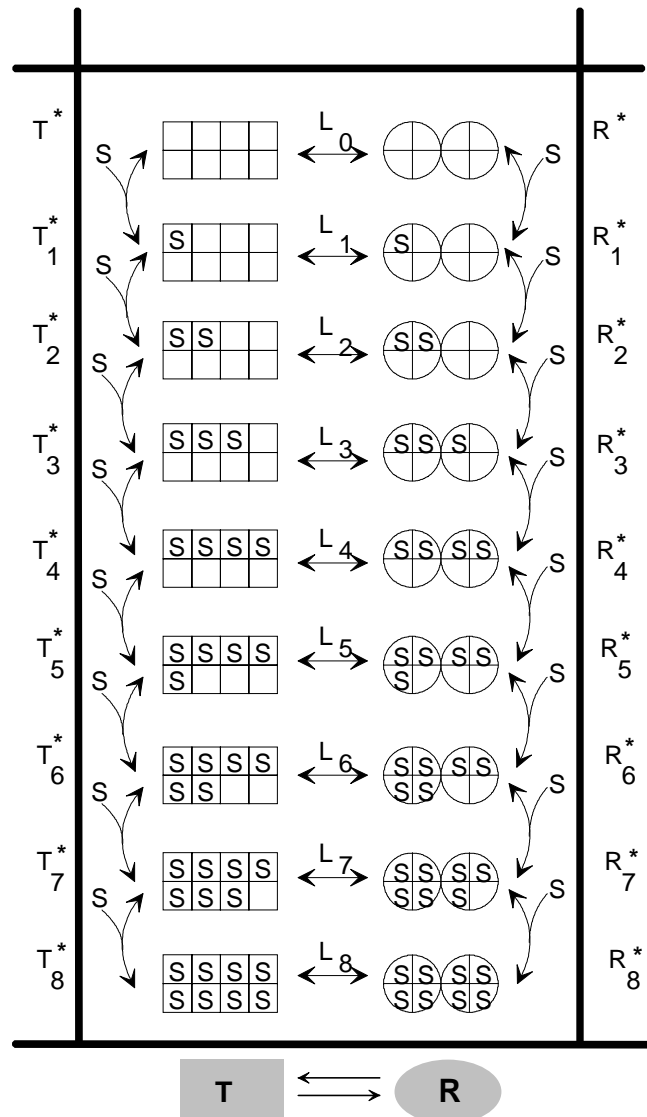


Abbildung 10. Teilreaktionen des M-Modells. S steht für das Substrat; die allosterische Gleichgewichtskonstante zwischen den Komplexen R_i^* und T_i^* der i ten Teilreaktion wurde mit L_i bezeichnet.

Zur weiteren Vereinfachung der Berechnungen werden entsprechend Tabelle 2 einige Abkürzungen eingeführt.

Tabelle 2. Abkürzungen für das M-Modells.

Parameter	
Die Affinitätskonstante für F6P im Zustand R	$K_{F6P,R,0} = \frac{1}{K_{Diss,F6P,R,0}}$
Die Affinitätskonstante für F6P im Zustand T	$K_{F6P,T,0} = \frac{1}{K_{Diss,F6P,T,0}}$
Der nicht-exklusive Bindungskoeffizient für F6P	$c = \frac{K_{F6P,T,0}}{K_{F6P,R,0}}$
Der exklusive Bindungskoeffizient für F6P	$\alpha_{F6P} = C_{F6P} K_{F6P,R,0}$
Der exklusive Bindungskoeffizient für MgATP K_{MgATP} stellt die Affinitätskonstante bezüglich MgATP dar	$\alpha_{MgATP} = C_{MgATP} K_{MgATP}$
Die allosterische Gleichgewichtskonstante in Abwesenheit der Liganden	$L_0 = \frac{T_0}{R_0}$

Unter Berücksichtigung dieser Definitionen lassen sich die Molzahlen des R- bzw. T-Komplexes für die Teilreaktion i vereinfacht darstellen:

$$R_i^* = \left[\frac{1}{i} (n - (i - 1)) \right] C_{F6P} K_{F6P,R,0} R_{i-1}^* = \left[\frac{1}{i} (n - (i - 1)) \right] \alpha_{F6P} R_{i-1}^* \quad (2.8)$$

$$T_i^* = \left[\frac{1}{i} (n - (i - 1)) \right] C_{F6P} K_{F6P,T,0} T_{i-1}^* = \left[\frac{1}{i} (n - (i - 1)) \right] c \alpha_{F6P} T_{i-1}^* \quad (2.9)$$

Mit Hilfe der obigen Beziehungen lassen sich die Molzahlen der R- bzw. T-Komplexe für die einzelnen Teilreaktionen sukzessiv berechnen. Der Verlauf dieser Berechnungen ist in der Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3. Berechnung der Molzahl der T- bzw. R-Komplexe.

R-Komplexe	T-Komplexe
$R_1^* = n \alpha_{F6P} R_0^*$	$T_1^* = n c \alpha_{F6P} T_0^*$
$\Rightarrow R_2^* = \frac{1}{2} (n - 1) \alpha_{F6P} R_1^*$	$\Rightarrow T_2^* = \frac{1}{2} (n - 1) c \alpha_{F6P} T_1^*$
$\Rightarrow R_3^* = \frac{1}{3} (n - 2) \alpha_{F6P} R_2^*$	$\Rightarrow T_3^* = \frac{1}{3} (n - 2) c \alpha_{F6P} T_2^*$
$\Rightarrow R_4^* = \frac{1}{4} (n - 3) \alpha_{F6P} R_3^*$	$\Rightarrow T_4^* = \frac{1}{4} (n - 3) c \alpha_{F6P} T_3^*$
...	...

Die Gesamtanzahl aller R-Komplexe lässt sich aus der Konzentration der einzelnen Komplexe (s. Tabelle 3) zur folgenden Gleichung bilanzieren:

$$\sum_{k=0}^n R_k^* = R_0^* + n \alpha_{F6P} R_0^* + \frac{1}{2} n (n-1) \alpha_{F6P}^2 R_0^* + \frac{1}{6} n (n-1)(n-2) \alpha_{F6P}^3 R_0^* + \dots \quad (2.10)$$

bzw.:

$$\sum_{k=0}^n R_k^* = R_0^* \left[1 + n \alpha_{F6P} + \frac{1}{2} n (n-1) \alpha_{F6P}^2 + \frac{1}{6} n (n-1)(n-2) \alpha_{F6P}^3 + \dots \right] \quad (2.11)$$

Die linke Seite dieser Gleichung stellt eine binomische Reihe mit positiven Exponenten dar. Diese lässt sich wie folgt darstellen:

$$\sum_{k=0}^n R_k^* = R_0^* \left[1 + \sum_{k=1}^n \binom{n}{k} \alpha_{F6P}^k \right] = R_0^* [1 + \alpha_{F6P}]^n \quad (2.12)$$

In Analogie zu den obigen Berechnungen, lässt sich auch die Gesamtanzahl der T-Komplexe herleiten. Dieser ergibt sich zu:

$$\sum_{k=0}^n T_k^* = T_0^* \left[1 + \sum_{k=1}^n \binom{n}{k} (c \alpha_{F6P})^k \right] = T_0^* [1 + c \alpha_{F6P}]^n \quad (2.13)$$

Der Gesamtanteil des Enzyms, welcher sich im Zustand R befindet, wird als R-Funktion bezeichnet. Dieser ergibt sich aus den letzten zwei Gleichungen unter Berücksichtigung der allosterischen Gleichgewichtskonstante L_0 :

$$R = \frac{\sum_{k=0}^n R_k^*}{\sum_{k=0}^n R_k^* + \sum_{k=0}^n T_k^*} = \frac{L_0 (1 + \alpha_{F6P})^n}{(1 + \alpha_{F6P})^n + L_0 (1 + c \alpha_{F6P})^n} \quad (2.14)$$

Entsprechend wird der Gesamtanteil an Enzym im Zustand T als T-Funktion bezeichnet. Dieser kann unter Berücksichtigung der letzten Gleichung direkt aus der Gesamtbilanz der Molanteile berechnet werden:

$$T = 1 - R = \frac{(1 + c \alpha_{F6P})^n}{(1 + \alpha_{F6P})^n + L_0 (1 + c \alpha_{F6P})^n} \quad (2.15)$$

Aus dieser Gleichung lässt sich die sogenannte Allosterie-Funktion L , herleiten:

$$L = \frac{T}{R} = \frac{1-R}{R} = L_0 \left(\frac{1 + c\alpha_{F6P}}{1 + \alpha_{F6P}} \right)^n \quad (2.16)$$

woraus auch hervorgeht, daß:

$$\begin{cases} R = \frac{1}{1+L} \\ T = \frac{L}{1+L} \end{cases} \quad (2.17)$$

Betrachtet man die Gesamtheit aller möglichen Komplexe, so ergibt sich für die Gesamtzahl aller möglichen Bindungsstellen:

$$N'_{F6P} = (n R_1^* + n R_2^* + n R_3^* + \dots) + (n T_1^* + n T_2^* + n T_3^* + \dots) = n \sum_{k=1}^n R_k^* + n \sum_{k=1}^n T_k^* \quad (2.18)$$

Berücksichtigt man noch, daß das Komplex R_1^* bzw. T_1^* maximal 1 Substratmolekül, R_2^* bzw. T_2^* maximal 2 Substratmoleküle usw. aufnehmen können, so ergibt sich für die maximale Anzahl der mit Substrat belegten Bindungsstellen in allen möglichen Komplexen:

$$N''_{F6P} = (1 R_1^* + 2 R_2^* + 3 R_3^* + \dots) + (1 T_1^* + 2 T_2^* + 3 T_3^* + \dots) = \sum_{k=1}^n k R_k^* + \sum_{k=1}^n k T_k^* \quad (2.19)$$

Wird das Enzym mit dem Substrat gesättigt, so läßt sich der Gesamtmolanteil der mit dem Substrat belegten Bindungsstellen, N_{F6P} , wie folgt ausdrücken:

$$N_{F6P} = \frac{N''_{F6P}}{N'_{F6P}} = \frac{\sum_{k=1}^n k R_k^* + \sum_{k=1}^n k T_k^*}{n \sum_{k=1}^n R_k^* + n \sum_{k=1}^n T_k^*} \quad (2.20)$$

N_{F6P} wird als die Sättigungsfunktion bezeichnet. Der Zähler dieses Ausdrucks verdeutlicht, daß eine Bindungsstelle im Zustand T1 bzw. R1, weitere zwei im Zustand T2 bzw. R2 usw. belegt sind. Im Nenner des Ausdrucks wird hingegen die Gesamtanzahl aller Enzym-Substratkomplexe in den Zuständen R und T summiert. Im weiteren Verlauf sollten nun die einzelnen Terme der Sättigungsfunktion untersucht werden.

Der erste Term im Zähler der Sättigungsfunktion läßt sich in Analogie zur Gleichung (2.10) wie folgt ausdrücken:

$$\sum_{k=1}^n k R_k^* = n \alpha_{F6P} R_0^* + n (n-1) \alpha_{F6P}^2 R_0^* + \frac{1}{2} n (n-1) (n-2) \alpha_{F6P}^3 R_0^* + \dots \quad (2.21)$$

bzw.:

$$\sum_{k=1}^n k R_k^* = \alpha_{F6P} n R_0^* \left[1 + (n-1) \alpha_{F6P}^k + \frac{1}{2} (n-1)(n-2) \alpha_{F6P}^k + \dots \right] \quad (2.22)$$

Die linke Seite dieser Gleichung stellt eine binomische Reihe dar und lässt sich vereinfachen:

$$\sum_{k=1}^n k R_k^* = \alpha_{F6P} n R_0^* \sum_{k=0}^n \binom{n-1}{k} k \alpha_{F6P}^k = \alpha_{F6P} n R_0^* [1 + \alpha_{F6P}]^{n-1} \quad (2.23)$$

Entsprechen lässt sich auch der zweite Term im Zähler der Sättigungsfunktion vereinfachen:

$$\sum_{k=1}^n k T_k^* = c \alpha_{F6P} n T_0^* \sum_{k=0}^n \binom{n-1}{k} (c \alpha_{F6P})^k = c \alpha_{F6P} n T_0^* [1 + c \alpha_{F6P}]^{n-1} \quad (2.24)$$

Unter Berücksichtigung der Gleichungen (2.12), (2.13), (2.23) und (2.24) nimmt die Sättigungsfunktion bezüglich F6P die folgende vereinfachte Form an:

$$N_{F6P} = \frac{\sum_{k=1}^n k T_k^* + \sum_{k=1}^n k R_k^*}{n \sum_{k=1}^n T_k^* + n \sum_{k=1}^n R_k^*} = \frac{L_0 c \alpha_{F6P} (1 + c \alpha_{F6P})^{n-1} + \alpha_{F6P} (1 + \alpha_{F6P})^{n-1}}{L_0 (1 + c \alpha_{F6P})^n + (1 + \alpha_{F6P})^n} \quad (2.25)$$

Berücksichtigt man die Anzahl der Protomere bei der PFK1, nämlich $n=8$, so ergibt sich:

$$N_{F6P} = \frac{L_0 c \alpha_{F6P} (1 + c \alpha_{F6P})^7 + \alpha_{F6P} (1 + \alpha_{F6P})^7}{L_0 (1 + c \alpha_{F6P})^8 + (1 + \alpha_{F6P})^8} \quad (2.26)$$

bzw.:

$$N_{F6P} = \frac{L_0 c \alpha_{F6P} (1 + c \alpha_{F6P})^7}{L_0 (1 + c \alpha_{F6P})^8 + (1 + \alpha_{F6P})^8} + \frac{\alpha_{F6P} (1 + \alpha_{F6P})^7}{L_0 (1 + c \alpha_{F6P})^8 + (1 + \alpha_{F6P})^8} \quad (2.27)$$

Berücksichtigt man nun die Definitionen für T und R anhand der Gleichungen (2.14) und (2.15), so erhält man aus der letzten Gleichung:

$$N_{F6P} = \frac{c \alpha_{F6P}}{1 + c \alpha_{F6P}} T + \frac{\alpha_{F6P}}{1 + \alpha_{F6P}} R \quad (2.28)$$

bzw.:

$$N_{F6P} = \frac{c \alpha_{F6P}}{1 + c \alpha_{F6P}} \frac{L}{1 + L} + \frac{\alpha_{F6P}}{1 + \alpha_{F6P}} \frac{1}{1 + L} \quad (2.29)$$

Schließlich erhält man mit der Definition der Michaelis-Menten Terme:

$$M_{F6P,R} = \frac{\alpha_{F6P}}{\alpha_{F6P} + 1} \quad (2.30)$$

und:

$$M_{F6P,T} = \frac{c \alpha_{F6P}}{c\alpha_{F6P} + 1} \quad (2.31)$$

den vereinfachten Ausdruck:

$$N_{F6P} = M_{F6P,R} R + M_{F6P,T} T \quad (2.32)$$

Berücksichtigt man nun entsprechend der Grunddefinition nach MONOD ET AL. (1965) die Annahme, daß die einzelnen T- bzw. R-Komplexe über schnelle Gleichgewichtsreaktionen gebildet werden, so läßt sich die Produktbildungsrate des Enzyms in direkt proportionaler Beziehung zur Sättigungsfunktion ausdrücken (DALZIEL, 1968) (POPOVA UND SEL'KOV, 1976):

$$r_{PFK1} \propto N_{F6P} \quad (2.33)$$

Die Bindung des zweiten Substrats MgATP an das Enzym PFK1, ist nicht allosterisch und befolgt einer einfachen Michaelis-Menten Kinetik. Damit läßt sich die Sättigungsfunktion bezüglich MgATP durch einen einfachen Michaelis-Menten Term darstellen:

$$N_{MgATP} = \frac{\alpha_{MgATP}}{1 + \alpha_{MgATP}} \quad (2.34)$$

wobei gilt:

$$r_{PFK1} \propto N_{MgATP} \quad (2.35)$$

Faßt man Gleichung (2.33) und (2.35) zusammen, so ergibt sich:

$$r_{PFK1} \propto N_{MgATP} N_{F6P} \quad (2.36)$$

Unter Einführung einer Proportionalitätskonstante, nämlich die maximale Rate des Enzyms, ergibt sich daraus:

$$r_{PFK1} = r_{PFK1}^{\max} N_{MgATP} N_{F6P} \quad (2.37)$$

Die sogenannte normierte Reaktionsrate ist dann:

$$\frac{r_{PFK1}}{r_{PFK1}^{\max}} = N_{F6P} N_{ATP} \quad (2.38)$$

2.1.2.2 Der Modellansatz von Freyer (F-Modell)

FREYER (1977) hat anhand zahlreicher *in-vitro* Experimente gezeigt, daß das M-Modell nur begrenzt zur Beschreibung kinetischer Eigenschaften der PFK1 aus *S. cerevisiae* herangezogen werden kann. Es konnte nachgewiesen werden, daß das M-Modell die Allosterie bezüglich F6P nur in Abwesenheit der Effektoren MgATP, ADP und AMP beschreibt. Die PFK1 in *S. cerevisiae* zeichnet sich allerdings gerade dadurch aus, daß die genannten Effektoren die Allosterie entscheidend beeinflussen. Dennoch ist zu betonen, daß die Effektoren weder Einfluß auf das allosterische Grundgleichgewicht noch auf die Anzahl der beteiligten Protomere nehmen.

Vor diesem Hintergrund hat FREYER (1977) das M-Modell durch zusätzliche Annahmen erweitert, welche im folgenden zusammengefaßt werden (s. Abbildung 11):

- Jedes Protomer des oktameren Proteins kann zwei Grundkonformationen R1 bzw. T1 sowie zwei weitere Subkonformationen R2 bzw. T2 annehmen.
- Das Substrat F6P bindet an die Grundkonformationen R1 bzw. T1 mit unterschiedlichen Affinitäten $K_{F6P,T,0}$ bzw. $K_{F6P,R,0}$. Jede dieser Grundkonformationen besitzt eine einzige Bindungsstelle für F6P.
- MgATP bindet als Substrat an allen Konformationszuständen mit der gleichen Affinität $K_{ATP,S}$. Hierzu besitzt jede Konformation eine einzige Bindungsstelle für MgATP als Substrat.
- MgATP bindet als negativer Effektor mit gleicher Affinität $K_{ATP,I}$ an die Zustände R1/T1 bzw. R2/T2. Jede Konformation des Enzyms besitzt eine einzige Bindungsstelle für MgATP als Effektor.
- AMP bindet als positiver Effektor mit der Affinität $K_{AMP,I}$ bzw. $K_{AMP,A}$ an die Konformationszustände R1/T1 bzw. R2/T2.
- ADP bindet als positiver Effektor mit der Affinität $K_{ADP,I}$ bzw. $K_{ADP,A}$ an die Konformationszustände R1/T1 bzw. R2/T2, somit zeigt auch sie keinen Einfluß auf das allosterische Grundgleichgewicht.
- ADP wirkt zusätzlich als kompetitiver Inhibitor bezüglich dem Substrat MgATP.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird das Modell von FREYER (1977) als das F-Modell bezeichnet, wobei es im Schrifttum auch als das Reuter-Modell bekannt geworden ist (REUTER ET AL., 1979).

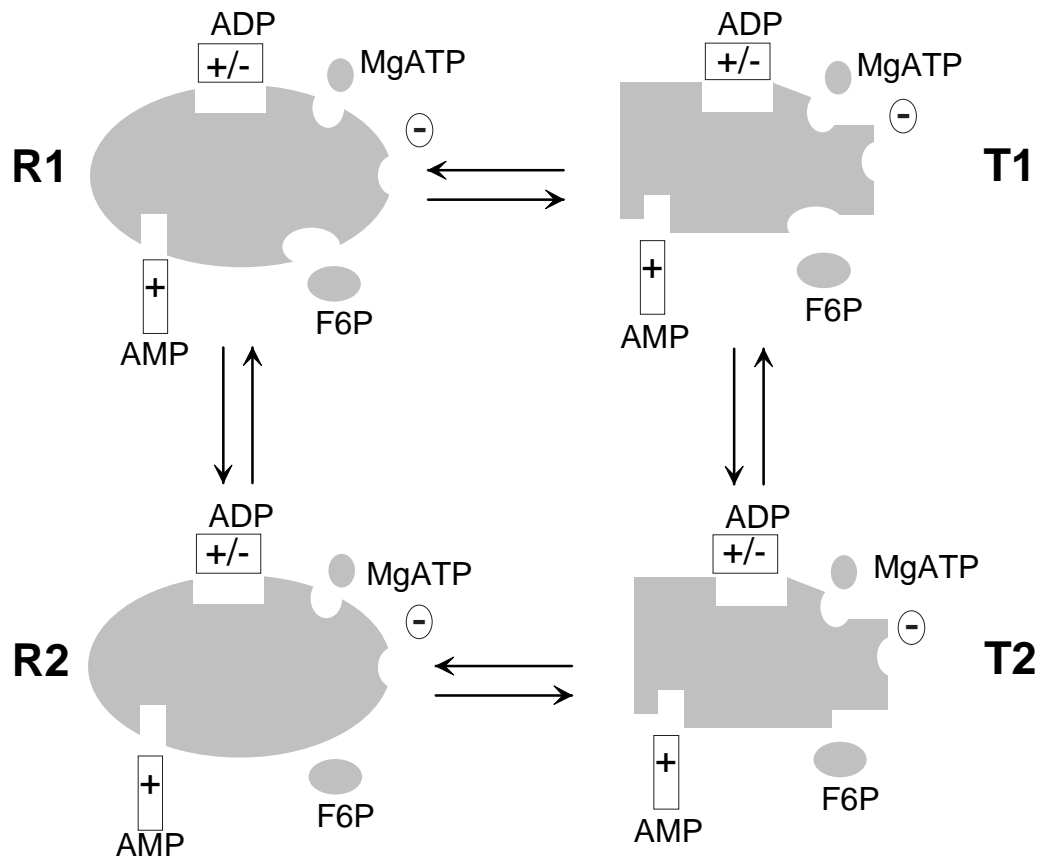


Abbildung 11. Reaktionen eines einzigen Protomers der PFK1 entsprechend dem F-Modell, das positive Zeichen (+) kennzeichnet eine Aktivierung das negative (–) hingegen eine Inhibierung durch den betreffenden Effektor.

FREYER (1977) leitet die Grundgleichungen seines Modells direkt aus den Gleichungen des M-Modells ab. Aus der Aufspaltung der Grundkonformationen R und T (M-Modell) in je zwei Subkonformationen (F-Modell), ergeben sich die Bilanzgleichungen:

$$R = R_1 + R_2 \quad (2.39)$$

und:

$$T = T_1 + T_2 \quad (2.40)$$

wobei gilt:

$$T + R = 1 \quad (2.41)$$

Zur Vereinfachung der Berechnungen werden zusätzlich noch die exklusiven Bindungskoeffizienten herangezogen:

$$\left\{ \begin{array}{l}
 \alpha_{ADP,C} = C_{ADP} K_{ADP,C} \\
 \alpha_{AMP,I} = C_{AMP} K_{AMP,I} \\
 \alpha_{AMP,A} = C_{AMP} K_{AMP,A} \\
 \alpha_{F6P,T} = C_{F6P} K_{F6P,T} \\
 \alpha_{F6P,R} = C_{F6P} K_{F6P,R} \\
 \alpha_{ATP,S} = C_{ATP} K_{ATP,S} \\
 \alpha_{ATP,I} = C_{ATP} K_{ATP,I} \\
 \alpha_{ATP,A} = C_{ATP} K_{ATP,A} \\
 \alpha_{ADP,I} = C_{ADP} K_{ADP,I} \\
 \alpha_{ADP,A} = C_{ADP} K_{ADP,A}
 \end{array} \right. \quad (2.42)$$

Die entsprechenden Parameter des Modells sind in der Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4. Zusammenfassung aller Parameter des F-Modells.

<i>Metabolit</i>	R1	R2	T1	T2
F6P	$K_{F6P,R}$	-	$K_{F6P,T}$	-
MgATP	$K_{ATP,S}$	$K_{ATP,S}$	$K_{ATP,S}$	$K_{ATP,S}$
MgATP	-	$K_{ATP,A}$	-	$K_{ATP,A}$
ADP	$K_{ADP,I}$	$K_{ADP,A}$	$K_{ADP,I}$	$K_{ADP,A}$
AMP	$K_{AMP,I}$	$K_{AMP,A}$	$K_{AMP,I}$	$K_{AMP,A}$
ADP	$K_{ADP,C}$	$K_{ADP,C}$	$K_{ADP,C}$	$K_{ADP,C}$

Zur Berücksichtigung des Beitrags der Effektoren in den Grund- bzw. Subkonformationen, erweitert FREYER (1977) die Definition der Substrataffinitäten aus dem M-Modell ($K_{F6P,R,0}$ bzw. $K_{F6P,T,0}$) (s. Tabelle 2) durch eine sogenannte Effektorfunktion Q :

$$K_{F6P,R} = K_{F6P,R,0} Q \quad (2.43)$$

$$K_{F6P,T} = K_{F6P,T,0} Q \quad (2.44)$$

Für die Effektorfunktion Q wird ein empirischer Ansatz gewählt, der die allgemeine Modulation (Aktivierung bzw. Inhibierung) der Affinität des Enzyms zu seinem Substrat F6P durch die Effektoren AMP, ADP und ATP wiedergeben kann:

$$Q = f_I(C_{AMP}, C_{ADP}, C_{ATP}) \cdot f_A(C_{AMP}, C_{ADP}, C_{ATP}) \quad (2.45)$$

$f_I(C_{AMP}, C_{ADP}, C_{ATP})$ soll zu einer Verbesserung und $f_A(C_{AMP}, C_{ADP}, C_{ATP})$ zu einer Verringerung der Affinität beitragen. Dieser Effekt kann durch einen Michaelis-Menten Ansatz der Form:

$$f_I(C_{AMP}, C_{ADP}, C_{ATP}) = \left(\frac{K_{AMP,I}^{-1}}{K_{AMP,I}^{-1} + C_{AMP}} \right)^{-1} \left(\frac{K_{ADP,I}^{-1}}{K_{ADP,I}^{-1} + C_{ADP}} \right)^{-1} \left(\frac{K_{ATP,I}^{-1}}{K_{ATP,I}^{-1} + C_{ATP}} \right)^{-1} \quad (2.46)$$

$$f_A(C_{AMP}, C_{ADP}, C_{ATP}) = \left(\frac{K_{AMP,A}^{-1}}{K_{AMP,A}^{-1} + C_{AMP}} \right)^{+1} \left(\frac{K_{ADP,A}^{-1}}{K_{ADP,A}^{-1} + C_{ADP}} \right)^{+1} \left(\frac{K_{ATP,A}^{-1}}{K_{ATP,A}^{-1} + C_{ATP}} \right)^{+1} \quad (2.47)$$

bzw.:

$$f_I(C_{AMP}, C_{ADP}, C_{ATP}) = \left(\frac{1}{1 + K_{AMP,I} C_{AMP}} \right)^{-1} \left(\frac{1}{1 + K_{ADP,I} C_{ADP}} \right)^{-1} \left(\frac{1}{1 + K_{ATP,I} C_{ATP}} \right)^{-1} \quad (2.48)$$

$$f_A(C_{AMP}, C_{ADP}, C_{ATP}) = \left(\frac{1}{1 + K_{AMP,A} C_{AMP}} \right)^{+1} \left(\frac{1}{1 + K_{ADP,A} C_{ADP}} \right)^{+1} \left(\frac{1}{1 + K_{ATP,A} C_{ATP}} \right)^{+1} \quad (2.49)$$

ausgedrückt werden. FREYER (1967) führt diese Funktionen in der Form:

$$Q = \frac{Z}{N} \quad (2.50)$$

zusammen mit:

$$Z = (1 + \alpha_{ATP,I}) (1 + \alpha_{ADP,I}) (1 + \alpha_{AMP,I}) \quad (2.51)$$

$$N = (1 + \alpha_{ATP,A}) (1 + \alpha_{ADP,A}) (1 + \alpha_{AMP,A}) \quad (2.52)$$

Die Indizes A bzw. I kennzeichnen die Grundkonformationen R1/T1 (aktivere Konformation) bzw. Subkonformation R2/T2 (inaktivere Konformation). Somit berücksichtigt der Zähler der Effektor-Funktion Q , den Einfluß der Effektoren in der Grundkonformation, hingegen der Nenner den Einfluß der Effektoren in der Subkonformation (ESCHRICH ET AL., 1990).

Für die Allosterie- und Sättigungsfunktion ergeben sich in Analogie zum M-Modell:

$$L = \frac{T}{R} = L_0 \left(\frac{1 + \alpha_{F6P,T}}{1 + \alpha_{F6P,R}} \right)^8 \quad (2.53)$$

bzw.:

$$N_{F6P} = M_{F6P,R} R + M_{F6P,T} T \quad (2.54)$$

Auch die Darstellung der Sättigungsfunktion bezüglich MgATP entspricht, bis auf einen zusätzlichen Term im Nenner, $\alpha_{ADP,C}$, welcher die kompetitive Inhibition des Enzyms durch ADP berücksichtigt, dem M-Modell:

$$N_{ATP} = \frac{\alpha_{ATP,S}}{1.0 + \alpha_{ATP,S} + \alpha_{ADP,C}} \quad (2.55)$$

Auch die Formulierung der normierten Reaktionsrate wird aus dem M-Modell übernommen:

$$\frac{r_{PFK1}}{r_{PFK1}^{\max}} = N_{F6P} N_{ATP} \quad (2.56)$$

mit N_{F6P} aus Gl. (2.32) und N_{ATP} Gl. (2.34).

2.1.2.3 Der Ansatz von Hofmann und Kopperschläger (HK-Modell)

HOFMANN UND KOPPERSCHLÄGER (1982) zeigten anhand des F-Modells, daß unter *in-vitro* Bedingungen die niedrige Affinität des Enzyms zum Substrat F6P in der T1 Konformation gegenüber der hohen Affinität in der R Konformation vernachlässigt werden kann. Vor diesem Hintergrund treffen die Autoren die Annahme, daß:

$$K_{F6P,R,0} \gg K_{F6P,T,0} \quad (2.57)$$

woraus folgt, daß:

$$K_{F6P,R} \gg K_{F6P,T} \quad (2.58)$$

und:

$$\alpha_{F6P,R} \gg \alpha_{F6P,T} \quad (2.59)$$

Aus dieser Annahme läßt sich ableiten, daß:

$$\frac{\alpha_{F6P,T}}{\alpha_{F6P,R}} \approx 0 \quad (2.60)$$

woraus sich für die Allosteriefunktion ergibt:

$$L = \frac{T}{R} = L_0 \left(\frac{1 + \alpha_{F6P,T}}{1 + \alpha_{F6P,R}} \right)^8 = L_0 \left(\frac{\frac{1}{\alpha_{F6P,R}} + \frac{\alpha_{F6P,T}}{\alpha_{F6P,R}}}{\frac{1}{\alpha_{F6P,R}} + 1} \right)^8 = L_0 \left(\frac{1}{1 + \alpha_{F6P,R}} \right)^8 \quad (2.61)$$

Das so entstandene reduzierte Modell wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als das HK-Modell bezeichnet.

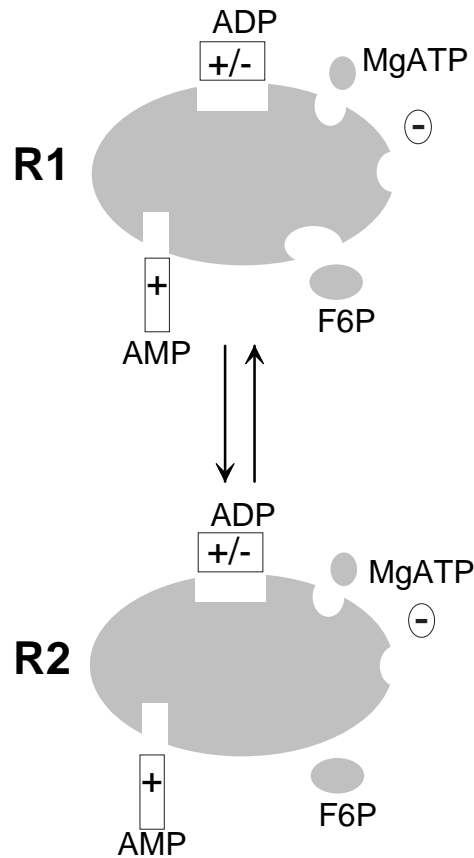


Abbildung 12. Reaktionen eines einzigen Protomers der PFK1 nach dem HK-Modell, das positive Zeichen (+) kennzeichnet eine Aktivierung das negative (-) hingegen eine Inhibierung durch den betreffenden Effektor.

Für die Sättigungsfunktion bezüglich F6P erhält man schließlich:

$$N_{F6P} = M_{F6P,R} R \quad (2.62)$$

Die Sättigungsfunktion bezüglich MgATP entspricht dem F-Modell:

$$N_{ATP} = \frac{\alpha_{ATP,S}}{1.0 + \alpha_{ATP,S} + \alpha_{ADP,C}} \quad (2.63)$$

und die normierte Reaktionsrate des Enzyms läßt sich erneut entsprechend dem M-Modell formulieren:

$$\frac{r_{PFK1}}{r_{PFK1}^{\max}} = N_{F6P} N_{ATP} \quad (2.64)$$

mit N_{F6P} aus Gl. (2.32) und N_{ATP} Gl. (2.34).

2.2 Das PFK2-System

S. cerevisiae besitzt nachweislich zwei verschiedene Typen des Enzyms PFK2, bezeichnet als PFK2-1 bzw. PFK2-2. Diese stellen die Produkte zweier verschiedener Gene, nämlich *PFK26* (YAMASHOJI UND HESS, 1984) (KRETSCHMER ET AL., 1991) bzw. *PFK27* (BOLES ET AL., 1996) (KRETSCHMER UND FRAENKEL, 1991) dar. PFK2-1 und PFK2-2 katalysieren den reversiblen Reaktionsschritt der Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat (F6P) zu Fructose-2,6-bisphosphat (F-2,6-BP) (s. Abbildung 13).

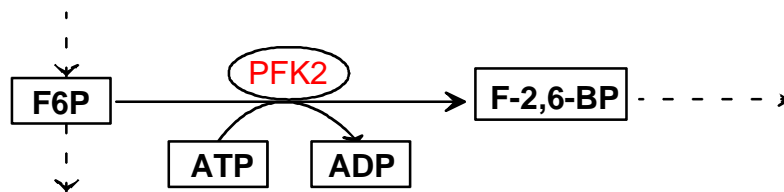


Abbildung 13. Reaktion der PFK2.

Wie bereits von BOLES ET AL. (1996) nachgewiesen, ist die PFK2-2 im Gegensatz zu PFK2-1 nicht-konstitutiv und leistet unter glucoselimitierten Bedingungen entsprechend ihrer niedrigen Aktivität keinen signifikanten Beitrag zur Gesamtreaktion (KRETSCHMER UND FRAENKEL, 1991). Aus diesem Grund wird ihr Beitrag im weiteren Verlauf dieser Arbeit vernachlässigt und nur die PFK2-1 mit der Abkürzung PFK2 gekennzeichnet.

PFK2 wurde erstmals von KRETSCHMER ET AL. (1991) isoliert und gereinigt. Es besteht aus einer einzigen Untereinheit von 93.5 kD (KRETSCHMER ET AL., 1991). Untersuchungen hinsichtlich des Reaktionsmechanismus des Enzyms in *S. cerevisiae* sind nicht bekannt. KITAJAMA ET AL. (1984) legen jedoch für PFK2 aus Leberzellen den möglichen Ansatz eines reversiblen Ordered-Bi-Bi Mechanismus mit Produktinhibierung durch ADP nahe. Entsprechende reaktionskinetische Gleichungen werden allerdings von den Autoren nicht hergeleitet. Grund hierfür liegt offenbar in der Komplexität der Herleitung des betreffenden mathematischen Ansatzes bei der Berücksichtigung der Produktinhibierung.

PFK2 stellt ein Zielprotein (*engl. target protein*) des Proteinkinase-A (PKA) dar (HOLZER, 1989) (s. Abbildung 14). Die dissoziierte katalytische Untereinheit der PKA ist in der Lage die PFK2 zu phosphorylieren und somit in einen aktiveren Zustand zu überführen (FRANCOIS ET AL., 1984). Diese besondere Eigenschaft der PFK2 ermöglicht eine Modulation der Aktivität des Enzyms über cAMP gesteuerte Signaltransduktionskaskaden.

2.2.1 Das glucoseinduzierte cAMP Signal

Die "Glucoseinduzierte transiente Zunahme der intrazellulären cAMP Konzentration" wurde erstmals von VAN DER PLAAT ET AL. (1974) in *S. cerevisiae* entdeckt. Kurz gefaßt wird sie von vielen Autoren auch als das "glucoseinduzierte cAMP Signal" bezeichnet. Das Signal wird durch die extrazelluläre Erhöhung der Glucosekonzentration in einer glucoselimitierten Kultur der Hefe ausgelöst und äußert sich in einer vorübergehenden (*engl. transient*) Erhöhung der

Adenylat-cyclase (Acyclase) Aktivität und einer darauf folgenden Zunahme der cAMP Konzentration (s. Abbildung 14) (MATSUMOTO ET AL., 1982B) (MATSUMOTO ET AL., 1984) (TODA ET AL., 1985) (BROACH ET AL., 1991). Die erhöhte cAMP Konzentration führt zur Aktivierung der PKA, welche ihrerseits für die Modulation verschiedener Zielproteine verantwortlich ist.

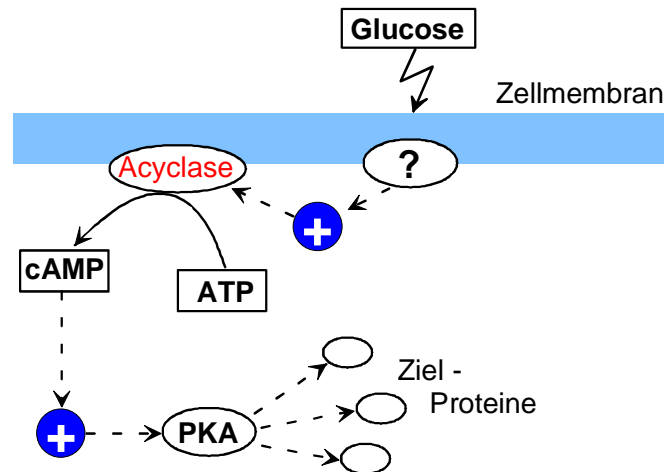


Abbildung 14. Der glucoseinduzierte cAMP Signal.

Da membran-depolarisierende Komponenten, wie die Protonophoren 2,4-Dinitrophenol, zu einem vergleichbar schnellen Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration führen, wurde lange Zeit angenommen, daß auch die glucose-induzierte Aktivierung der Acyclase auf eine vorübergehende Depolarisierung der Plasmamembran zurückzuführen ist. Entsprechend dieser Hypothese (s. Abbildung 15) würde eine Erhöhung der extrazellulären Konzentration der Glucose zu einer Depolarisierung der Plasmamembran führen, welche seinerseits die Aktivierung der Acyclase und die Auslösung des cAMP Signals bewirkt (HOLZER ET AL., 1984) (CASPER ET AL., 1985) (PURWIN ET AL., 1986) (zusammenfassende Darstellung s. THEVELEIN (1994)).

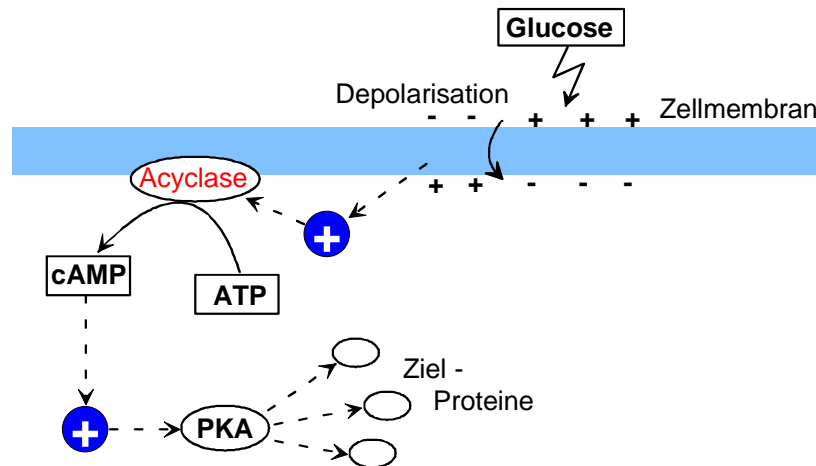


Abbildung 15. Hypothese der glucoseinduzierten Aktivierung der Acyclase durch Depolarisierung der Plasmamembran.

Dennoch zeigten THEVELEIN ET AL. (1987) bald, daß die Wirkung der Protonophoren, nicht auf eine Depolarisierung der Plasmamembran sondern auf eine intrazelluläre Acidifizierung zurückzuführen ist (s. Abbildung 16).

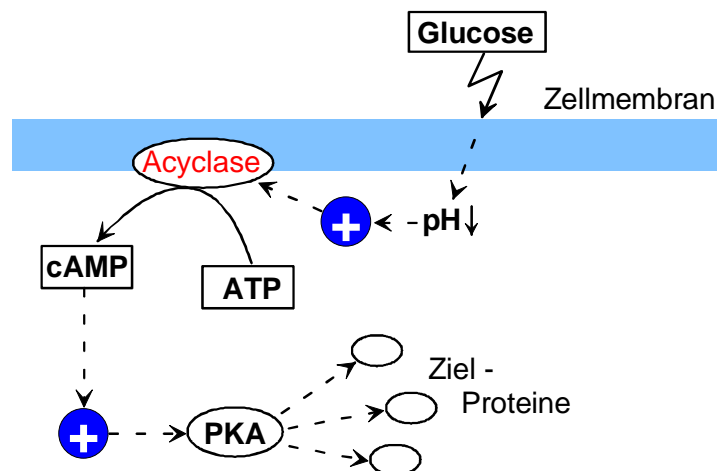


Abbildung 16. Hypothese der glucoseinduzierten Aktivierung der Acyclase durch intrazelluläre Acidifizierung.

In den darauf folgenden Jahren zeigten MBONYI ET AL. (1988), MUNDER ET AL. (1989) und VAN AELST ET AL. (1990 UND 1991) anhand zahlreicher Experimente, daß zwar eine Verstärkung des cAMP Signals durch intrazelluläre Acidifizierung nicht ausgeschlossen werden kann, daß jedoch spezielle Proteine für die Aktivierung der Acyclase verantwortlich sind (s. Abbildung 17), nämlich:

- Proteine der sogenannten Ras-Familie
- Das Produkt des Gens *Cdc25*

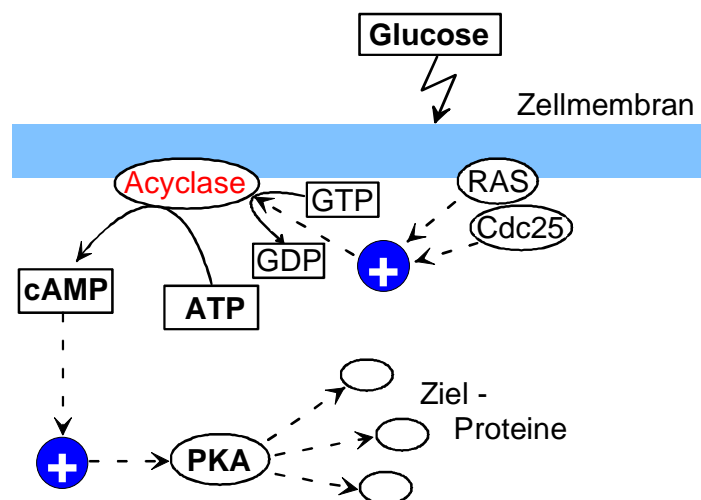


Abbildung 17. Mechanismus des glucoseinduzierten cAMP Signals über die Produkte der Gene *RAS1*, *RAS2* und *Cdc25*.

Die beteiligten Ras-Proteine sind Produkte der Gene *RAS1* und *RAS2*. Sie wirken als sogenannte G-Proteine der Acylase (s. Abbildung 17) (DE FEO JONES ET AL., 1983) (DHAR ET AL. 1984) (POWERS ET AL., 1984) (BROEK ET AL., 1985) (TODA ET AL., 1985) (MBONYI ET AL., 1988) (MUNDER ET AL., 1989) (VAN ALEST ET AL., 1991) (BROACH ET AL., 1991A) (BROACH ET AL., 1991). Die Abkürzung G-Protein bezieht sich auf die Eigenschaft solcher Proteine durch Umsetzung vom energiereichen GTP in GDP weitere Signalproteine zu phosphorylieren und damit in einen aktiven Zustand zu überführen.

Entsprechend dieser Eigenschaft, werden die Produkte der Gene *RAS1* und *RAS2* durch das Produkt des Gens *Cdc25* aktiviert (CAMONIS ET AL., 1986) und können in der aktiven Form unter Umsatz von GTP in GDP, die Acylase phosphorylieren, wobei die phosphorylierte Form die aktive Form darstellt. GOLDBERG ET AL. (1994) haben schließlich in einer ausführlichen Studie die Bildung eines speziellen Ras-GTP-Cyclase Komplexes nachgewiesen, welches bei der Übertragung des Glucosesignals auf die Acylase eine entscheidende Rolle spielt. In einer umfassenden Studie zweifeln COLOMBO ET AL. (1998) die Rolle der Ras-Proteine und des Produkts des Gens *Cdc25* bei der Übertragung des glucoseinduzierten Signals an. Entsprechend ihren Untersuchungen ist das sogenannte Gpa2 Protein (auch ein G-Protein) für die Übertragung des Signals auf die Acylase verantwortlich. Der genaue molekulare Mechanismus dieser Übertragung bleibt dennoch derzeit ungeklärt.

Wie in der Abbildung 18 dargestellt, wird cAMP cytoplasmatisch von zwei verschiedenen Phosphodiesterasen (PDE), nämlich Produkte der Gene *PDE1* und *PDE2*, zu AMP degradiert (SASS ET AL., 1986) (NIKAWA ET AL., 1987). MBONYI ET AL. (1990) haben gezeigt, daß die transiente Natur des cAMP Signals nicht alleine durch eine anhaltende Grundaktivität der PDE begründet werden kann. Vielmehr konnte gezeigt werden, daß ein spezieller negativer Feed-back Mechanismus der PKA für den Rückfall der intrazellulären cAMP Konzentration verantwortlich ist (s. Abbildung 18). Die aktive PKA katalysiert nämlich die Phosphorylierung der PDE und bewirkt somit eine Erhöhung ihrer maximalen Aktivität. Damit wird im Anschluß an eine glucoseinduzierten Zunahme der intrazellulären cAMP

Konzentration ein erhöhter cAMP Abbau ausgelöst, welches eine Rückkehr zum Ausgangszustand des cAMP Grundlevels gewährleistet.

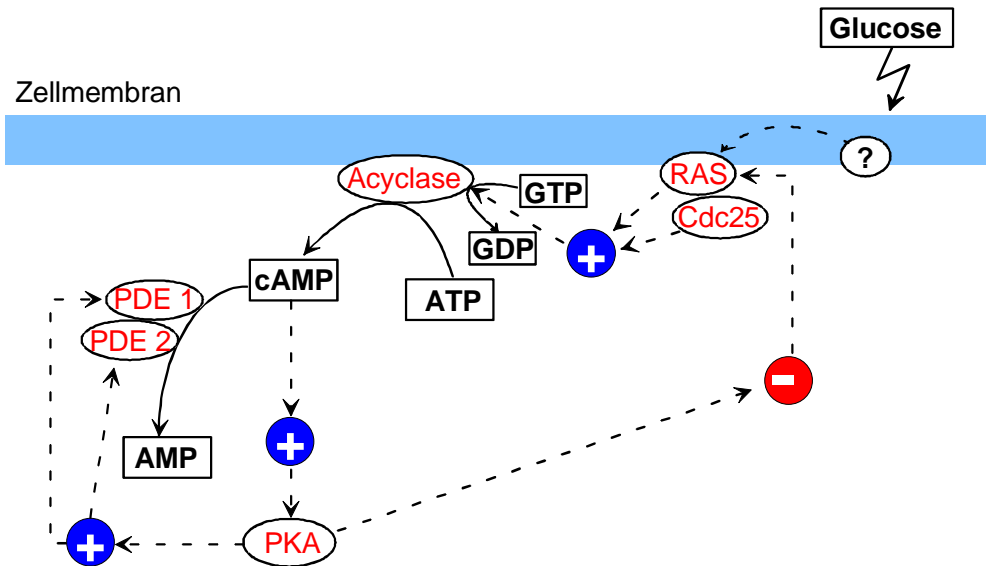


Abbildung 18. Mechanismus des glucoseinduzierten cAMP Signals unter Berücksichtigung der cAMP Degradation und des negativen Feed-backs auf die Acyclase.

2.2.2 Der Signaltransduktionsweg cAMP/PKA/PFK2

Ein Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration führt nachweislich zu einer Aktivierung der PKA (HIXSON UND KREBS, 1980) (MATSUMOTO ET AL., 1982B) (WINGENDER-DRISSEN, 1983) (CANNON ET AL., 1987) (TODA ET AL., 1987A) (TODA ET AL., 1987B). In seiner inaktiven Form stellt die PKA entsprechend Abbildung 19 ein Tetramer zweier Untereinheiten dar, nämlich einer katalytischen (C-PKA) und einer regulatorischen (R-PKA) (EDELMAN ET AL., 1987) (WERNER-WASHBURNE ET AL., 1991) (TAYLOR ET AL., 1990).

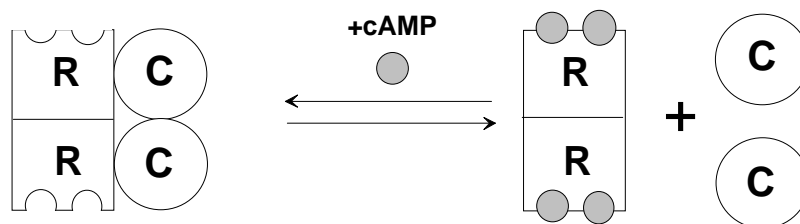


Abbildung 19. Mechanismus der Aktivierung der PKA durch cAMP.

C-PKA wird von drei redundanten Genen *TPK1*, *TPK2* und *TPK3* (TODA ET AL., 1987A) (CANNON ET AL., 1987) kodiert, R-PKA hingegen von einem einzigen Gen nämlich *BCY1/SRA1* (TODA ET AL., 1987B) (CANNON ET AL., 1987). Zwei Moleküle cAMP binden reversibel an eine regulatorische Untereinheit der PKA und bewirken die Dissoziation der zwei katalytischen Untereinheiten (s. Abbildung 19). Diese freien katalytischen Untereinheiten stellen ihrerseits die aktive Form der PKA dar. Die aktive PKA ist in der Lage die Phosphorylierung einer Vielzahl von Proteinen bzw. Enzymen zu katalysieren (HOLZER,

1989). Zu diesen Enzymen zählt auch wie bereits erwähnt die PFK2 (s. Abbildung 20) (TRIPP ET AL., 1986) (BROACH ET AL., 1990) (BROACH ET AL., 1991). Die Phosphorylierung der PFK2 entspricht zugleich einer Aktivierung des Enzyms (FRANCOIS ET AL., 1984).

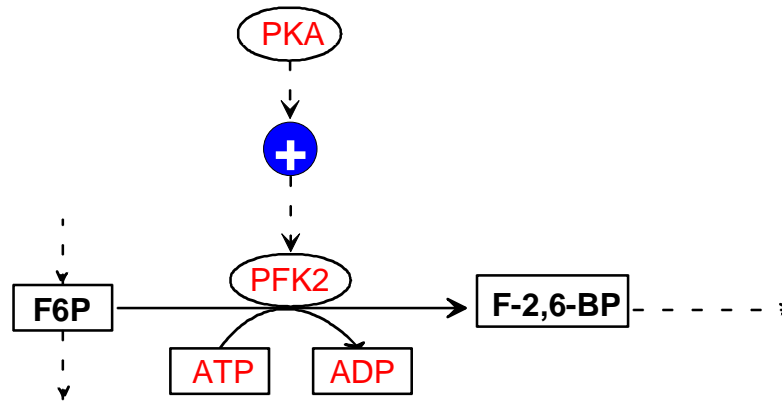


Abbildung 20. Reaktion der PFK2 und ihre Aktivierung durch PKA.

Während die Aktivierung der PFK2 auf eine Phosphorylierung des Enzyms durch PKA zurückgeführt wird, erfolgt die Desaktivierung der PFK2 über entsprechende Dephosphorylierungsreaktionen (s. Abbildung 21). *S. cerevisiae* verfügt über eine Vielzahl von Proteinphosphatasen, welche für die Dephosphorylierung von Proteinen verantwortlich sind. COHEN und COHEN (1990) konnten bereits vier verschiedene Proteinphosphatasen in *S. cerevisiae* identifizieren, diese sind die Produkte der Gene *PP1*, *PP2A*, *PP2B* und *PP2C*. Die genaue Funktion bzw. reaktionskinetischer Mechanismus der einzelnen Proteinphosphatasen, welche zur Dephosphorylierung der aktiven PFK2 beitragen, ist derzeit noch nicht geklärt.

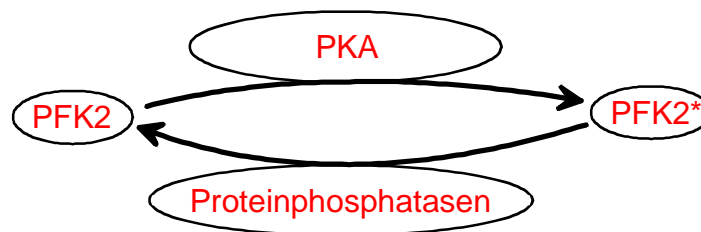


Abbildung 21. Aktivierung und Desaktivierung der PFK2. (*) kennzeichnet die aktive Form.

Betrachtet man nun die kinetischen Eigenschaften des PFK1 und PFK2 unter Berücksichtigung des Einflusses der umgebenden Effektoren, so lässt sich entsprechend Abbildung 22 ein ganzheitliches Bild der Regulationsvorgänge erstellen. Die Konzentration der Glucose und darauf folgend des cAMP lösen sukzessiv die Aktivierung der PKA, PFK2 und schließlich der PFK1 aus. Zugleich unterliegt die PFK1 dem Einfluß der Adenylate. Eine quantitative Beschreibung dieser Zusammenhänge wurde bislang noch nicht vorgenommen und stellt den Gegenstand dieser Arbeit dar.

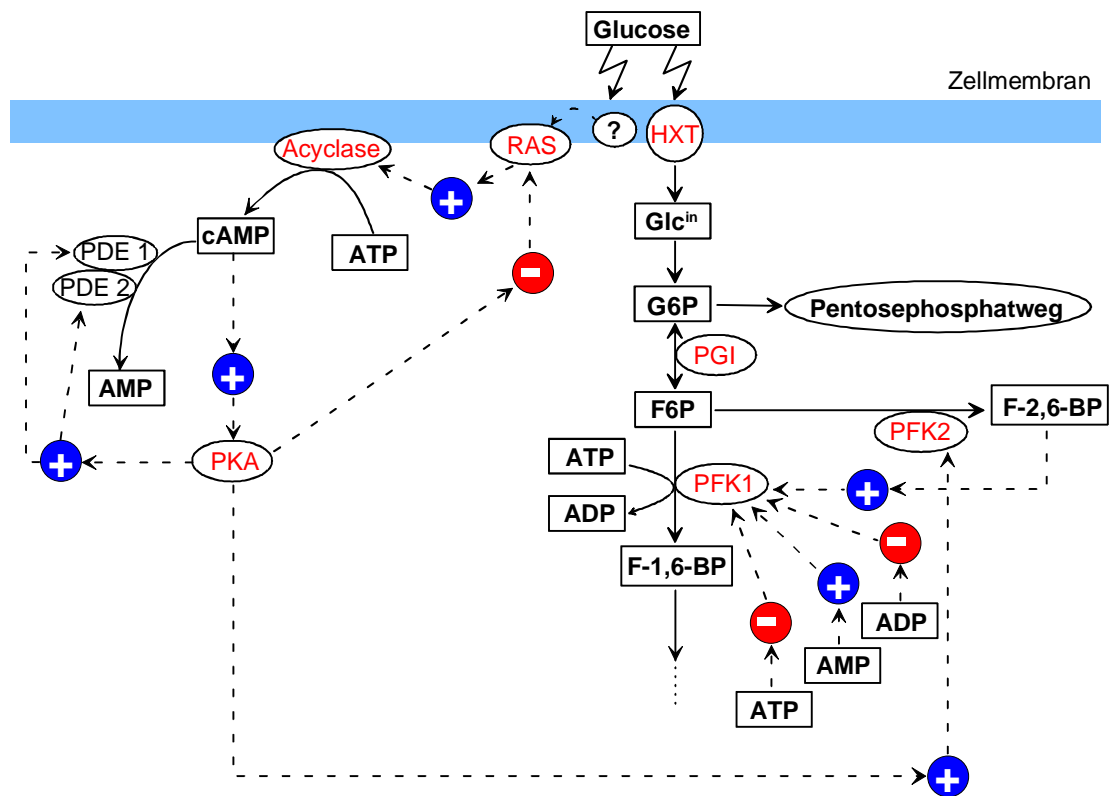


Abbildung 22. Ganzheitliches Bild der Regulationsvorgänge im PFK-System.

3 Material und Methoden

3.1 Mikroorganismus

Die Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem Stamm CBS 7336 (entspricht ATCC 32167) *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt.

3.2 Nährmedien

Zur Züchtung der Kulturen wurde ein synthetisches Nährmedium verwendet. Die Zusammensetzung der in Tabelle 5 gezeigten Nährmediums wurde für eine Biomassekonzentration von 15 gTS/l unter Berücksichtigung der Elementarzusammensetzung der Hefe (RIEGER ET AL., 1983) und einen Zellsubstratausbeutekoeffizienten von $Y_{X/S} = 0.5$ gTS/gGlucose abgeschätzt. Die Salze wurden durch Zugabe einer Spurenelement- und Wachstoffsflösung (s. Tabelle 6 und Tabelle 7) ergänzt. Als limitierende Kohlenstoff- und Energiequelle diente Glucose (s. Tabelle 8).

Tabelle 5. Konzentrationen der Salze im Nährmedium.

<i>Salz</i>	<i>Konzentration g/l</i>
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	8.75
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1.0
KCl	1.1
$\text{CaCl}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.15

Tabelle 6. Konzentrationen der Spurenelemente im Nährmedium.

<i>Spurenelement</i>	<i>Konzentration mg/l</i>
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	15.0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10.6
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	9.0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	2.4

Tabelle 7. Konzentrationen der Wachstoffsstoffe im Nährmedium.

<i>Wachstoffsstoff</i>	<i>Konzentration mg/l</i>
Myo-Inosit	60.3
Ca-Panthotenat	30.0
Thiamin HCl (Vitamin B1)	6.0
Pyridoxin HCl	1.5
Biotin (Vitamin H)	0.03

Tabelle 8. Konzentrationen der Glucose für die verschiedenen Kulturen.

<i>Kultur</i>	<i>Konzentration g/l</i>
Schüttelkolben Batch-Kultur	20.0
Zulaufmedium der kontinuierlichen Kultur	30.0
Zulaufmedium der Fed-batch-Kultur	60.0

3.3 Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in der Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9. Liste der verwendeten Chemikalien.

<i>Substanz</i>		<i>Hersteller</i>
Adenosin-diphosphat	ADP	Boehringer
Adenosin-monophosphat	AMP	Boehringer
Adenosin-triphosphat	ATP	Boehringer
Agar	-	Difco
Aldolase (Kaninchenmuskel)	-	Boehringer
Alkohol-dehydrogenase (Hefe)	-	Boehringer
Ammoniumsulfat	NH ₄ SO ₄	Fluka
Calciumchlorid	CaCl ₂	Fluka
Calcium-D-panthotenat	C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	Fluka
D-Biotin	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	Merck
Di-Ammonium-hydrogenphosphat	(NH ₄) ₂ HPO ₄	Fluka
Di-Kalium-hydrogenphosphat	K ₂ HPO ₄	Fluka
EGTA	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ Na ₄ O ₈	Fluka
Eisenchlorid	FeCl ₃	Fluka
Ethanol	C ₂ H ₆ O	Handel-Müller
Fructose-1,6-bisphosphat	C ₆ H ₁₁ O ₁₂ P ₂ Na ₃	Boehringer
Fructose-2,6-bisphosphat	F-2,6-BP	Sigma
Fructose-6-phosphat	F6P	Boehringer
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	Fluka
Glucose-6-phosphat	G6P	Boehringer
Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (Hefe)	-	Boehringer
Glycerol-3-phosphat-dehydrogenase (Kaninchenmuskel)	-	Boehringer
Glycerol-dehydrogenase	-	Boehringer
Hefe-Extrakt	-	Difco
Imidazol	C ₃ H ₄ N ₂	Boehringer
Kaliumchlorid	KCl	Fluka
Kalium-dihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Fluka
Kaliumhydroxid	KOH	Fluka
Kupfersulfat	CuSO ₄	Merck
Magnesiumacetat	C ₄ H ₆ MgO 4H ₂ O	Fluka
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	Fluka
Magnesiumsulfat	MgSO ₄	Fluka
Mangansulfat	MnSO ₄	Merck
MES	C ₆ H ₁₃ NO ₄ S	Fluka
Methanol	CH ₃ OH	Roth
Myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	Fluka
NAD	C ₂₁ H ₂₇ N ₇ O ₁₄ P ₂	Boehringer

<i>Substanz</i>		<i>Hersteller</i>
NADH	$C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2Na_2$	Boehringer
NADP	$C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_2$	Boehringer
NADPH	$C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_4$	Boehringer
Natriumcarbonat	Na_2CO_3	Merck
Natriumchlorid	NaCl	Fluka
Pepton aus Casein	-	Roth
Perchlorsäure	$HClO_4$	Fluka
Pyridoxin HCl	$C_{18}H_{11}NO_3 HCl$	Fluka
Pyrophosphatabhängige PFK (Kartoffelknolle)	-	Sigma
Quecksilberchlorid	$HgCl_2$	Fluka
Tetrapotassiumpyrophosphat	$P_2O_7K_4$	Sigma
Thiamin HCl	$C_{12}H_{17}ClN_4OS HCl$	Fluka
Triose-isomerase (Kaninchenmuskel)	-	Boehringer
Tris HCl	$C_4H_{11}NO_3 HCl$	Roth
Zinkchlorid	$ZnCl_2$	Merck
Zinksulfat	$ZnSO_4$	Merck

3.4 Versuchsanlage

Die Fermentation wurde in einem belüfteten Rührkesselbioreaktor des Typs KLF 2000 (Bioengineering, Wald, Schweiz) mit einem Gesamtvolumen von 3.7 l (Reaktionsvolumen $V_R=1.5$ l) durchgeführt. Die Fermentationsanlage war mit Meß- und Regeleinrichtungen für Temperatur, pH, Drehzahl, Gelöstsauerstoff und Gasvolumenstrom ausgestattet. In der Abbildung 23 ist der prinzipielle Aufbau der Fermentations-Anlage dargestellt.

Darüber hinaus besitzt die Anlage eine präzise Wäge-Einrichtung (Genauigkeit ± 4 g) dessen Ausgangssignal für die Ansteuerung der Erntepumpe am Fermenterablauf diente. Der Zulauf von Nährmedium erfolgte kontinuierlich über eine Schlauchpumpe Typ 101U (Watson-Marlow, Falmouth, England). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß im Chemostatbetrieb bei einer vorgegebenen Verdünnungsrate die Reaktionsmasse konstant gehalten werden kann, damit bleibt das Reaktionsvolumen unabhängig vom spezifischen Gasgehalt in der Gas/Flüssigkeitsdispersion.

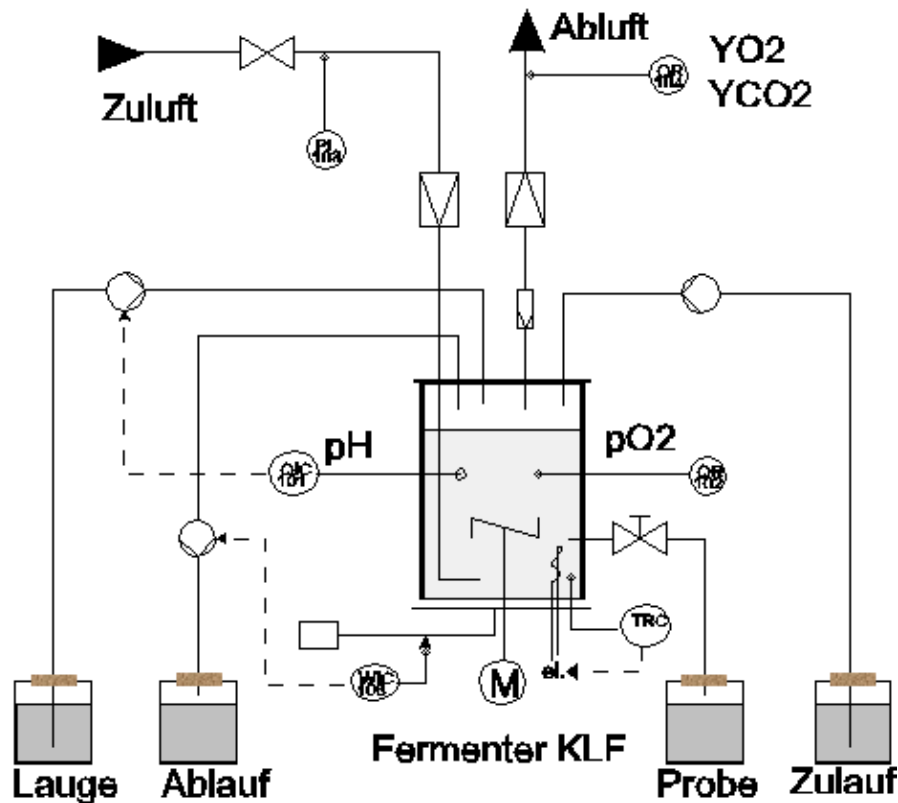


Abbildung 23. Aufbau der Fermentationsanlage.

3.5 Züchtungsbedingungen und Prozeßführung

Ausgehend von Schrägagarröhrchen (s. Tabelle 10) wurde für die Vorkultur je eine Impföse mit Hefe als Inokulum in einem 1 l Erlenmeyerkolben von 200 ml Nährmedium überführt. Darauf folgte eine 48-stündige Inkubation bei einer Schüttelfrequenz von 150 U/min (Schüttelmaschine Typ HAT, Infors, Bottmingen, Schweiz) und 30°C.

Tabelle 10. Zusammensetzung des Agars (pH 5.0).

Substanz	Konzentration g/l
Glucose	50.0
Pepton	8.0
Hefe-Extrakt	2.0
KH ₂ PO ₄	2.0
MgSO ₄ · H ₂ O	1.0
Agar	20.0

Zum Beimpfen des Fermenters wurden 5 Schüttelkolben der Vorkultur entsprechend dem letzten Abschnitt vorbereitet. Die Kultur wurde mit einer Startkonzentration der Biomasse von 2 gTS/l in einem Zulaufverfahren (*engl. Fed-batch*) auf eine Biomassekonzentration von 15 gTS/l gezüchtet. Die Zufütterung des Nährmediums wurde durch kontinuierliche Messung des Respirationsquotienten via Abgasanalyse und einem Prozeßrechner geregelt um eine Ethanolproduktion zu umgehen (INDLEKHOFER, 1989).

Nach Ablauf des Zulaufverfahrens wurde auf kontinuierliche Betriebsweise umgeschaltet. Hierzu wurde die Substratvorlage gewechselt und die mit der Fermenterwage gekoppelte Erntepumpe eingeschaltet. Alle Experimente wurden nach dem Erreichen des stationären Zustands durchgeführt. Um eine starke Schaumbildung vorzubeugen, wurde jede 24 h ein Volumen von 100 μl des Antischaummittels Contraspum 210 (Schimmer & Schwarz, Lahnstein) zugesetzt. Die Prozeßbedingungen sind in der Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tabelle 11. Versuchsbedingungen der aeroben kontinuierlichen Kultur.

<i>Parameter</i>	
Arbeitsvolumen	1.5 l
Verdünnungsrate	0.1 h^{-1}
Temperatur	30°C
pH-Wert	5.0
Gasvolumenstrom	1.5 vvm
Drehzahl	1200 Upm
Zahl der Rührer	2
Volumenbezogener Leistungseintrag	45 kW/m^3

3.6 Pulsartige Zugabe der Glucose

Die Zugabe der Glucose erfolgte nach THEOBALD (1995) in einem Puls. Hierbei wurden 3 ml einer 50% (w/v) Glucoselösung mit einer Spritze (Becton Dickinson, Heidelberg) durch ein Silikonseptum am Fermenterdeckel unter sterilen Bedingungen pulsartig in den Fermenter eingespritzt. Somit ergab sich unmittelbar nach erfolgter Injektion im Fermenter eine Substratkonzentration von 1.0 g/l. Die stationäre Konzentration der Glucose in der kontinuierlichen Kultur lag hingegen bei 30 mg/l. Der gesamte Vorgang des Einspritzens dauerte 1.0 ± 0.3 Sekunden. In der Abbildung 24 ist der Ablauf der gesamten Prozedur schematisch dargestellt.

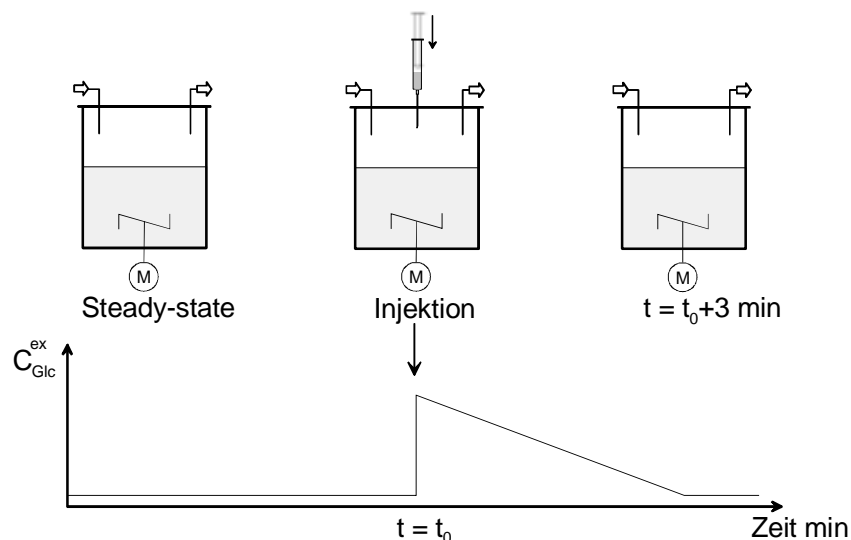


Abbildung 24. Schema des Glucosepuls-Experiments.

3.6.1 Probenahme

Um die Verweilzeit der Fluidelemente in der Probenahmeverrichtung bis zum Zeitpunkt des Abstoppen des Metabolismus (*engl. quenching*) im Probenahmeröhrchen zu minimieren, wurde eine Probenahmetechnik entsprechend THEOBALD ET AL. (1993) zum Einsatz gebracht. Eine Vorrichtung (s. Abbildung 25) ermöglicht, daß ein Flüssigkeitsvolumen aus der Rührzone des Fermenters innerhalb von 150 Millisekunden in das Innere der Probenröhrchen gelangt. Das gesamte Totvolumen in der Vorrichtung beträgt 230 µl. Der Aufbau der Probenahmeverrichtung ist in der Schnittzeichnung Abbildung 25 dargestellt.

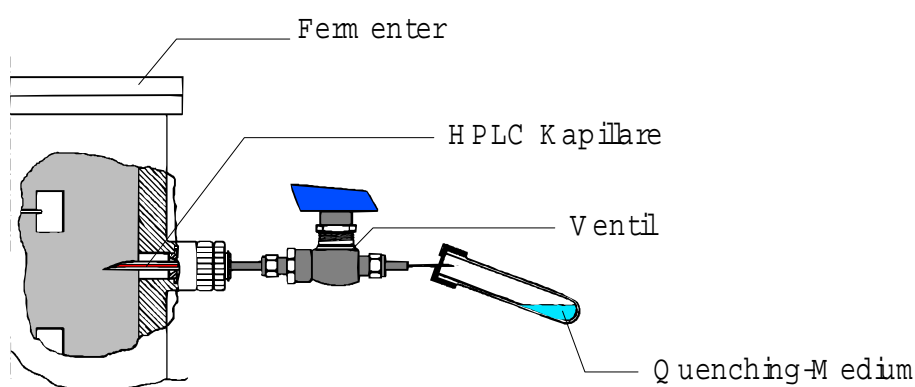


Abbildung 25. Die Probenahmeverrichtung im Anschluß an den Fermenter (THEOBALD ET AL. 1993).

3.6.2 Desaktivierung und Extraktion

Zur Desaktivierung und Extraktion wurden je nach dem zu bestimmenden Metaboliten verschiedene Methoden herangezogen. Einen Gesamtüberblick hierzu liefert das Fließdiagramm in der Abbildung 26.

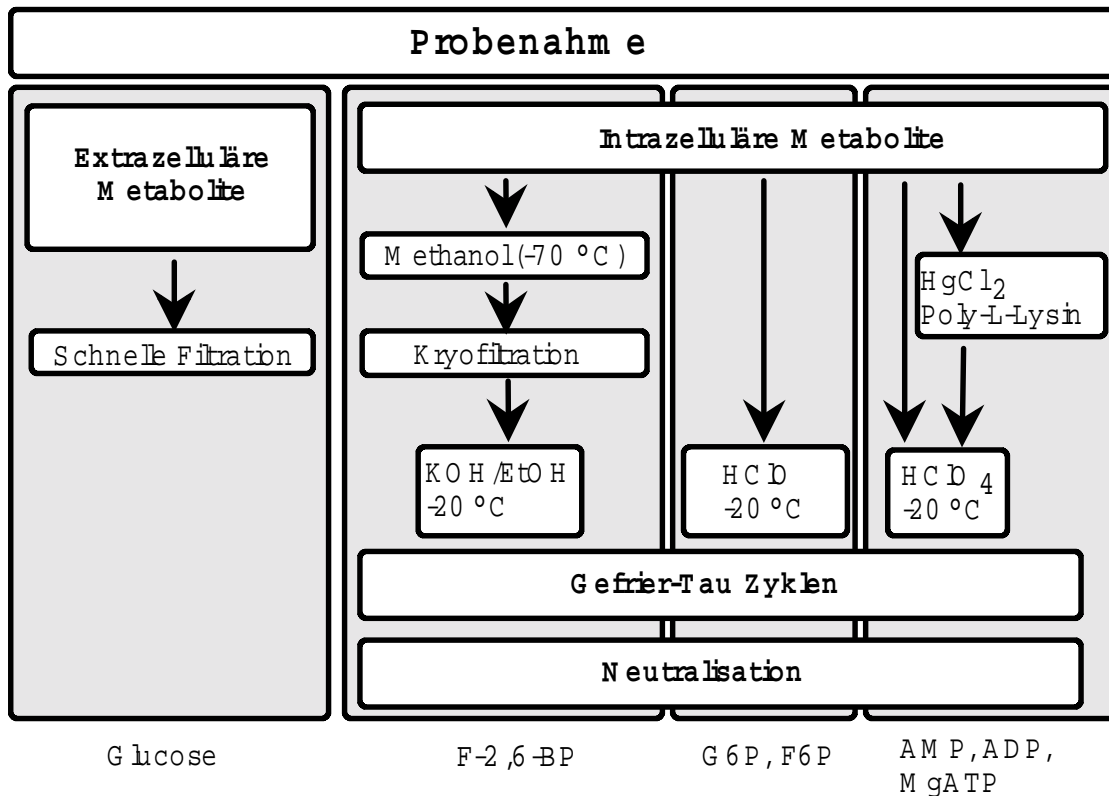


Abbildung 26. Quenching und Extraktion zur Bestimmung einzelner Metabolite.

Im folgenden werden die einzelnen Methoden näher beschrieben.

3.6.2.1 Quenching zur Messung der extrazellulären Konzentrationen von Glucose und Ethanol

Zur Bestimmung der extrazellulären Glucose und Ethanol, wurde die Probe entsprechend Abbildung 27 mittels einer Spritze (10 ml) direkt am Probenahmeventil entnommen. Die Spritze wurde mit 15 Edelstahlkugeln ($\varnothing 4$ mm) beladen und bereits vor der Probenahme auf -20°C herab gekühlt.

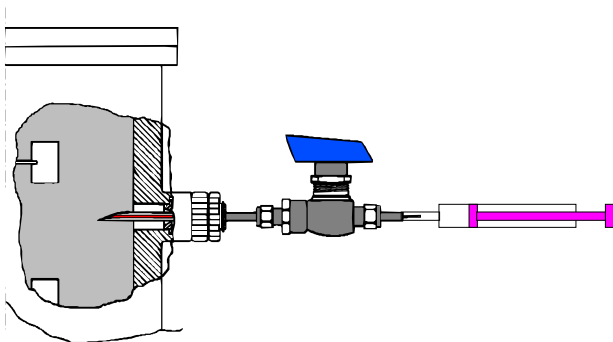


Abbildung 27. Probenahme zur Bestimmung extrazellulärer Glucose und Ethanol.

Die Proben wurden unmittelbar nach dem Schließen des Ventils mittels Membranfiltration (0.45 µm, Schleicher / Schüll, Dassel) von der Biomasse getrennt. Das Filtrat wurde für die weitere Messungen auf Eis bewahrt (THEOBALD, 1995).

3.6.2.2 Quenching und Extraktion für die intrazellulären Konzentrationen von G6P, F6P und F-1,6-BP

Die Gesamtprozedur der Desaktivierung und Extraktion der Proben zur Bestimmung der Metabolite G6P und F6P entspricht dem von THEOBALD (1995) beschriebenen Ablaufplan.

Hierzu wurden die Probenahmeröhrchen mit 15 Edelstahlkugeln und 1 ml Perchlorsäure 35 % (w/v) gefüllt, mit Silikonsepten (3mm dick, 60 Shore, Fähnle, Stuttgart) versehen und mit Lochkappen (Ochs, Bovenden) verschlossen. Anschließend wurden die vorbereitete Röhrchen gewogen, im Kryostaten (Kälte Thermostat F3-K, Haake, Karlsruhe) auf -20°C temperiert und bei derselben Temperatur mittels einer Vakuumpumpe (RZ2, Vacuubrand, Wertheim) für 5 min auf 8 mbar evakuiert. Sämtliche Proben wurden nach der Probenahme mit Hilfe eines Vortex-Schüttelgerätes (VF2, Jahnke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen) für eine Sekunde homogenisiert, daraufhin im Kryostaten auf -20°C temperiert und bei derselben Temperatur für die weitere Extraktion aufbewahrt.

Im ersten Schritt der Extraktion wurden die Zellen über 3 Gefrier-Tau-Zyklen zwischen -20°C und 0°C aufgeschlossen. Im nachfolgenden Schritt der Neutralisation, mußte besonders beachtet werden, daß der pH-Wert von 7.5 ± 0.5 exakt eingehalten wurde, um die Stabilität der Metabolite zu gewährleisten.

Zur Neutralisation der Proben wurde eine Lösung aus 2N KOH und 0.4 M Imidazol verwendet. Diese Lösung wurde in Aliquots von 20 µl in die $0-4^{\circ}\text{C}$ temperierte und gerührte Probe gegeben. Im Anschluß an die Neutralisation der Proben erfolgte die sofortige Abtrennung der Zellfragmente vom Extrakt durch Membranfiltration (0.45 µm, Schleicher & Schütt, Dassel) bei $0-4^{\circ}\text{C}$. Schließlich erfolgte die quantitative Bestimmung der Metabolite im Filtrat.

3.6.2.3 Quenching und Extraktion für die cytoplasmatische Konzentration von Adenylaten

Auch die Prozedur zur Desaktivierung und Extraktion der Proben für die Bestimmung der cytoplasmatischen Adenylate entspricht dem von THEOBALD (1995) beschriebenen Ablaufplan.

Hierbei wurden die Probenahmeröhrchen jeweils mit einem Inhalt von 50 mg HgCl_2 vorbereitet. Zur vollständigen Zerstörung der Zellmembran wurde das Polykation Poly-L-Lysin in einer Konzentration von 2 mg/ml eingesetzt (DE NOBLE ET AL., 1990). Die sogenannte differentielle Extraktion erfolgte bei Raumtemperatur für 150 Minuten lang durch mehrmaliges Homogenisieren der Probe auf einem Vortex-Schüttelgerät. Vor der quantitativen Bestimmung der Konzentration der Adenylate in den Proben wurde die Zellmasse über einen Membranfilter (0.45 µm, Schleicher & Schütt, Dassel) bei $0-4^{\circ}\text{C}$ abfiltriert.

3.6.2.4 Quenching und Extraktion für die intrazelluläre Konzentration von F-2,6-BP

Der Assay zur Bestimmung von F-2,6-BP erweist sich als besonders empfindlich gegenüber hohen Salzkonzentrationen des extrazellulären Fermentationsmediums. Daher ist es zur Messung der intrazellulären Konzentration F-2,6-BP notwendig, vor der Extraktion die Zellen vom extrazellulären Medium zu trennen. Es bedarf jedoch einer Trennmethode, welche bei tiefen Temperaturen durchgeführt werden kann, um eine Aktivierung des Metabolismus zu vermeiden.

Zur Bestimmung von F-2,6-BP wurden die Probenahmeröhrchen mit 2 ml Methanol (100%) und 15 Edelstahlkugeln gefüllt, danach mit Silikonsepten (3 mm dick, 60 Shore, Föhnle, Stuttgart) versehen und mit Lochkappen (Ochs, Bovenden) verschlossen. Anschließend wurden die vorbereiteten Röhrchen gewogen, 10 min lang vor der Probenahme in einem mit Trockeneis gesättigten Methanolbad bei -70°C temperiert und bei derselben Temperatur mittels einer Vakuumpumpe (RZ2, Vacuubrand, Wertheim) für 5 min auf 8 mbar evakuiert. Nach der Probenahme wurden die Proben mit Hilfe eines Vortex-Schüttelgeräts für eine Sekunde homogenisiert, im Kryostaten auf -20°C temperiert und für die weitere Aufarbeitung aufbewahrt.

Zur nachfolgenden Kryofiltration wurde eine Vakuumfiltrationseinheit verwendet. Diese bestand aus einer Nutscheinheit (45 μ Supor, Schott/Duran & Gelman Sciences) gekoppelt an eine Vakuumpumpe (RZ2, Vacuubrand, Wertheim). Vor der Filtration der einzelnen Proben wurde der Filter mit trockenis-gesättigtem Methanol auf -70°C herab gekühlt. Zur Filtration wurde abwechselnd 1 ml Probe und 1 ml Methanol (-70°C) auf dem Filter gegeben um sowohl die Temperatur der Filtrationseinheit auf -70°C konstant zu halten als auch die Zellen nachzuwaschen. Die Kryofiltration dauert je Probe maximal 15 Sekunden. Die Filter wurden direkt nach der Kryofiltration in vorgekühlten Röhrchen mit dem Inhalt von 1 ml KOH 2 N (in Ethanol, -20°C) und 15 Stahlkugeln eingetaucht und mit Hilfe eines Vortex-Schüttelgeräts für 2 Sekunden homogenisiert. Darauf folgten zum Aufschluß der Zellen 3 Gefrier-Tau-Zyklen zwischen -20 und 0°C .

Zur Neutralisation wurden Aliquots von 20 μl HCl/Imidazol (1 M/M) in die $0-4^{\circ}\text{C}$ temperierte und gerührte Probe gegeben.

Im Anschluß an die Neutralisation der Proben erfolgte die sofortige Abtrennung der Zellfragmente durch Membranfiltration (0.45 μm , Schleicher & Schütt, Dassel) bei $0-4^{\circ}\text{C}$.

3.7 Methoden zur Untersuchung der Desaktivierung

3.7.1 Methode zur Untersuchung der Dynamik des Kühlvorgangs

Sprüht man 30°C warme Zellsuspension in -20°C kalte Perchlorsäure 35% (w/v) bzw. -70°C kaltes Methanol, so stellt sich eine zeitabhängige Mischtemperatur ein, deren Verlauf für das Abstoppen des Metabolismus entscheidend ist.

Zur Bestimmung dieses Temperaturverlaufs wurde, wie in Abbildung 28 dargestellt, die Zellsuspension aus dem stationären Zustand der kontinuierlichen Kultur entnommen (30°C),

mit Hilfe einer Spritze (0.9x40 mm/20 Gx1^{1/2} Gr1, Sterican) in ein Reagenzröhrchen mit dem Inhalt Perchlorsäure bzw. Methanol eingetragen und intensiv geschüttelt. Unmittelbar darauf wurde ein Thermoelement (Thermocouple TKA 10/25/DIV Thmococax, Suresnes, France) zentriert in den Kern der Suspension eingetaucht und der zeitliche Verlauf der Kerntemperatur gemessen. Das Thermoelement wurde zur Datenerfassung an einem Rechner angeschlossen. Der gesamte Vorgang ist in der Abbildung 28 näher dargestellt.

Die Reagenzröhrchen wurden bereits vor der Probenahme 30 Minuten lang im Kryostaten bei -20°C (für Perchlorsäure als Quenching-Medium) bzw. in einem Methanolbad bei -70°C (für Methanol als Quenching-Medium) vortemperiert. Während des Einspritzens und Schüttelns blieb das Reagenzröhrchen in dem entsprechenden Kältebad.

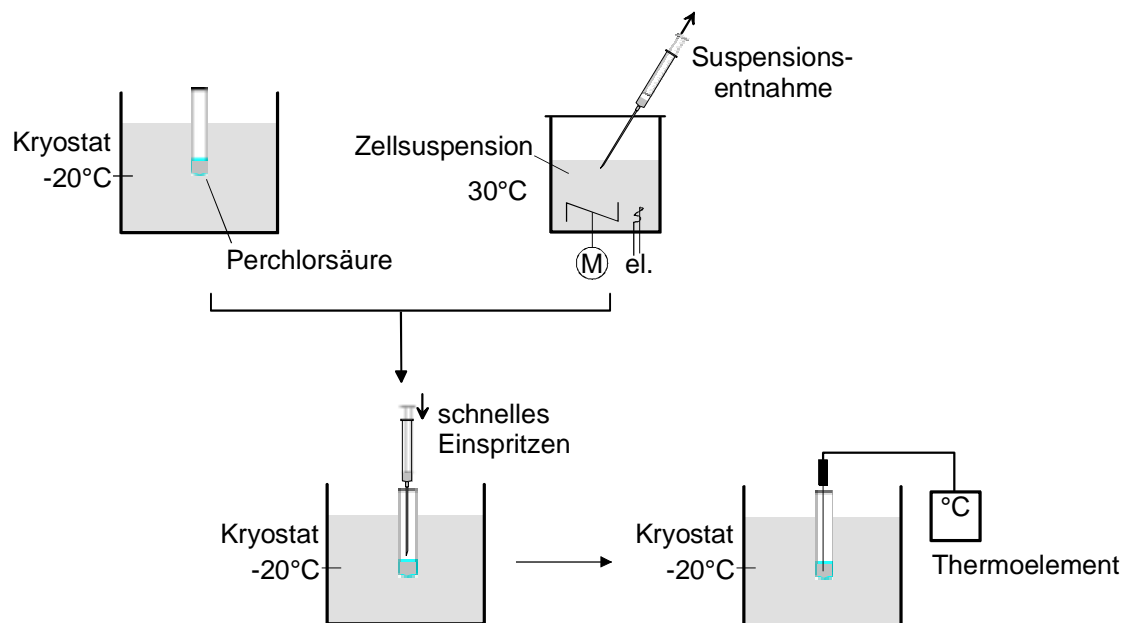


Abbildung 28. Methode zur Messung des zeitlichen Temperaturverlaufs.

3.7.2 Methode zur Bestimmung der Aufschlußkinetik

3.7.2.1 Probenvorbereitung

Beim Abkühlen, Einfrieren und dem darauf folgenden Auftauen biologischer Proben im Gegenwart eines Extraktionsmittels wird ein Teil der Zellen durch Eiskristallbildung verletzt und aufgeschlossen. Die zeitliche Veränderung des Anteils aufgeschlossener Zellen zur Gesamtzahl der Zellen im Verlaufe der Extraktion bzw. der Gefrier-Tau-Zyklen, läßt auf die sogenannte Aufschlußkinetik schließen.

Zu diesem Zweck wurden aus dem stationären Zustand einer kontinuierlichen Kultur Proben in Perchlorsäure 35% (w/v) bei -20°C überführt. Unmittelbar nach der Probenahme wurde die Probe im Kryostaten bei -20°C temperiert. Einfrieren der Proben während dieser Inkubationszeit konnte erst nach 150 Sekunden beobachtet werden. Bei länger anhaltenden

Inkubationszeiten war es unumgänglich anschließend Gefrier-Tau-Zyklen zwischen -20 und 4°C durchzuführen.

Zur Bestimmung der Anzahl aufgeschlossener Zellen wurden die Zellen entsprechend Abschnitt (3.7.2.2) und (3.7.2.3) gefärbt und gezählt. Hierzu war es notwendig, das Einwirken der Perchlorsäure auf die Zellen nach unterschiedlichen Einwirkzeiten zu stoppen. Zu diesem Zweck wurden je $400\ \mu\text{l}$ der Zellsuspension auf den Filter ($0.45\ \mu\text{m}$, Glasfaser-Rundfilter Fa Schleich & Schull, Dassel) einer evakuierten Nutscheinheit (Schott/Duran & Gelman Sciences $45\ \mu$ Supor) pipettiert und sofort mit $2\times 5\ \text{ml}$ physiologischer Kochsalzlösung nachgespült. Der Filter wurde zusammen mit dem Filterkuchen unmittelbar nach der Filtration in Reagenzgläser mit dem Inhalt Phosphatpuffer (pH 7.2) überführt. Die Zellen wurden durch Vortexen sofort resuspendiert.

Die Einwirkzeit wurde definiert als die Zeitspanne vom Öffnen des Ventils der Probenahme Vorrichtung bis zum Pipettieren des Aliquots auf den Filter.

3.7.2.2 Färbemethoden

3.7.2.2.1 Berberinsulfat-Färbung (BS)

Der Farbstoff Berberinsulfat akumulierte in lebenden Hefezellen an Orten, an denen Redoxreaktionen stattfinden wie z. Bsp. Mitochondrien. Es wird vermutet, daß der Farbstoff mit den Komponenten der Atmungskette in Wechselwirkung tritt, wodurch ein gelb-grünes Fluoreszieren der Mitochondrien verursacht wird. Der Farbstoff kann somit in aeroben Kulturen der Hefe zur Unterscheidung von atmungsinaktiven (toten) bzw. atmungsaktiven (lebenden) Zellen herangezogen werden (SCHWARZ, 1996). Tote Zellen zeichnen sich von lebenden Zellen dadurch aus, daß sie den Farbstoff innerhalb weniger Minuten ins Cytoplasma bzw. in den Mitochondrien aufnehmen (HUBER-WÄLCHLI, 1979) und leuchtend gelb-grün fluoreszieren.

Zur Herstellung der Färbestammlösung wurde ein MES/Tris-Puffer (10% v/v, pH 6.0) vorbereitet. Mit diesem Puffer wurde eine Sorbitlösung von $0.7\ \text{M}$ bereit gestellt und $1\ \text{mg}$ Berberinsulfat wurde in $1\ \text{ml}$ dieser Sorbitlösung gelöst (BERLIN UND EUERBECK, 1984).

Zu $1\ \text{ml}$ Zellsuspension wurden $20\ \mu\text{l}$ dieser Berberinsulfatlösung zupipettiert, gemischt, $2\ \text{Minuten}$ bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zur Mikroskopie verwendet.

Die mikroskopische Kontrolle der aufgeschlossenen Zellen erfolgte mit einem umschaltbaren Phasenkontrast-/Fluoreszenz-Mikroskop (s. Abschnitt 3.7.2.4). Mit Phasenkontrast wurde die Gesamtzahl der Zellen und mit Fluoreszenzanregung die Anzahl der leuchtenden d.h. der aufgeschlossenen Zellen bestimmt.

3.7.2.2.2 Fluoreszeindiazetat-Propidiumiodid-Färbung (FD/PI)

Der Farbstoff Propidiumiodid (PI) fluoresziert bei $530\ \text{nm}$ durch Anlagerung in der DNA. Wegen der positiven Ladung kann das Molekül nicht durch die Zellmembran permeieren (ROTMAN UND PAPERMASTER, 1966) (BREUNER ET AL., 1989), aufgeschlossene Zellen

fluoreszieren daher grün. Fluoreszeindiazetat (FD) ist lipophil und apolar. Aufgrund dieser Eigenschaft kann die Substanz durch die Zellmembran permeieren. In der lebenden Zelle werden die Acetylreste des farblosen Farbstoffs von unspezifischen Esterasen hydrolytisch entfernt. Das so entstandene Fluoreszein fluoresziert bei 530 nm grün und kann auf Grund seiner Polarität nicht aus der Zelle diffundieren (ROTMAN UND PAPERMASTER, 1966) (BREUNER ET AL., 1989). Nicht aufgeschlossene Zellen fluoreszieren daher rot.

Zur Herstellung der PI-Stammlösung wurden 2 mg PI in deionisiertem Wasser gelöst. Zu 3 ml einer Zellsuspension wurden zur Färbung 30 µl dieser Stammlösung zugegeben. Zur Herstellung der FD-Stammlösung wurden 200 µg FD in 1ml Aceton gelöst. Zu 3 ml einer Zellsuspension wurden zur Färbung 30 µl einer PI-Stammlösung gegeben.

3.7.2.3 Zellzählung

3.7.2.3.1 Helber-Zählkammer

Zur Bestimmung der Anzahl aufgeschlossener bzw. intakter Zellen wurde u.a. das Gitternetz einer Helber-Zählkammer (Kammertiefe 0.02 mm und Kleinquadratfläche 0.0025 mm²) Zur Färbung der Zellen wurde die Berberinsulfat-Methode verwendet.

3.7.2.3.2 FACS-Analyse

Der FACS (*engl. Fluorescence activated cell sorter*) dient als kombinierter Durchflußzytometer (*engl. coulter counter*) und Zellsortierer (*engl. cell sorter*). Dies ermöglicht Zellen nach ihrer Morphologie bzw. Fluoreszenz in einem elektrischen Feld unterschiedlich abzulenken, voneinander zu trennen bzw. zu zählen. Die Methode ermöglicht die Zählung von bis zu 1000 Zellen in der Sekunde bei einer maximalen Gesamtzahl von 50000. Zur Unterscheidung der aufgeschlossenen Zellen wurden diese in Voraus mit Fluoreszeindiazetat (FD) und Propidiumiodid (PI) gefärbt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Messungen an einem FACStar^{PLUS} (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, California) durchgeführt¹.

3.7.2.4 Mikroskopie

Für die fluoreszenz-mikroskopische Beobachtungen wurde das Mikroskop BH-2 (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Breitlinie 435 nm / Spektrallinie 490 nm) eingesetzt.

3.8 Analytische Methoden

3.8.1 Extrazelluläre Metabolite

Die Bestimmung des extrazellulären Ethanol erfolgte gas-chromatographisch. Zur Bestimmung extrazellulärer Glucose wurde ein Testkit auf enzymatischer Basis (Glucose-

¹ Die FACS-Analyse wurde am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart durchgeführt. Für die Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. P. Scheurich.

dehydrogenase) verwendet (Granutest 250, Merck, Darmstadt). Für Konzentrationen unterhalb von 30 mg/l wurde der Test entsprechend THEOBALD ET AL. (1995) modifiziert.

3.8.2 Intrazelluläre Metabolite (Gesamtzelle)

Die Konzentrationen von G6P und F6P wurden nach der enzymatischen Methode von MICHAL (1984) bestimmt (s. auch THEOBALD (1995)).

3.8.3 Intrazelluläre Metabolite (Cytoplasmatisch)

3.8.3.1 Adenin-Nukleotide

Die Bestimmung der cytoplasmatischen Adenin-Nukleotiden, MgATP, ADP, AMP erfolgte mittels Ionen-Austausch Chromatographie nach THEOBALD ET AL. (1993) und wird an dieser Stelle nicht weiter beschrieben.

3.8.3.2 Die Bestimmung von F-2,6-BP

Zur Messung der F-2,6-BP Konzentration wurde ein spezieller enzymatischer Assay entwickelt, welcher auf der von VAN SCHAFTINGEN ET AL. (1982) vorgeschlagenen Reaktionsfolge basiert (s. Abbildung 29). Hierbei wird von der aktivierenden Wirkung des F-2,6-BP auf die pyrophosphat-abhängige Phosphofruktokinase-1 (PP_i-PFK) aus Kartoffelknollen Gebrauch gemacht. Die PP_i-PFK katalysiert in Anwesenheit von Pyrophosphat die Phosphorylierung von F6P zu F-1,6-BP. Das gebildete F-1,6-BP wird über eine Reaktionskette der Enzyme Aldolase (ALDO), Triose-isomerase (TIM) und Glycerol-dehydrogenase (GDH) in Glycerol-3-phosphat (G3P) überführt. Die Reaktion ist mit der Oxidation von NADH zu NAD verbunden. Die Bildung von NAD bewirkt eine Abnahme der Extinktion bei 339 nm, welche in linearer Beziehung zur Konzentration des F-2,6-BP steht.

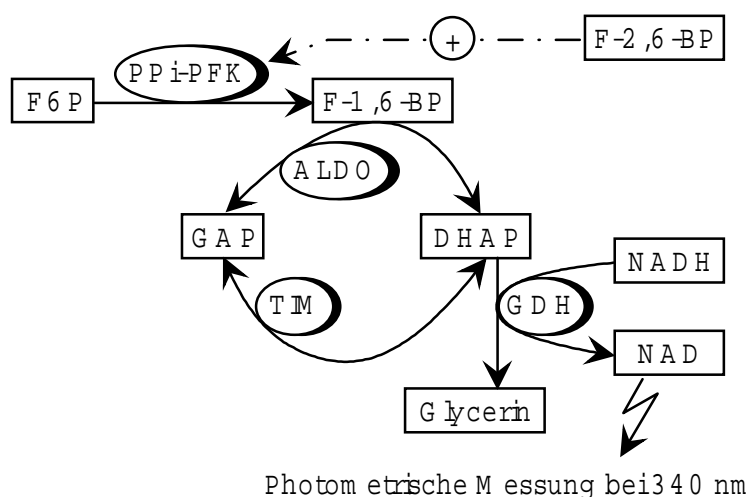


Abbildung 29. Reaktionsfolge im F-2,6-BP Assay.

Zur Herstellung der 0.1M F6P Lösung wird 152.0 mg F6P in 2.5 ml 2N HCl gelöst und 30 Minuten bei 25°C inkubiert um jede Spur von F-2,6-BP zu eliminieren. Danach wird die Lösung mit 2.5 ml 2M Na₂CO₃ neutralisiert und bei 0-4°C aufbewahrt.

Zur Herstellung der Enzymlösung wird 2 µl TIM, 200 µl ALDO, und 30 µl GDH zusammengeführt zweifach je 10 Minuten zentrifugiert (30000 rpm bei Raumtemperatur). Das Pelett wird in 600 µl Imidazol-Puffer 1M (0-4°C, pH 7.7) resuspendiert und bei 0-4°C aufbewahrt.

Für den Assay wird ein sogenannter Prämix bereitgestellt. Hierzu werden 1 ml Imidazol-Puffer 1M, 0.4 ml Mg-Acetat 0.1M, 0.1 ml F6P 0.1M, 0.6 ml der obigen Enzymlösung und 3.0 mg NADH in 0.9 ml de-ionisiertem Wasser gelöst und bei 0-4°C aufbewahrt.

Zur Durchführung des Assays werden 75.0 µl des Prämix, 5 µl 0.05 M Tetrasodiumpyrophosphat, 40 µl der Probe, und 350 µl Puffer zupipettiert. Nach 5 Minuten Abgleich gegen Luft bei 30°C wird die Reaktion mit 30 µl PP_i-PFK (1U/ml) gestartet. Der Assay wird bei einer Temperatur von 30°C und einem pH von 7.7 durch. Das gesamte Pipettierschema ist in der Tabelle 12 aufgetragen.

Tabelle 12. Pipettierschema für den F-2,6-BP Assay.

Lösung	Volumen	Lösung	Konzentration	
Prämix	75 µl	Magnesiumacetat	12 mM	
		F6P	300mM	
		Enzymlösung	TIM	1.0 U/ml
			ALDO	0.9 U/ml
			GDH	0.5 U/ml
NADH	0.2 mM			
Tetrasodium-pyrophosphat	5 µl		0.5 mM	
F-2,6-BP	40 µl		2 nM - 400 pM	
Puffer	350 µl		35 mM	
Rühren und 5 Minuten abgleichen gegen Luft bei 30°C				
PP _i -PFK	30 µl		0.041 U/ml	
Extinktionszunahme (dE/dt) bei 339 nm registrieren				

3.9 Bestimmung der Biomassekonzentration

Zur Bestimmung der Biomassekonzentration wurde die optische Dichte einer Fermenterprobe nach Verdünnung in physiologischer Kochsalzlösung bei 620 nm im linearen Bereich gemessen. Die Biomassekonzentration wurde aus dem Wert der optischen Dichte OD_{620} unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors f_x gemäß der folgenden Korrelationsgleichung nach THEOBALD (1995) berechnet:

$$C_x \left[\frac{gTS}{l} \right] = \frac{OD_{620} - 0.025}{3.019} \cdot f_x \quad (3.1)$$

3.10 Bestimmung der intrazellulären Proteinkonzentration

3.10.1 Herstellung des Zellextrakts

Zur Bestimmung der intrazellulären Proteinkonzentration sowie der Aktivität der ADH und G6PDH wurden die Zellen mit Hilfe einer Schwingmühle (Fa. Retsch, Typ MM2).mechanisch aufgeschlossen.

Hierzu wurde 20 ml Zellsuspension aus dem stationären Zustand der kontinuierlichen Kultur entnommen, 2-fach zentrifugiert (je 10 min bei 1200 rpm und 2°C) und jeweils in Phosphatpuffer (125 mM, pH 7.0) resuspendiert. Der Mahlbecher wurde mit 6 ml dieser Suspension (15 gTS/ml) und Glasperlen (1mm Ø) gefüllt. Der Aufschluß erfolgte 13 min lang bei maximaler Rüttelgeschwindigkeit. Zur Abtrennung der Zellbruchstücke wurde anschließend 10 Minuten lang bei 12000 rpm und -9°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die weitere Bestimmungen bei 0-4°C aufbewahrt.

3.10.2 Messung der intrazellulären Proteinkonzentration

Die Bestimmung der intrazellulären Proteinkonzentration wurde nach BRADFORD (1976) durchgeführt. Diese Methode beruht auf die Bildung eines Komplexes zwischen den intrazellulären Proteinen und dem Farbstoff Coomassie Brilliant-Blue G-250. Die quantitative Bestimmung dieses Komplexes erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm.

3.11 Bestimmung der Enzymaktivitäten unter *in-vitro* Bedingungen

3.11.1 Aktivität der Alkohol-dehydrogenase (ADH)

Der Reaktionsansatz setzt sich aus Tris/HCl Puffer 0.05 M (pH 7.4), NAD 1 mM und dem Rohextrakt in einem Gesamtvolumen von 10 ml zusammen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ethanol bei einer Konzentration von 0.1 M gestartet.

3.11.2 Aktivität der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G6PDH)

Der Reaktionsansatz setzt sich aus Tris/HCl Puffer 0.05 M (pH 7.4), MgCl₂ 5 mM, NADP 0.25 M und dem Rohextrakt in einem Gesamtvolumen von 10 ml zusammen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von G6P bei einer Konzentration von 5 mM gestartet.

3.11.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten bei 30, 0, -5 und -10°C

Die Enzymreaktion wurde in einem Reaktionsbehälter (Gesamtvolumen 10 ml) mit Doppelmantel (Schott/Duran) durchgeführt. Der Doppelmantel wurde über einen Kühl- bzw. Wärmekreislauf an einem Thermostaten angeschlossen (s. Abbildung 30).

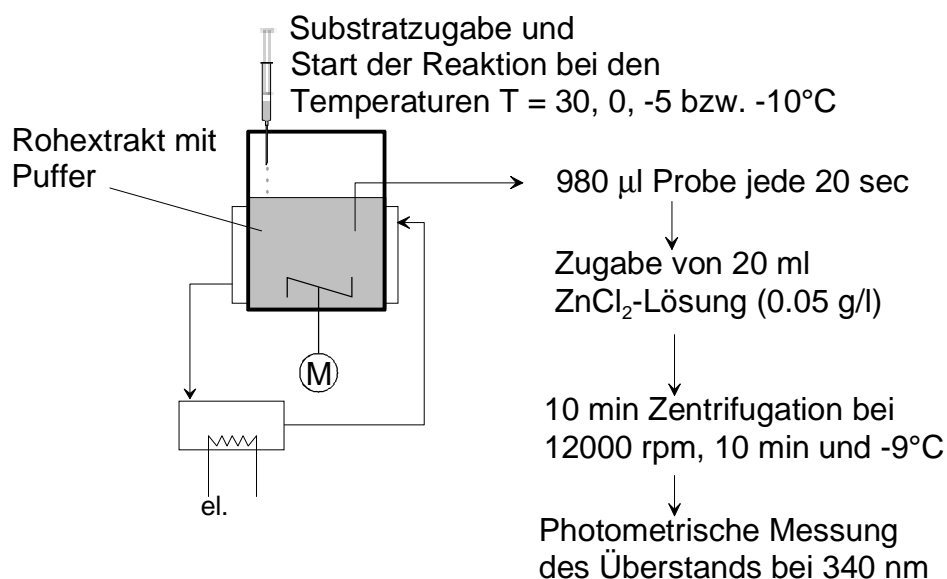


Abbildung 30. Schematische Darstellung der Methode zur Bestimmung von Enzymaktivitäten unter *in-vitro* Bedingungen bei verschiedenen Temperaturen.

Der jeweilige Reaktionsansatz wurde im Reaktionsbehälter auf die gewünschte Temperatur ($30, 0, -5, -10^{\circ}\text{C}$) eingestellt. Nach Zugabe des Substrats und Start der Reaktion wurden bis zu 60 Minuten Proben von je $980 \mu\text{l}$ entnommen. Zum schnellen und vollständigen Abstoppen der Enzymreaktion wurde $20 \mu\text{l}$ einer ZnCl_2 Lösung (0.05 g/l) zu jeder Probe gegeben. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 12000 rpm und -9°C , wurde die Extinktion im Überstand bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt.

Es ist zu beachten, daß bei den Versuchsansätzen in -5 bzw. -10°C je 1 bzw. 2 ml des Gesamtvolumens im Reaktionsansatz durch Methanol ersetzt wurde um ein Gefrieren der Proben zu verhindern.

3.12 Bestimmung der Enzymaktivität unter *in-situ* Bedingungen

3.12.1 Permeabilisierung der Zellmembran

Die Permeabilisierung der Zellen wurde entsprechend SERRANO ET AL. (1973) in der modifizierten Version von CORTASSA ET AL. (1994) durchgeführt. Hierzu wurde eine Probe aus dem stationären Zustand der kontinuierlichen Kultur entnommen und mit physiologischer Kochsalzlösung ($\text{NaCl } 0.9\% \text{ w/v}$) auf eine Konzentration von 1.2 gTS/l eingestellt. Die verdünnte Suspension wurde zweimal je 4 min lang bei 5000 rpm zentrifugiert und das Pellet jeweils in 6 ml Phosphat-Puffer 100 mM ($\text{pH}=7.0$) resuspendiert. Zu 6 ml dieser Suspension wurde $300 \mu\text{l}$ eines Toluol-Ethanol-Gemisches ($1:4 \text{ v/v}$) zugegeben. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde diese Suspension 5 min lang in 2 Sekunden Abständen mit einem Vortex-Schüttelgerät homogenisiert und im Anschluß zentrifugiert (5000 rpm , 4 min). Daraufhin wurde das Pellet in 6 ml Phosphat-Puffer (0.1 M , $\text{pH}=7.0$) resuspendiert, nochmals

zentrifugiert (5000 rpm, 4 min) und schließlich in 1.2 ml MES-Puffer 0.5 M resuspendiert (CORTASSA ET AL., 1994). Der pH-Wert des Puffers richtet sich jeweils nach dem pH-Wert des darauf folgenden enzymatischen Assays. Alle Schritte zur Permeabilisierung wurden bei 25°C durchgeführt. Das Permeabilisat wurde anschließend auf Eis gelegt und innerhalb 8 Stunden für die weiteren Untersuchungen verwendet. Der Ablauf der gesamten Permeabilisierungsprozedur ist in der Abbildung 31 zusammengefasst.

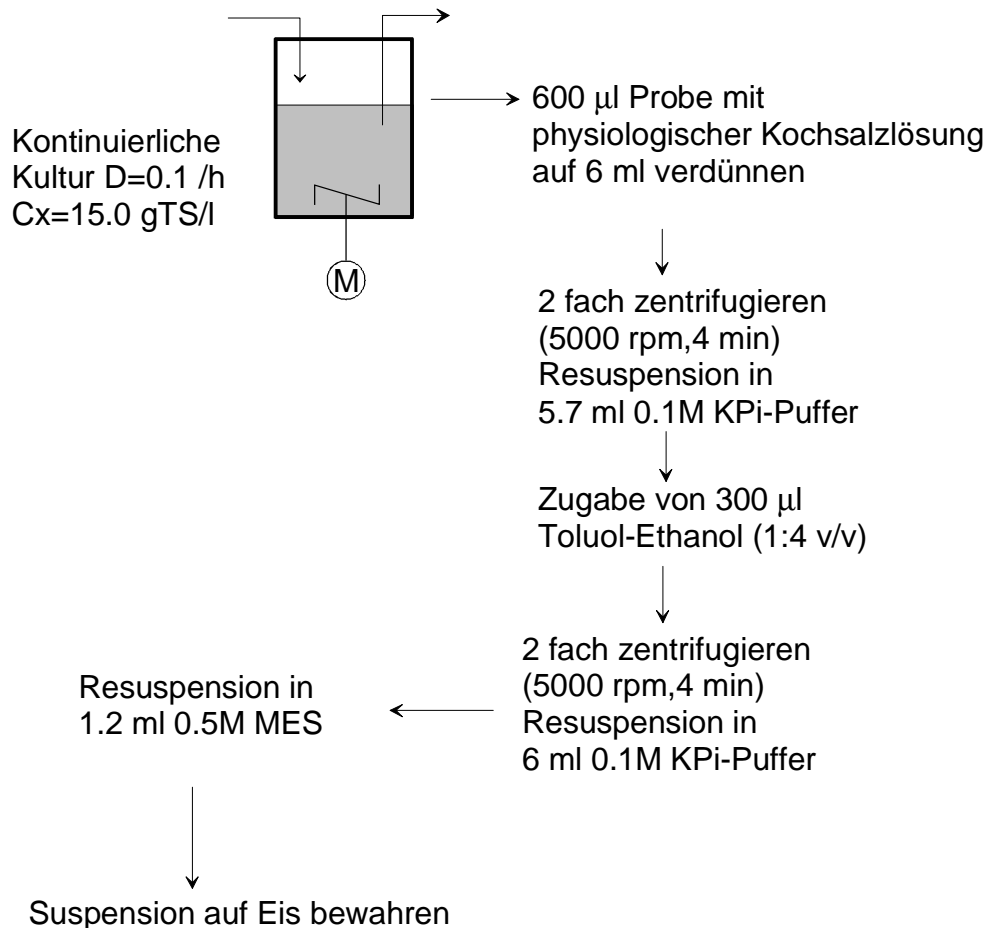


Abbildung 31. Schema der Permeabilisierungsprozedur.

Die Biomassekonzentration im Permeabilisat $C_{x,Perm}$ errechnet sich mit der Biomassekonzentration der ursprünglichen Fermenterprobe $C_{x,Probe}$ zu:

$$C_{x,Perm} = C_{x,Probe} \cdot \frac{V_{Probe}}{V_{Perm}} \quad (3.2)$$

wobei V_{Probe} das eingesetzte Volumen der Fermenterprobe und V_{Perm} das Endvolumen der Suspension darstellt.

3.12.2 Assay der PFK1 unter *in-situ* Bedingungen

Der Assay zur Bestimmung der *in-situ* Aktivität der PFK1 wurde von GANCEDO UND GANCEDO (1971) übernommen. Wie aus der Abbildung 32 hervorgeht, besteht der Assay aus einer enzymatischen Kopplung der PFK1-Reaktion mit einer durch Glycerol-3-phosphat dehydrogenase (GDH) katalysierten NADH-Oxidation.

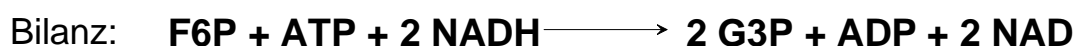
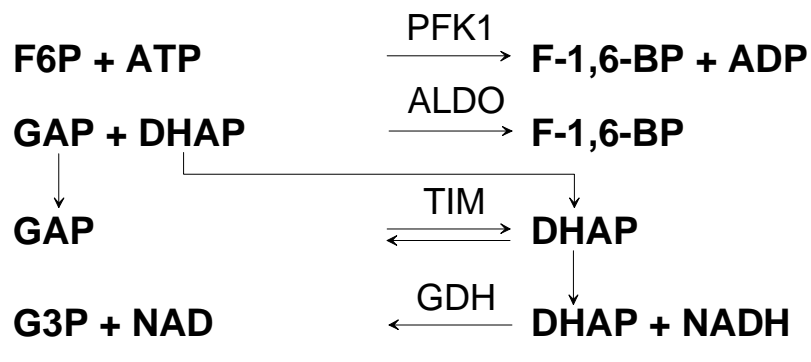


Abbildung 32. Reaktionsfolge des PFK1 Assays (GANCEDO UND GANCEDO, 1971).

Das Reaktionsvolumen von 1 ml bestand aus Imidazol/HCl 100 mM (pH=7.2±0.1), MgSO₄ 5 mM, ALDO 1 U/ml, Glycerol-3-phosphat dehydrogenase (GDH) 1.5 U/ml, Triose-isomerase (TIM) 5 U/ml, 0.3 mgTS/ml permeabilisierten Zellen und NADH 0.2 mM. Die Konzentration von (NH₄)₂SO₄ im Reaktionsvolumen betrug 36 mM.

Die Konzentrationen der Substrate und Effektoren wurden variiert. Die Reaktion wurde nach 2 min Inkubation bei einer Temperatur von 30°C mit F6P gestartet und bei derselben Temperatur durchgeführt.

Die Messung erfolgte photometrisch durch Bestimmung des NADH-Verbrauchs bei einer Wellenlänge von 340 nm. Die spezifische Aktivität r_{PFK1} konnte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz wie folgt ermittelt werden:

$$r_{PFK1} \left[\frac{U}{gTS} \right] = -\frac{1}{2} \cdot \frac{1}{\epsilon_{spez} \cdot d \cdot C_{X,Perm}} \cdot \frac{dE}{dt} \Bigg|_{t=0} \quad (3.3)$$

wobei $\epsilon_{spez}=6.22 \cdot 10^6$ cm²/mol den spezifischen Absorptionskoeffizient und $d=1$ cm die Schichtdicke der Küvette darstellen.

Es ist zu beachten, daß in einem *in-situ* Reaktionsansatz, das Reaktionsnetzwerk der Zelle der Enzyme weitgehend erhalten bleibt (s. Abbildung 3). Somit entsteht bei der *in-situ* Untersuchung intrazellulärer Enzyme oft das Problem, daß das eingesetzte Substrat zur Untersuchung eines speziellen Enzyms bzw. dessen Produkt zugleich als Substrat für andere intrazelluläre Enzymreaktionen auftreten kann (s. Abbildung 33). Bei einem *in-situ* Assay soll jedoch ausgeschlossen werden, daß parallel zu den gewünschten Reaktionen auch unerwünschte Reaktionen ablaufen. Wie in der Abbildung 33 dargestellt, stellt die Reaktion

der Phosphoglucose-isomerase (PGI) im *in-situ* Assay der PFK1 eine solche unerwünschte Reaktion dar. Die Reaktionen der Hexokinase (HK), Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G6PDH), Transaldolase (TAL) bzw. Transketolase-2 (TKL2) können hingegen keinen Einfluß auf die Konzentration des F6P nehmen, da die entsprechenden Co-substrate NADPH, GAP bzw. E4P im Assay fehlen (in Abbildung 33 mit gestrichelten Pfeilen dargestellt). Auch der Beitrag der FBPase1 Reaktion kann aufgrund der extrem niedrigen Aktivität der FBPase1 entsprechend Abschnitt (4.4.5.1) vernachlässigt werden (in Abbildung 33 mit gestrichelten Pfeilen dargestellt).

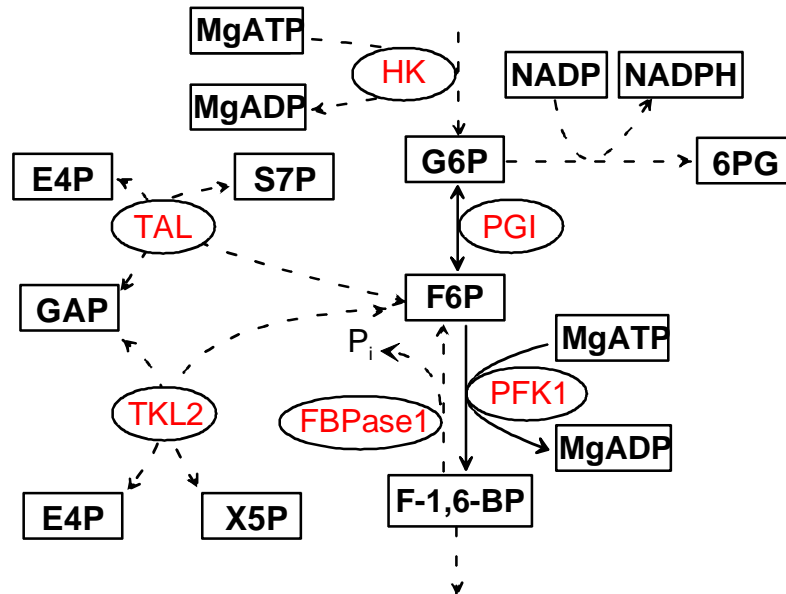


Abbildung 33. Nur die Reaktion der PGI beeinträchtigt den *in-situ* Assay der PFK1.

PGI katalysiert die reversible Umwandlung des Hexose-phosphats G6P zu F6P. Die von PGI katalysierte Isomerisierung kann allerdings gegenüber der irreversiblen Reaktion der PFK1 als schnelle Gleichgewichtsreaktion betrachtet werden (THEOBALD, 1995) (DYSON UND NOLTMANN 1968) (REICH UND SEL'KOV 1981).

Der Assay des PFK1 läßt sich in zwei Phasen unterteilen:

1. Die Inkubationsphase: In dieser Phase wird der Reaktionsansatz der PFK1 in Abwesenheit von ATP inkubiert. In Abwesenheit von ATP verläuft die Reaktion der PFK1 nicht. Es stellt sich während dieser Phase das Gleichgewicht zwischen G6P und F6P über PGI ein.
2. Die Reaktionsphase der PFK1: Zur Beginn dieser Phase hat sich das Gleichgewicht zwischen F6P und G6P in Abwesenheit von ATP bereits eingestellt. Ausgehend von diesem Gleichgewichtszustand wird durch Zugabe von ATP die Reaktion der PFK1 gestartet.

Entscheidend für den Einfluß der PGI-Reaktion im Assay ist die Inkubationsphase. Während dieser Phase wird das Substrat F6P über die Reaktion des PGI in G6P umgesetzt und somit ein Gleichgewichtszustand für die PGI Reaktion erzielt. Für diesen Zustand gilt unter *in-vitro* Bedingungen entsprechend DYSON ET AL. (1968), NEWSHOLME ET AL. (1973) und REICH UND SEL'KOV (1981):

$$K_{Eq,PGI} = \frac{C_{F6P}^{GG}}{C_{G6P}^{GG}} \approx 0.3 \quad (3.4)$$

Hierbei stellen C_{G6P}^{GG} bzw. C_{F6P}^{GG} die Konzentrationen des G6P bzw. F6P im Gleichgewicht (d.h. nach der Inkubationsphase) dar und $K_{Eq,PGI}$ die Gleichgewichtskonstante bei 30°C. Berücksichtigt man nun die Konzentration des F6P vor der Inkubationsphase C_{F6P}^0 so läßt sich für das geschlossene Reaktionssystem folgende Bilanz aufstellen:

$$C_{F6P}^0 = C_{F6P}^{GG} + C_{G6P}^{GG} \quad (3.5)$$

Errechnet man die Konzentration des G6P im Gleichgewicht, C_{G6P}^{GG} , aus Gleichung (3.4) zu:

$$C_{G6P}^{GG} = \frac{1}{K_{Eq,PGI}} C_{F6P}^{GG} \quad (3.6)$$

und setzt dies in die Bilanzgleichung, so ergibt sich:

$$C_{F6P}^{GG} = \frac{K_{Eq,PGI}}{1 + K_{Eq,PGI}} \cdot C_{F6P}^0 \approx 0.3 \cdot C_{F6P}^0 \quad (3.7)$$

Mit Hilfe dieser Beziehung läßt sich aus der angesetzten Konzentration des F6P zur Beginn der Inkubationsphase, C_{F6P}^0 , die tatsächliche Konzentration des F6P zur Beginn der Reaktionsphase für PFK1 zurückrechnen. Die daraufhin gemessene Enzymaktivität des PFK1 konnte somit auf die tatsächliche Startkonzentration der Reaktion C_{F6P}^{GG} bezogen werden.

Es ist zu erwähnen, daß auch ohne Zugabe der Substrate F6P und MgATP eine sogenannte Hintergrundaktivität gemessen wird. CORTASSA ET AL. (1994) beschreiben das Phänomen damit, daß NADH aufgrund des mitochondrialen Elektronentransports reoxidiert werden kann. Um die tatsächliche Aktivität der PFK1 zu erhalten, wird zur Kontrolle bei jeder Messung gleichzeitig eine Nullprobe mitgeführt, die gemessene Aktivität in der Nullprobe entspricht der Hintergrundaktivität und wird der gemessenen Enzymaktivität in der Gegenprobe subtrahiert. Diese Hintergrundaktivität der Zelle betrug in unserem Assay 4 nmol reoxidiertes NADH pro ml und min.

3.12.3 Assay der PGI unter *in-situ* Bedingungen

Dieser Assay diente lediglich dem Nachweis der PGI Aktivität in den permeabilisierten Zellen. Wie aus der Abbildung 34 hervorgeht, beruht der Assay auf die Kopplung der PGI-Reaktion mit der durch G6PDH katalysierten Oxidation von G6P.

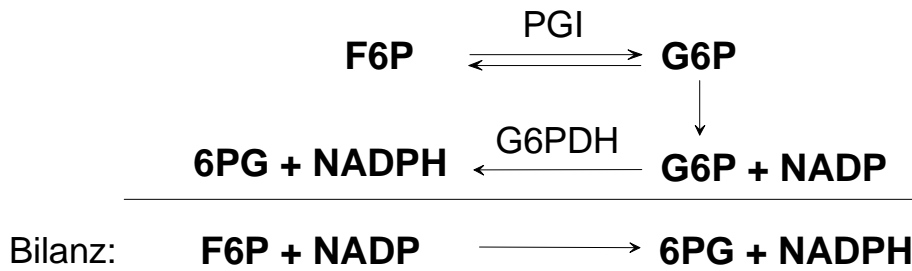


Abbildung 34. Reaktionsfolge des PGI Assays.

Das Reaktionsvolumen von 1 ml bestand aus MES 100 mM (pH 6.9±0.1), 0.5 gTS/l permeabilisierten Zellen, EGTA 1 mM, MgCl₂ 2.2 mM, G6PDH 0.5 U/ml, NADP 1 mM und F6P 1 mM. Die Reaktion wurde nach 2 min Inkubation bei einer Temperatur von 30°C mit F6P gestartet. Die Messung erfolgte photometrisch durch Bestimmung der NADPH-Bildung bei einer Wellenlänge von 340 nm.

3.12.4 Assay der FBPase1 unter *in-situ* Bedingungen

Dieser Assay wurde entsprechend GANCEDO UND GANCEDO (1971) durchgeführt. Wie aus der Abbildung 35 hervorgeht, beruht der Assay auf die enzymatische Kopplung der zu untersuchenden FBPase1-Reaktion mit einer durch G6PDH katalysierten NADP-Reduktion:

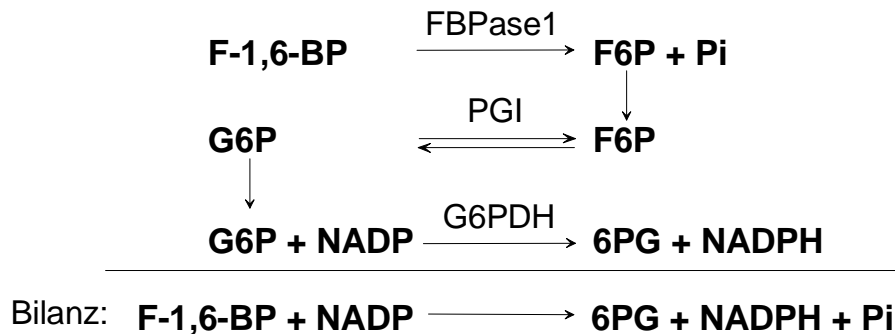


Abbildung 35. Reaktionsfolge des FBPase1 Assays.

Das Reaktionsvolumen von 1 ml bestand aus MES 100 mM (pH=6.9±0.1), EGTA 1 mM, MgCl₂ 2.2 mM, PGI 0.5 U/ml, G6PDH 0.5 U/ml, NADP 1 mM und 0.56 gTS/l permeabilisierten Zellen. Die Reaktion wurde nach 2 min Inkubation bei einer Temperatur von 30°C mit F-1,6-BP gestartet.

Die Messung erfolgte photometrisch durch Bestimmung der NADPH-Bildung bei einer Wellenlänge von 340 nm. Die spezifische Aktivität r_{FBPase1} konnte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz wie folgt ermittelt werden:

$$r_{\text{FBPase1}} \left[\frac{U}{\text{gTS}} \right] = -\frac{1}{2} \cdot \frac{1}{\epsilon_{\text{spez}} \cdot d \cdot C_{x, \text{Perm}}} \cdot \frac{dE}{dt} \Bigg|_{t=0} \quad (3.8)$$

wobei $\epsilon_{spez} = 6.22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ den spezifischen Adsorptionskoeffizienten und $d = 1 \text{ cm}$ die Schichtdicke der Küvette dargestellt.

3.12.5 Assay der F-2,6-BP-Degradation unter *in-situ* Bedingungen

Zur Untersuchung der Kinetik der F-2,6-BP-Degradation wurde ein spezieller diskontinuierlicher *in-situ* Assay verwendet. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgt entsprechend Abschnitt (3.12.1). Der Assay für die Untersuchung der Degradation von F-2,6-BP besteht aus F-2,6-BP 46 μM , MgCl_2 4.0 mM und MES-Puffer 42.0 mM (pH 6.0) in einem Reaktionsvolumen von 1.2 ml. Der Reaktionsansatz wurde 5 min lang bei 25°C in einem Thermomixer (Eppendorf Thermomixer 5436) inkubiert. Die Reaktion wurde daraufhin mit 200 μl einer Suspension permeabilisierter Zellen gestartet. Während der Reaktion wurden zu verschiedenen Zeiten Aliquots von 100 μl entnommen, zu 100 μl eiskalter (0-4°C) NaOH (0.2 N) gegeben, eine Sekunde auf dem Vortex-Schüttelgerät homogenisieren und anschließend in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Nach drei aufeinanderfolgenden Gefrier-Tau-Zyklen zwischen -20 und 4°C wurde jeder Probe 1 ml destilliertes Wasser zugegeben und für weitere Messungen bei 0-4°C aufbewahrt. Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein entsprechender Reaktionsansatz ohne Zugabe von F-2,6-BP (Kontrolle 1) bzw. Zellsuspension (Kontrolle 2) mitgeführt. Bei der Kontrolle 1 konnte keine Konzentration des F-2,6-BP nachgewiesen werden, was darauf schließen läßt, daß die Zellsuspension nach der Permeabilisierung frei von diesem Metabolit war. Auch bei der Kontrolle 2 konnte keine Abnahme der F-2,6-BP Konzentration beobachtet werden, was auf die chemische Stabilität dieses Metabolits im Reaktionsansatz während der Reaktion hinweist. Im Anschluß wurde die Konzentration des F-2,6-BP in den Proben entsprechend Abschnitt (3.8.3.2) gemessen.

3.13 Bestimmung der PFK2 Aktivität unter *in-vitro* Bedingungen

Die Bestimmung der Aktivität der PFK2 unter *In-vitro* Bedingungen erfolgt entsprechend Abbildung 36 in vier Schritten. Die einzelnen Schritte werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

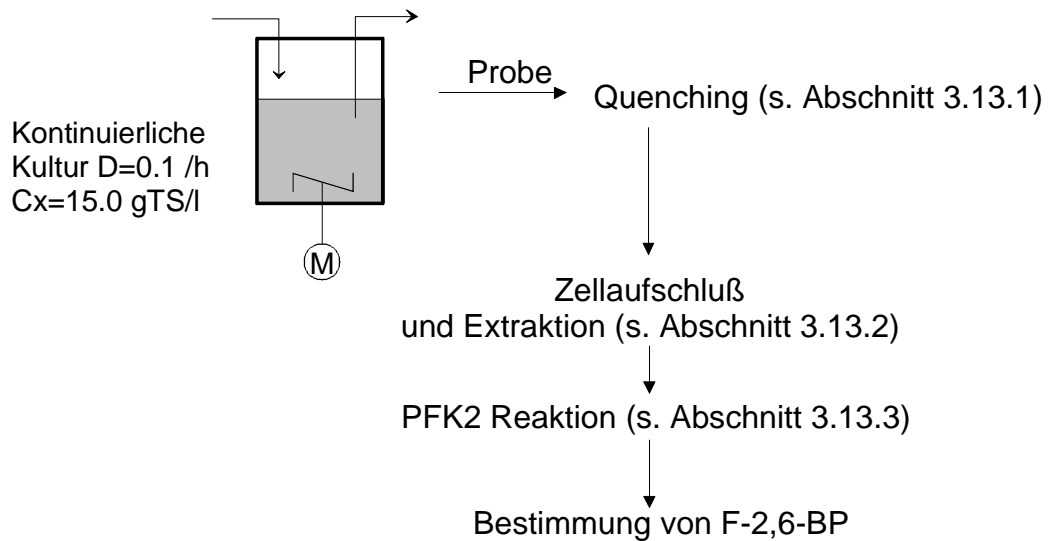


Abbildung 36. Bestimmung der PFK2 Aktivität unter *in-vitro* Bedingungen.

3.13.1 Quenching

Die Proben wurden dem Fermenter entsprechend Abschnitt (2.6.1) entnommen. Hierbei wurde 1 ml Probe direkt aus dem Fermenter in 2 ml Methanol (-70°C) injiziert. Die Proben wurden unmittelbar nach der Probenahme für 15 min in einem Kryostaten bei -20°C inkubiert anschließend bei -9°C zentrifugiert und mit Aufschlußpuffer (s. Tabelle 13) auf 60 gTS/l resuspendiert. Die Suspension wurde bei $0-4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.13.2 Zellaufschluß und Extraktion

Der Aufschluß der Zellen erfolgte entsprechend FRANCOIS ET AL. (1984). Nach Zugabe von 1g Glaskugeln (0.5-0.7 mm \varnothing) wurde die Suspension in 4 aufeinander folgenden Zyklen abwechselnd eine Minute lang auf dem Vortex-Schüttler homogenisiert und anschließend eine Minute lang auf Eis bei $0-4^{\circ}\text{C}$ temperiert.

Nach den vier Aufschlußzyklen wurde die Probe zentrifugiert und der Überstand zur Messung von PFK2 Aktivität verwendet.

Tabelle 13. Zusammensetzung des Aufschlußpuffers (FRANCOIS ET AL., 1984).

<i>Substanz</i>	
KCl	500 mM
EDTA	2 mM
1,4-Dithiotreitol	1 mM
Phenylmethylsulfonylfluorid	1 mM
NaF	20 mM
Kaliumphosphat-Puffer pH 7.5	50 mM

3.13.3 Assay der PFK2 unter *in-vitro* Bedingungen

Die Bestimmung der Aktivität der PFK2 erfolgte in einem Assay folgender Zusammensetzung: Tris-Acetat-Puffer 40 mM (pH 7.8), Magnesiumacetat 8 mM, K_3PO_4 1.7 mM, MgATP 6 mM, G6P 6.5 mM, F6P 1.7 mM und 100 μ l Zellsuspension entsprechend Abschnitt (3.12.1) in einem Gesamtvolumen von 600 μ l. Gestartet wurde der Assay mit dem Substrat F6P.

Die Reaktion wurde entsprechend Abbildung 37 nach verschiedenen Zeiten abgestoppt, indem ein definiertes Volumen der Reaktionslösung mit einem Aliquot NaOH 0.1M versetzt und 10 min bei 80°C inkubiert wurde. Das gebildete F-2,6-BP wurde anschließend in den Proben entsprechend Abschnitt (3.8.3.2) gemessen.

Um Spuren von F-2,6-BP in der zugegebenen F6P Substratlösung zu zerstören, wurde F6P in der entsprechenden Molarität 30 Minuten mit HCl 2M bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin mit einem Aliquot Na_2CO_3 neutralisiert.

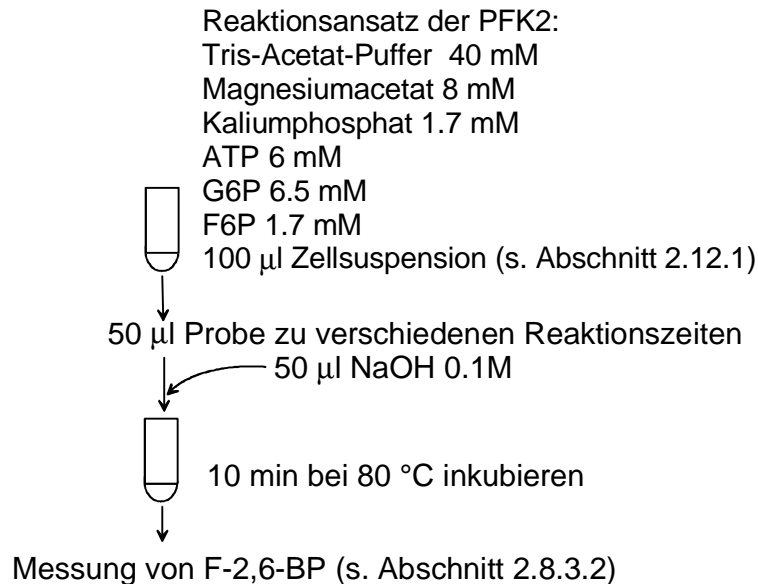


Abbildung 37. Assay der PFK2 unter *in-vitro* Bedingungen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Desaktivierung und Extraktion

Die quantitative Bestimmung intrazellulärer Metabolite setzt sowohl eine wirksame Desaktivierung des Metabolismus als auch eine optimale Extraktion der biologischen Proben voraus.

Für die Optimierung der Desaktivierung stellt die Temperatur den entscheidenden Parameter dar. Hierzu genügt eine gezielte Untersuchung des zeitlichen Temperaturverlaufs der biologischen Proben.

Eine optimale Extraktion kann durch die gezielte Wahl des Extraktionsmittels sowie abwechselnde Gefrier-Tau-Zyklen gewährleistet werden. Das gewählte Extraktionsmittel sorgt einerseits für eine chemische Destruktion der Zellen als auch für eine Stabilisierung der zu bestimmenden Metabolite. Die Gefrier-Tau-Zyklen sorgen in Gegenwart des Extraktionsmittels für den Zellaufschluß durch Eiskristallbildung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden entsprechende Methoden zur Desaktivierung und Extraktion biologischer Proben gezielt untersucht und hinsichtlich ihres Einsatzes optimiert. Im folgenden werden die Ergebnisse dieser Untersuchung vorgestellt.

4.1.1 Untersuchung der Dynamik der thermischen Desaktivierung

Für die quantitative Erfassung dynamischer Veränderungen intrazellulärer Metabolit-Konzentrationen in Fermentationsprozessen ist die Deaktivierung des Zellmetabolismus unmittelbar nach der Probenahme von entscheidender Bedeutung. Verschiedene Methoden der Desaktivierung (*engl. quenching*) wurden bereits von THEOBALD (1995) sowie andere Autoren (SCHWARZ, 1996) zusammengefaßt. Die entsprechenden Methoden sollten einerseits für eine schnelle Desaktivierung des Metabolismus sorgen, andererseits schonend genug wirken um die Stabilität des zu bestimmenden Metaboliten zu gewährleisten.

Zum Quenching werden die Proben direkt aus dem Fermenter in ein tiefgekühltes Medium, das Quenching-Medium, injiziert. Als Quenching-Medium dient im Rahmen dieser Arbeit entweder das Extraktionsmedium selbst, nämlich Perchlorsäure (35%, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) bzw. KOH (2N, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), oder tiefgekühltes Methanol ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Entscheidend beim Quenching ist das abrupte Herabsetzen der Proben temperatur bei Vermeidung eines Gefriervorgangs. Das direkte Einfrieren der Probe nach dem Quenching ist nur dann unbedenklich, wenn eine Trennung des extrazellulären Mediums durch Filtration bzw. Zentrifugation nicht verlangt wird. Friert nämlich eine Probe ein, so ist ein späteres Auftauen dieser zur weiteren Aufbereitung unvermeidlich. Dieser Gefrier-Tau Vorgang führt jedoch, wie bereits POLAKIS UND BARTLEY (1966), KOPPERSCHLÄGER UND AUGUSTIN (1967) sowie WEIBEL ET AL. (1971) gezeigt haben, zur Eiskristallbildung und Aufriß der Zellen. Infolge dessen ist eine Diskriminierung zwischen extra- bzw. intrazellulären Medium nicht mehr möglich.

Um die Probleme zu eliminieren, wurde die Dynamik der thermischen Desaktivierung unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Die Dynamik der thermischen Desaktivierung läßt sich anhand der *Mischtemperatur* in den jeweiligen Proben verfolgen. Die Mischtemperatur ergibt sich durch Wärmeaustausch von 30°C warmer Zellsuspension aus dem Fermenter mit dem kühlen Quenching-Medium in Gegenwart von 15 Stahlkugeln. Zusätzlich zum Wärmeaustausch zwischen Zellsuspension, Quenching-Medium und Kugeln erfolgt über die Glaswandung des Probenahmeröhrchen ein Wärmeaustausch zwischen Röhrcheninhalt und dem Kühlbad. Durch das Schütteln der Probe überlagern sich beim Abkühlen die Wärmeübertragung durch Konvektion mit der Wärmeleitung.

Zur Bestimmung der Dynamik der thermischen Desaktivierung wurde der Meßfühler nach kurzem Schütteln der Probe zentriert in den Kern dieser eingeführt. Gemessen wurde so der zeitliche Verlauf der Mischtemperatur im Kern der Suspension.

Zur Optimierung der thermischen Desaktivierung wurden drei entscheidende Parameter variiert:

1. Die Temperatur des umgebenden Kühlbades
2. Die Temperatur des vorgelegten Quenching-Mediums
3. Das Volumenverhältnis der eingespritzten Probe zum Quenching-Medium

Die Abbildung 38 (oben) zeigt den zeitlichen Verlauf der Mischtemperatur im Kern der zylindrischen Probe nach der Injektion von 2 ml Zellsuspension (15 gTS/l; 30°C) zu 1 ml Perchlorsäure (-20°C; 35% v/v) bzw. KOH (-20°C; 2N) und 15 Stahlkugeln bei einer konstanten Umgebungstemperatur von -20°C (Methode A). Abbildung 38 (unten) zeigt den Verlauf der Mischtemperatur im Kern der zylindrischen Probe nach dem Einspritzen von 2 ml Zellsuspension 30°C zu 1 ml Methanol (-70°C) und 15 Stahlkugeln bei einer konstanten Umgebungstemperatur von -70°C (Methode B).

Während bei der Methode B bereits nach 10 Sekunden eine Temperatur von -30°C erreicht wird, ergibt sich bei der Methode A im selben Zeitraum nur eine Temperatur von -2.5°C.

Zwar weist die Methode B damit einen entscheidenden Vorteil gegenüber Methode A hinsichtlich der schnellen Abkühlgeschwindigkeit, dennoch scheitert sie vorerst an dem Nachteil, daß bei $-35.0 \pm 5^\circ\text{C}$ (20.0 ± 5 sec) ein Phasenübergang (s. Abbildung 38) stattfindet und ein Gefrieren der Probe einsetzt.

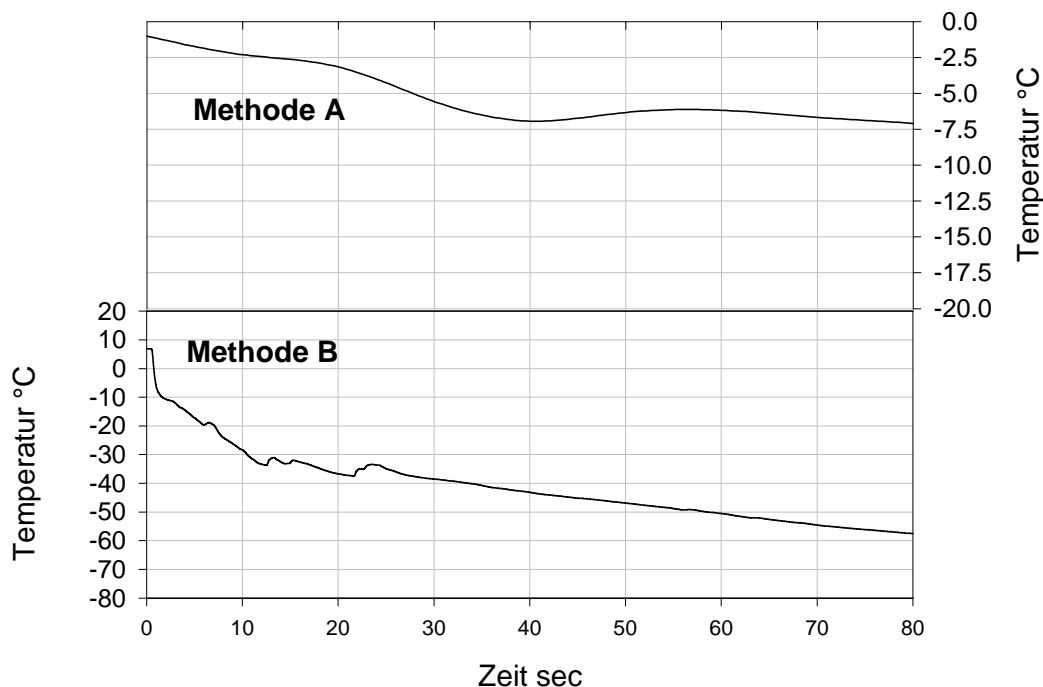


Abbildung 38. Verlauf der Mischtemperatur im Kern einer zylindrischen Probe entsprechend Methode A (oben) bzw. Methode B (unten).

Um einerseits die hohe Abkühlgeschwindigkeit bei der Methode B zu gewährleisten und dennoch einem Gefrieren der Probe vorzubeugen, werden die Probenahmeröhrchen ca. 2 Sekunden nach der Injektion in Methanol -70°C , in einen Kühlbad von -20°C überführt und für mindestens 15 min inkubiert. Damit wird die biologische Probe unmittelbar nach dem schnellen Quenchen bei -70°C , auf -20°C temperiert und somit ein Gefrieren der Probe vermieden (Methode C).

Es ist darauf hinzuweisen, daß die Messung der intrazellulären Metabolite G6P, F6P, F-1,6-BP und Adenin-Nukleotide in Proben aus dem stationären Zustand der kontinuierlichen Kultur trotz der gezeigten Unzulänglichkeiten im Temperaturverlauf sowohl mit der Methode A als auch mit der Methode C zu Ergebnissen führen, die im Rahmen der zu erwartenden und zu tolerierenden Meßfehler liegen. Offenbar erfüllt bereits die Methode A die Voraussetzungen zur Messung dieser Metabolite unter den genannten Bedingungen. Die Methode C gewinnt jedoch bei der Messung von F-2,6-BP an Bedeutung, da bei der Messung dieses Metaboliten die Zellen nach der Probenahme zur Trennung des extrazellulären Mediums kryofiltriert werden müssen (s. Abschnitt 4.2).

Zur weiteren Untersuchung der Dynamik der thermischen Desaktivierung wurden auch die Volumenverhältnisse zwischen der injizierten Probe und dem Quenching-Medium variiert.

In der Tabelle 14 bzw. Tabelle 15 sind für die Methode A bzw. B, die Zeiten bis zum Erreichen definierter Temperaturen für verschiedene Volumenverhältnisse aufgetragen. V_{Probe} stellt dabei das Volumen der aus dem Fermenter entnommenen Probe dar, V_{Med} steht hingegen für das Volumen des vorgelegten Quenching-Mediums.

Tabelle 14. Angabe der Zeit, bei der die Mischtemperaturen 0°C und -5°C nach Injektion von 2, 3 und 4 ml Hefesuspension ($+30^{\circ}\text{C}$) in 1 ml Quenching-Medium (-20°C) erreicht wurde.

V_{Probe}/V_{Med} (v/v)	0°C	-5°C
2	9 ± 2 sec.	23 ± 2 sec.
3	17 ± 2 sec.	25 ± 2 sec.
4	21 ± 2 sec.	37 ± 2 sec.

Tabelle 15. Angabe der Zeit, bei der die Mischtemperaturen 0°C und -5°C nach Injektion von 1, 2 und 3 ml Hefesuspension ($+30^{\circ}\text{C}$) in 1 ml Quenching-Medium (-70°C) erreicht wurde.

V_{Probe}/V_{Med} (v/v)	0°C	-5°C
2	5 ± 2 sec.	8 ± 2 sec.
3	9 ± 2 sec.	10 ± 2 sec.
4	10 ± 2 sec.	11 ± 2 sec.

Aus den Ergebnissen läßt sich schließen, daß die Abkühlgeschwindigkeit mit zunehmendem Volumenverhältnis der Probe zum Quenching-Medium erwartungsgemäß abnimmt. Auch eine tiefere Temperatur des Quenching-Mediums führt zu einem schnelleren Abkühlvorgang.

Entsprechend Tabelle 15 wird bei einem Volumenverhältnis vom 2:1 (v/v) die Temperatur von 0°C bereits nach 5 ± 2 sec erreicht wenn als Quenching-Medium Methanol (-70°C) gewählt wird. Beim selben Volumenverhältnis wird jedoch unter Verwendung von Perchlorsäure (-20°C ; 35% v/v) bzw. KOH (-20°C ; 2N) als Quenching-Medium 0°C Grenze erst nach 9 ± 2 sec erreicht (s. Tabelle 14). Für die weitere Untersuchungen wurden je nach Art der Extraktion diese zwei Varianten eingesetzt.

Die Gewißheit über einen optimalen Verlauf der Abkühlgeschwindigkeit und die Wahl der Volumenverhältnisse stellt beim Quenching zwar eine notwendige Voraussetzung für ein rasches Abstoppen des Metabolismus dar, verschafft jedoch keinerlei Information darüber, bei welcher Temperatur tatsächlich der Metabolismus zum Stillstand kommt. Zu diesem Zweck wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Enzymaktivitäten der G6PDH und ADH als Maß für die Aktivität des Metabolismus herangezogen und in Abhängigkeit von der Temperatur aufgezeichnet wurden. Die entscheidende Frage dabei ist, bei welcher Temperatur die Enzyme im Metabolismus als deaktiviert betrachtet werden können.

Zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die Stoffwechselaktivitäten wurden die maximalen Aktivitäten der ADH und G6PDH unter *in-vitro* Bedingungen im Rohextrakt bei 30°C , 0°C , -5°C und -10°C bestimmt (s. Tabelle 16). Mit steigender Temperatur wurde in beiden Reaktionen ein zunehmender Substratumsatz beobachtet. Eine Desaktivierung des

Metabolismus kann entsprechend dieser Daten bereits in einem Temperaturbereich zwischen -5°C bis -10°C angenommen werden.

Tabelle 16. Bestimmung der maximalen Aktivität der ADH und G6PDH im Rohextrakt bei 0°C , -5°C und -10°C .

Spezifische Enzymaktivität U/mg	0°C	-5°C	-10°C	$+30^{\circ}\text{C}$
ADH	0.75	0.23	0.0	8.2
G6PDH	0.011	0.008	0.002	0.4

4.1.2 Untersuchung der Aufschlußkinetik

Neben der unmittelbaren Desaktivierung des Metabolismus nach der Probenahme, stellt der optimale Aufschluß der Zellen eine wichtige Voraussetzung für die quantitative Bestimmung intrazellulärer Metabolite dar.

Beim Aufschluß der Hefezelle stellt die Zerstörung der Zellwand den entscheidenden Schritt dar. Die Zellwand verleiht der Hefezelle ihre Gestalt und mechanische Stabilität. Ihr Grundgerüst besteht aus einer komplexen Matrix von vernetzten Polysacchariden (β -1,3-Glukan, Mannan und Chitin), in der verschiedene Proteine eingelagert sind. Die Zellwand besteht aus drei Schichten. Die innere Schicht besteht aus β -1,3-Glukan und Proteinen, die durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Zellmembran gebunden sind (FRITSCH, 1990). Die Mittelschicht besteht aus Chitin-Mikrofibrillen, welche für die Formgebung der Zelle verantwortlich sind. Die äußere Schicht besteht aus Mannoproteinen, die durch Disulfidbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen miteinander in Verbindung stehen (ZLOTNIK ET AL., 1984).

Die Zellwand von *S. cerevisiae* ist für Moleküle mit einem Molekulargewicht geringer als 620D permeabel (SCHERRER ET AL., 1974). Größere Moleküle können nur durch spezifische Wechselwirkungen mit der Zellwand, diese durchdringen (SCHERRER ET AL., 1974).

Zur Zerstörung der Zellwand bei der Bestimmung intrazellulärer Metabolite schlagen AUGUSTIN UND KOPPERSCHLÄGER (1967) die Anwendung von Gefrier-Tau-Zyklen vor. Die Methode basiert auf der thermisch-mechanischen Zerstörung der Zellwand bei gleichzeitiger Zerstörung der Zellmembran durch das Einwirken eines sauren bzw. basischen Extraktionsmittels. Die Vorzüge dieser Methode wurden von THEOBALD ET AL. (1997) bei der Bestimmung intrazellulärer Metabolite bestätigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Effizienz dieser Methode anhand des sogenannten Aufschlußgrades erneut untersucht. Der Aufschlußgrad stellt als Maß der Effizienz einer Aufschlußmethode den prozentualen Anteil aufgeschlossener Zellen zu der Gesamtzahl der Zellen in einer biologischen Probe dar. Zur Bestimmung des Aufschlußgrades wurden, wie bereits im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, zwei Methoden herangezogen:

- Die BS-Methode: Färbung mit Berberin-Sulfat (BS) und Zellzählung mit der Helber-Zählkammer.
- Die PI/FD-Methode: Färbung mit Propium-Iodid (PI), Gegenfärbung mit Fluoreszeindiazetat (FD) und Zellzählung mit der FACS Methode (s. Abschnitt 3.7.2.3).

In der Abbildung 39 sind die Ergebnisse für die Bestimmung des Aufschlußgrades unter Einwirkung von Perchlorsäure (35%; -20°C) bzw. KOH (2N, -20°C) sowie nach 3 darauffolgenden Gefrier-Tau-Zyklen (Temperaturwechsel von -20°C auf 4°C). Sowohl die BS-Methode als auch die PI-Methode bestätigen einen Aufschlußgrad über 95% nach 3 Gefrier-Tau-Zyklen. Es ist darüber hinaus deutlich zu ersehen, daß ein alleiniges Einwirken der Extraktionsmittel bei -20°C nicht zum erwünschten Aufschlußgrad führt.

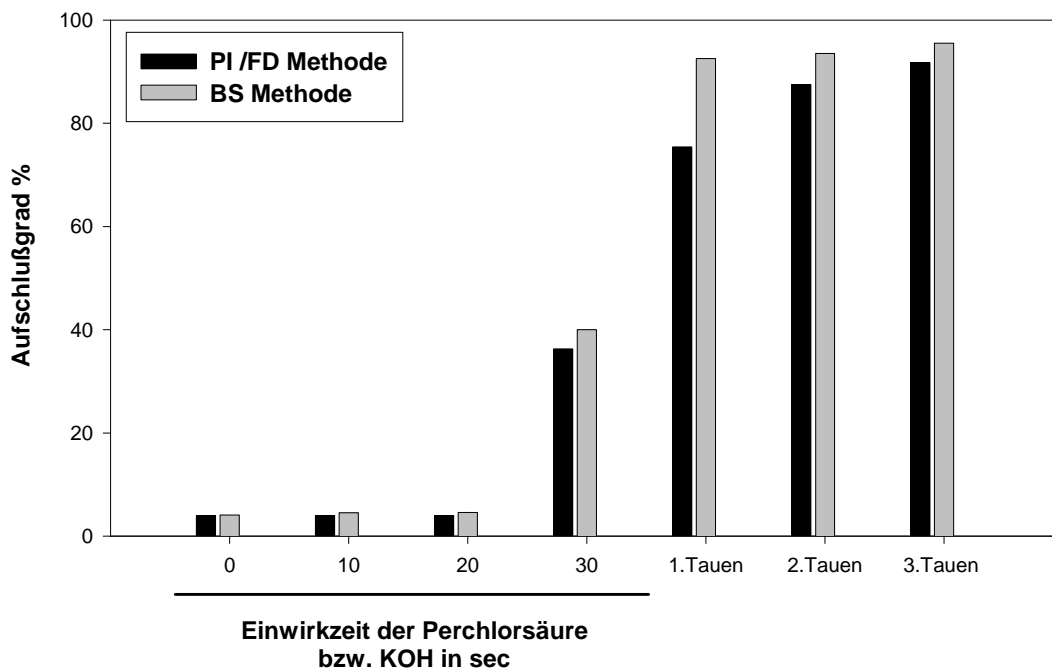


Abbildung 39. Der Aufschlußgrad nach unterschiedlichen Zeiten, bestimmt mit der BS bzw. PI/FD Methode.

Es ist zu berücksichtigen, daß auch die Abkühlgeschwindigkeit bei den Gefrier-Tau-Zyklen einen wesentlichen Einfluß auf den Aufschlußgrad nimmt. Wie MAZUR (1966), LOVELOCK (1953) und NEI (1976) unabhängig voneinander in unterschiedlichen Untersuchungen feststellten, ist intrazelluläre Eiskristallbildung die Hauptursache für die Verletzung und schließlich Zerstörung der Zellwand. Die Größe dieser Kristalle ist umgekehrt proportional zur Abkühlgeschwindigkeit. Im allgemeinen bewirkt ein langsames Abkühlen von $1^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ größere und stabile Eiskristalle, die sich jedoch außerhalb der Zelle formieren und nicht allzu schädlich für die Zellen sind (SCHWARZ, 1996). Die Wahrscheinlichkeit zur Bildung intrazellulärer Eiskristalle ist ausreichend hoch, wenn die Abkühlgeschwindigkeit über 10°C pro Sekunde hinausragt (SCHWARZ, 1996). Die Durchschnittsgröße der Eiskristalle bleibt allerdings unter diesen Umständen deutlich kleiner.

Die Geschwindigkeit, mit der die tiefgekühlte biologische Probe nachfolgend aufgetaut wird, hat nur dann großen Einfluß auf die Letalität, wenn die Zellen nicht bereits durch intrazelluläre Eisbildung verletzt worden sind (LOVELOCK, 1953).

4.2 Kryofiltration

Der Assay zur Bestimmung von F-2,6-BP ist besonders empfindlich gegenüber höheren Ionenkonzentrationen (VAN SCHAFTINGEN ET AL., 1982). Insbesondere wirken Amonium- und Phosphationen als starke Inhibitoren des P_{Pi}-PFK. Demzufolge sollten die Zellen direkt nach der Probenahme vom extrazellulären Fermentermedium, welches eine hohe Ionenkonzentration aufweist, getrennt werden. Dieser Trennvorgang vor dem Zellaufschluß ist nur bei entsprechend tiefen Temperaturen sinnvoll, damit eine Reaktivierung des Stoffwechsels vermieden wird. Gemäß der vorausgestellten Untersuchungen zum Einfluß der Temperatur sollte daher eine Grenze von -10°C während der Trennung nicht überschritten werden (s. Tabelle 16).

Als Trennmethode bietet sich die Filtration bei tiefen Temperaturen an. Diese Trennung wird als Kryofiltration bezeichnet. Dabei wird die gesamte Nutscheinheit der Filtrations-Apparatur durch Umspülen mit kühlem Methanol auf -50°C vorgekühlt. Die Probenahme erfolgt in Methanol (-70°C) mit nachfolgender Temperierung auf -20°C um ein Gefrieren der Probe zu vermeiden (Methode C, s. Abschnitt 4.1.1).

Während der Filtration wird von der thermischen Hystereseeigenschaft biologischer Proben gezielt Gebrauch gemacht: die Dynamik des Abkühlvorgangs unterscheidet sich in seinem zeitlichen Temperaturverlauf deutlich von der Dynamik des Erwärmens (s. Abbildung 40). Letzterer verläuft deutlich langsamer. Um von einer Temperatur von -20°C die Temperaturgrenze von -10°C zu erreichen, werden bei einer Umgebungstemperatur von 25°C nachweislich 120 sec benötigt. Genau innerhalb dieser Zeitspanne von 2 min wird die Kryofiltration durchgeführt. Unmittelbar daraufhin wird der Filter mit dem Filterkuchen in das Extraktionsmittel (-20°C) überführt.

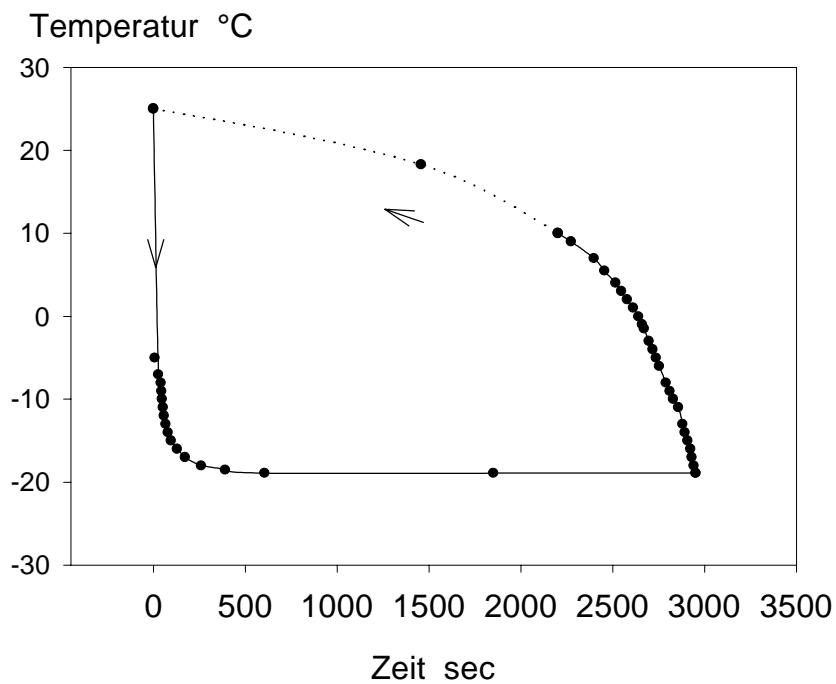
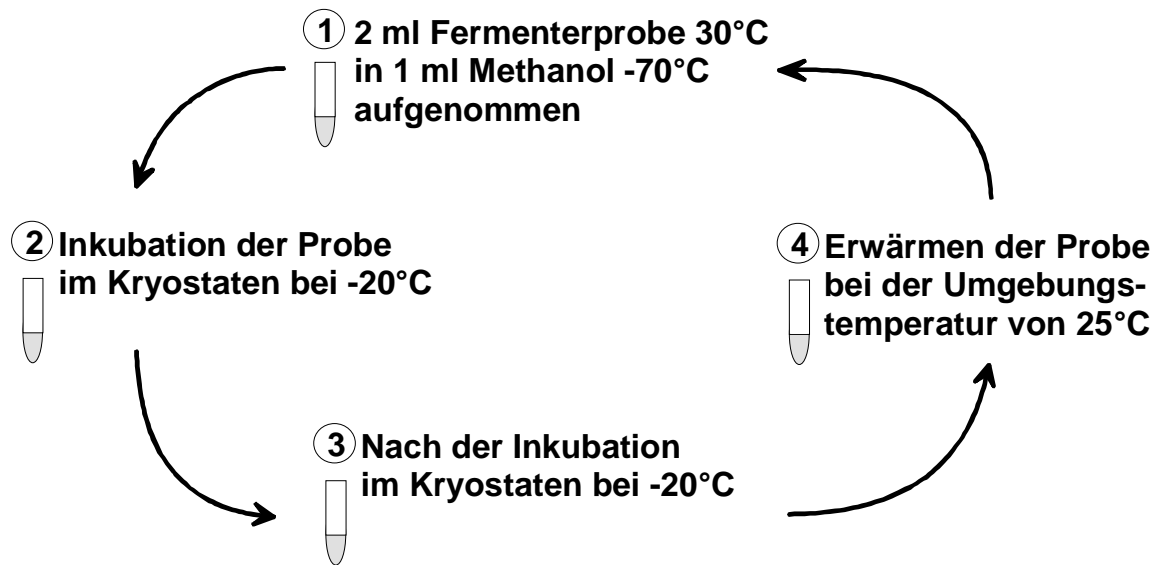


Abbildung 40. Hystereseeigenschaften einer biologischen Probe beim Abkühlen durch abruptes Einspritzen von 2 ml Fermenterprobe in 1 ml Methanol -70°C , Temperierung im Kryostaten auf -20°C und anschließende Erwärmung bei einer Umgebungstemperatur von 25°C . Oben: Ablaufschema des Experiments. Unten: Verlauf der Temperatur.

4.3 Zusammenfassung der Desaktivierungs- und Extraktionsmethoden

Aus den vorgestellten Untersuchungen lassen sich optimale Vorgehensweisen zum Quenching und Extraktion von Fermenterproben für die quantitativen Bestimmung der Metabolite G6P, F6P und F-2,6-BP erschließen. Diese Vorgehensweisen sind in der Abbildung 41 zusammengefaßt. Dabei werden die Zellen für die Bestimmung der Metabolite G6P und F6P mit der Methode A (Quenching in PCA -20°C ; s. Abschnitt 4.1.1) bei einem Volumenverhältnis von 2:1 (Probe zu Quenching-Medium) desaktiviert und anschließend durch Gefrier-Tau Zyklen aufgebrochen. Einzelne Kontrollmessungen dieser Metabolite mit der Methode C (Quenching in Methanol -70°C und anschließende Temperierung bei -20°C ; s. Abschnitt 4.1.1), unter stationären und dynamischen Bedingungen, führten zu den selben Ergebnissen wie bei der Methode A. Grund für die Übereinstimmung der Ergebnisse liegt offenbar in der Stabilität dieser Metabolite unter den herrschenden physiologischen Bedingungen. Die Wahl der Methode A bei der Bestimmung dieser Metabolite ist letzten Endes auf die einfachere Handhabung dieser Methode zurückzuführen. Bei der Bestimmung von F-2,6-BP wurde zur Desaktivierung des Metabolismus die Methode C bei einem Volumenverhältnis von 2:1 (Probe zu Quenching-Medium) gewählt. Damit war es möglich im Anschluß die Zellen durch Kryofiltration vom extrazellulären Medium zu trennen. Der Aufschluß der Zellen erfolgte über Gefrier-Tau Zyklen in Gegenwart des Extraktionsmittels KOH.

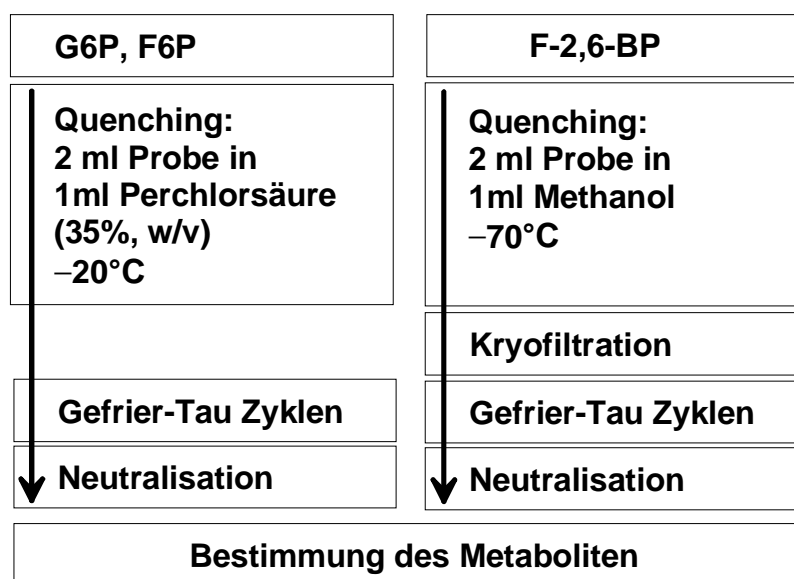


Abbildung 41. Desaktivierung und Aufschluß von Zellen für verschiedene Metabolite.

Auf eine weitere Optimierung der Methoden zur Desaktivierung des Metabolismus durch HgCl_2 wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet, hierzu sei auf die entsprechenden Arbeiten von THEOBALD (1995) und DE NOBEL ET AL. (1990) verwiesen.

4.4 Das PFK1 Systems

4.4.1 Das V-Modell

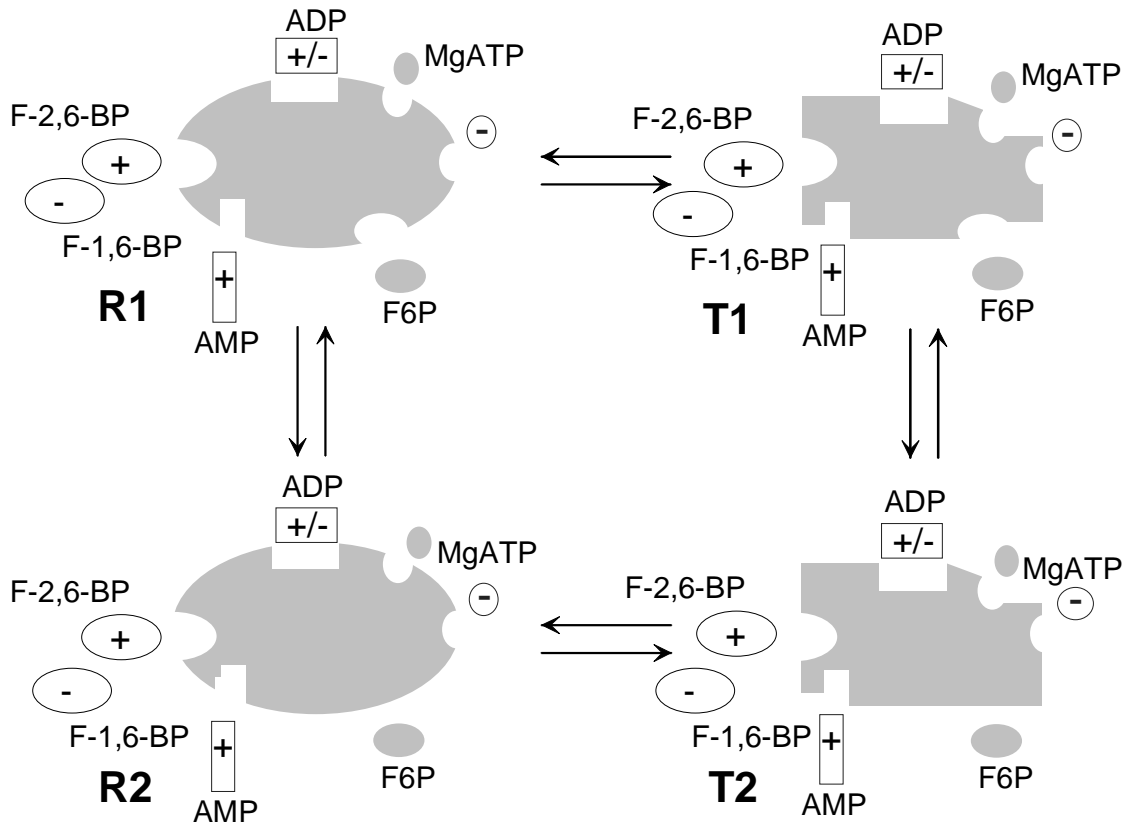


Abbildung 42. Reaktionskinetischer Mechanismus eines einzigen PFK1 Protomers entsprechend dem V-Modell, das positive Zeichen (+) kennzeichnet eine Aktivierung das negative (–) hingegen eine Inhibition durch den betreffenden Effektor. Dieses Modell entspricht dem in Abbildung 12 gezeigten F-Modell mit zusätzlicher Berücksichtigung der Modulation durch F-1,6-BP und F-2,6-BP.

In Kapitel 2 wurden bereits die aus der Literatur bekannten Modelle zur reaktionskinetischen Beschreibung der PFK1, die mit *in-vitro* Messungen validiert wurden, vorgestellt. Während das M-Modell nicht in der Lage war die ausgeprägten allosterischen Eigenschaften des Enzyms bezüglich des Substrats F6P zu beschreiben, vernachlässigt das F-Modell die Wirkung des positiven Effektors F-2,6-BP und den negativen Effektor F-1,6-BP, welche an die selbe Bindungsstelle binden (s. Tab. 1 und Abbildung 42). Das HK-Modell setzt überdies eine vernachlässigbar niedrige Affinität des Enzyms bezüglich F6P im Zustand T1 voraus.

Eine allgemeine Untersuchung der kinetischen Eigenschaften des Enzyms bezüglich der verschiedenen Substrate bzw. Effektoren erfordert einen entsprechenden allgemeinen kinetischen Ansatz. Ein solcher Ansatz sollte einerseits in der Lage sein, die kinetischen Eigenschaften des Enzyms unter verschiedenen Versuchsbedingungen korrekt zu beschreiben, andererseits jedoch für die jeweiligen experimentellen Bedingungen bzw. physiologischen Zuständen Möglichkeiten zur Modellreduktion anbieten.

Ein geeigneter Ansatz läßt sich durch Erweiterung des F-Modells unter zusätzlicher Berücksichtigung des Beitrags der Effektoren F-2,6-BP und F-1,6-BP herleiten. Dieser erweiterte Ansatz (s. Reaktionsschema Abbildung 42) wird im folgenden als V-Modell bezeichnet. Zu diesem Zweck wurde die Annahme getroffen, daß F-2,6-BP als positiver Effektor mit der Affinität $K_{F2,6BP,A}$ bzw. $K_{F2,6BP,I}$ an die Zustände R1, T1 bzw. R2, T2 bindet und mit dem negativen Effektor F-1,6-BP um dieselbe Bindungsstelle konkurriert. Die Bindung des F-1,6-BP an die Zustände R1, T1 bzw. R2, T2 erfolgt mit der Affinität $K_{F1,6BP,A}$ bzw. $K_{F1,6BP,I}$.

Zur Herleitung des entsprechenden mathematischen Ansatzes wurde die Effektorfunktion im F-Modell:

$$Q = \frac{Z}{N} \quad (4.1)$$

mit einem zusätzlichen Term sowohl im Zähler:

$$Z = (1 + \alpha_{ATP,I}) (1 + \alpha_{ADP,I}) (1 + \alpha_{AMP,I}) \left(1 + \frac{(\alpha_{F1,6BPP,A} + \alpha_{F2,6BPP,A})}{\dots} \right) \quad (4.2)$$

als auch im Nenner:

$$N = (1 + \alpha_{ATP,A}) (1 + \alpha_{ADP,A}) (1 + \alpha_{AMP,A}) \left(1 + \frac{(\alpha_{F1,6BP,I} + \alpha_{F2,6BP,I})}{\dots} \right) \quad (4.3)$$

erweitert, wobei folgende zusätzliche Abkürzungen verwendet wurden:

$$\begin{cases} \alpha_{F2,6BP,I} = C_{F2,6BP} K_{F2,6BP,I} \\ \alpha_{F2,6BP,A} = C_{F2,6BP} K_{F2,6BP,A} \\ \alpha_{F1,6BP,I} = C_{F1,6BP} K_{F1,6BP,I} \\ \alpha_{F1,6BP,A} = C_{F1,6BP} K_{F1,6BP,A} \end{cases} \quad (4.4)$$

Im Unterschied zu den Adeninnukleotide wird dabei angenommen (s. Abbildung 42), daß für F-1,6-BP und F-2,6-BP nur eine Bindungsstelle zur Verfügung steht.

Die reaktionskinetischen Gleichungen des Modells sind dem Anhang 1 zu entnehmen. Aus der Reduktion des V-Modells entsprechend Abbildung 43 lassen sich die aus der Literatur bekannten *in-vitro* reaktionskinetischen Modelle für die PFK1 herleiten.

Im folgenden sollten die kinetischen Parameter der einzelnen Modelle unter *in-vitro* bzw. *in-situ* Bedingungen bestimmt und die Qualität der einzelnen Modelle anhand einer statistischen Analyse verglichen werden. Im Anschluß sollte das Modell der Wahl zur Beschreibung der kinetischen Eigenschaften des Enzyms unter *in-vivo* Bedingungen herangezogen werden. Schließlich sollten anhand einer Parameterstudie die Parameter des Modells unter *in-vitro*, *in-situ* und *in-vivo* Bedingungen verglichen werden. Da das M-Modell weder in der Lage ist, die ausgeprägten allosterischen Eigenschaften des Enzyms bezüglich F6P zu beschreiben noch

die Wirkung der Effektoren berücksichtigt, wurde es bei den folgenden Untersuchungen ausgeschlossen.

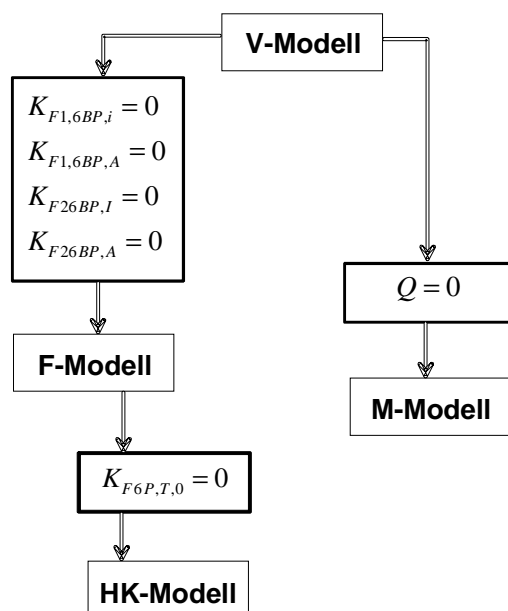


Abbildung 43. Herleitung der aus der Literatur bekannten Modelle aus dem V-Modell.

4.4.2 Parameteridentifikation des V-Modells für *in-vitro* und *in-situ* Bedingungen

Die Identifikation der Modell-Parameter unter *in-vitro* bzw. *in-situ* Bedingungen erfolgt anhand von verschiedenen Datensätzen, welche in den Abbildung 44 bis Abbildung 48 zusammengestellt sind. Die in den Darstellungen gezeigten *in-vitro* Meßdaten stammen aus den Publikationen von REUTER ET AL. (1979) und PRZYBILSKY (1986). Die angegebenen *in-situ* Daten wurden in eigenen Messungen mit den in Abschnitt (3.12.2) zusammengestellten Methoden ermittelt. Im folgenden wurden die einzelnen Schritte der sequenziellen Parameterschätzung zusammengestellt:

1. Im ersten Schritt wurden Parameter, die den Einfluß von F6P und MgATP widerspiegeln identifiziert. Dies erfolgt anhand des Datensatzes I (s. Abbildung 44), bei der nur die Konzentrationen von F6P und MgATP in Abwesenheit anderer Effektoren variiert wurden.
2. Im zweiten Schritt wurden die bereits geschätzten Parameter bezüglich F6P und MgATP konstant gehalten und die Identifikation der Parameter bezüglich ADP durchgeführt. Diese Parameterschätzung erfolgte anhand des Datensatzes II (s. Abbildung 45) bei der die Konzentrationen von F6P, MgATP und ADP variiert wurden.
3. Im nächsten Schritt wurden die Parameter bezüglich F6P und MgATP konstant gehalten und die Identifikation der Parameter bezüglich der Effektoren AMP durchgeführt. Dies erfolgte anhand des Datensatzes III (s. Abbildung 46), bei dem die Konzentration von MgATP und AMP variiert wurden.

4. Anschließend wurden die Parameter bezüglich F6P und MgATP konstant gehalten und die Identifikation der Parameter bezüglich der Effektoren F-2,6-BP durchgeführt. Dies erfolgte anhand des Datensatzes IV (s. Abbildung 47), bei dem nur die Konzentrationen von MgATP und F-2,6-BP in Abwesenheit anderer Effektoren variiert wurden.
5. Zuletzt wurden die Parameter bezüglich F6P, MgATP und F-2,6-BP konstant gehalten und die Identifikation der Parameter bezüglich F-1,6-BP durchgeführt. Dies erfolgte anhand des Datensatzes V (s. Abbildung 48), bei dem nur die Konzentrationen von MgATP und F-1,6-BP in Gegenwart von F-2,6-BP variiert wurden.

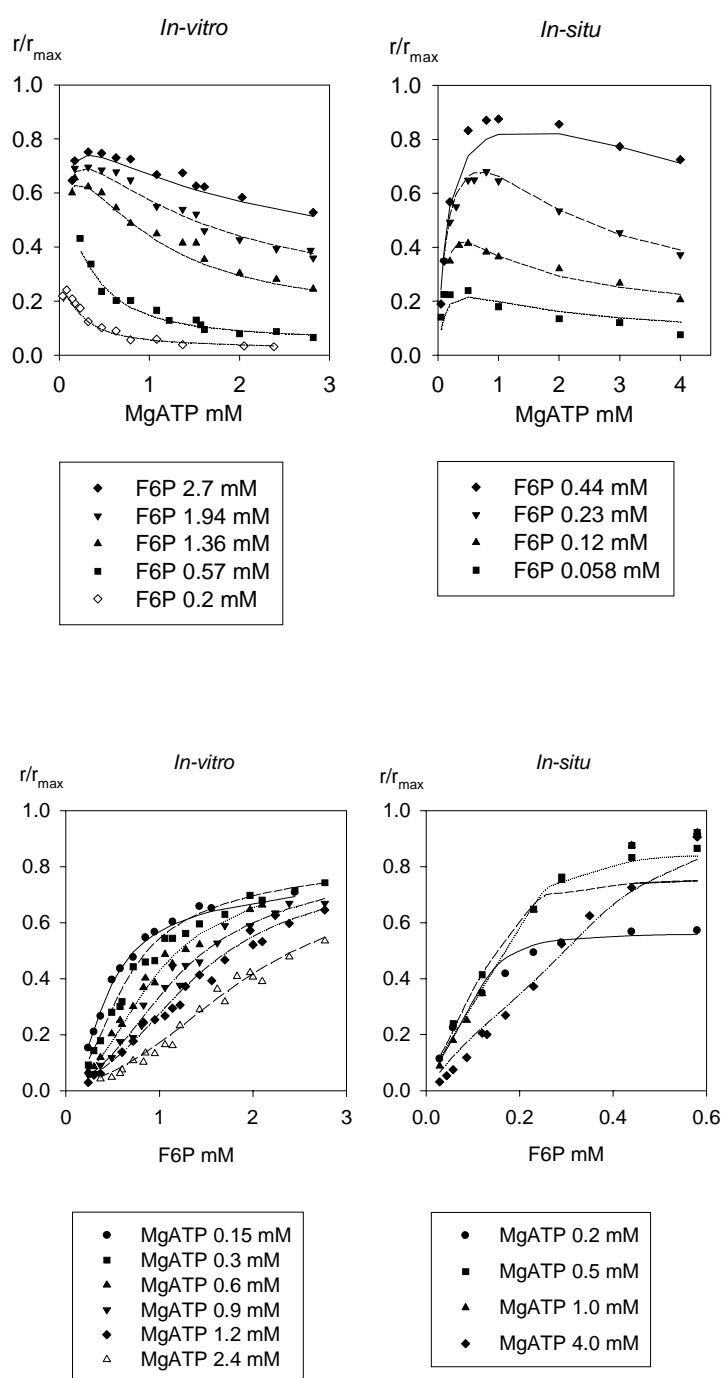


Abbildung 44: Datensatz I (REUTER ET AL., 1979): Aktivität der PFK1 *in-vitro* (links) bzw. *in-situ* (rechts) in Abhängigkeit von MgATP und F6P, Vergleich zwischen Modellsimulation und Experiment (s. a. Abschnitt 4.4.3.1).

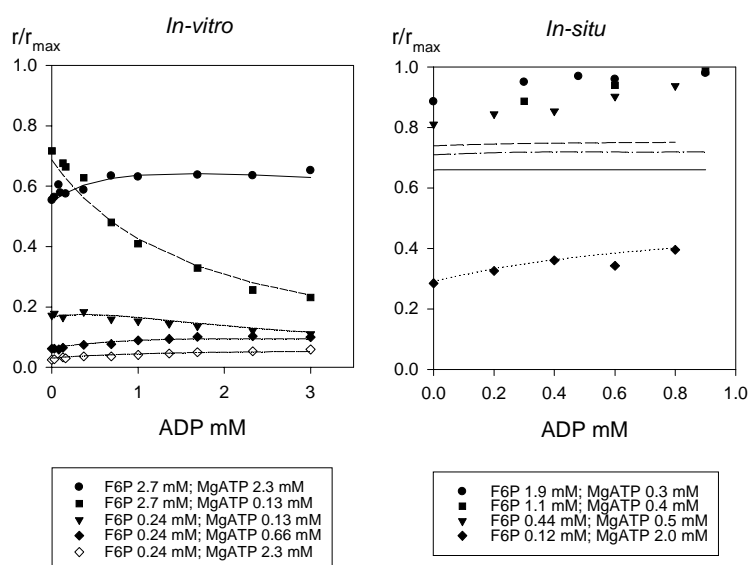


Abbildung 45. Datensatz II (REUTER ET AL., 1979): Aktivität der PFK1 unter *in-vitro* (links) bzw. *in-situ* (rechts) Bedingungen in Abhängigkeit von MgATP und ADP, Vergleich zwischen Modellsimulation (V-Modell) und Experiment (s. a.4.4.3.4).

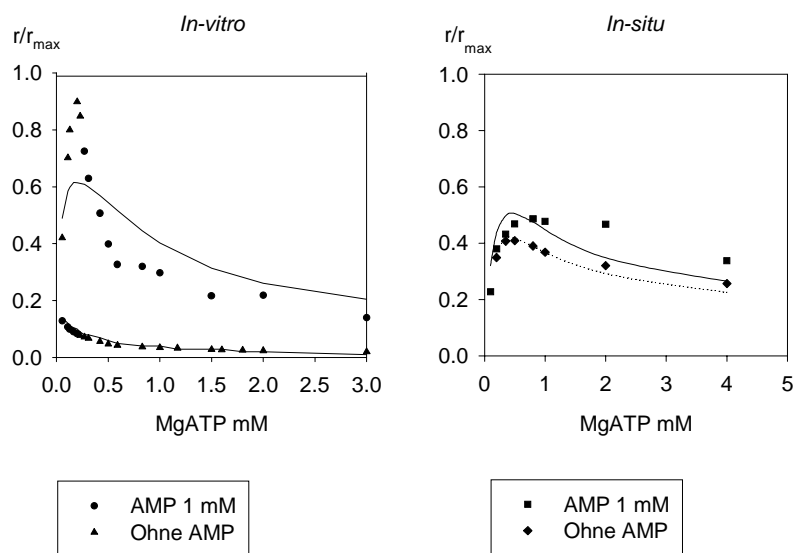


Abbildung 46. Datensatz III (PRZYBILSKY, 1986): Aktivität der PFK1 unter *in-vitro* Bedingungen (links, F6P 0.3 mM) bzw. *in-situ* (rechts, F6P 0.12 mM) in Abhängigkeit von MgATP und AMP, Vergleich zwischen Modellsimulation (V-Modell) und Experiment (s. a.4.4.3.2).

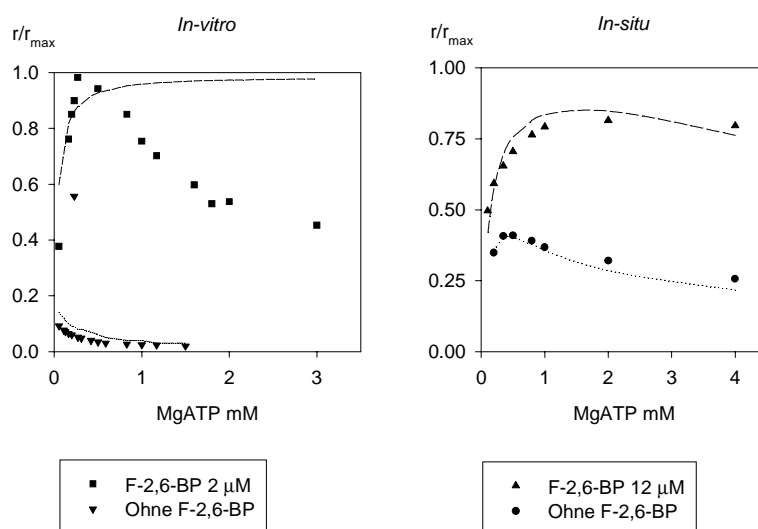


Abbildung 47. Datensatz IV (PRZYBILSKY, 1986): Aktivität der PFK1 *in-vitro* (links, F6P 0.3 mM) bzw. *in-situ* (rechts, F6P 0.12 mM) in Abhängigkeit von MgATP und F-2,6-BP, Vergleich zwischen Modellsimulation (V-Modell) und Experiment (s. a. Abschnitt 4.4.3.3).

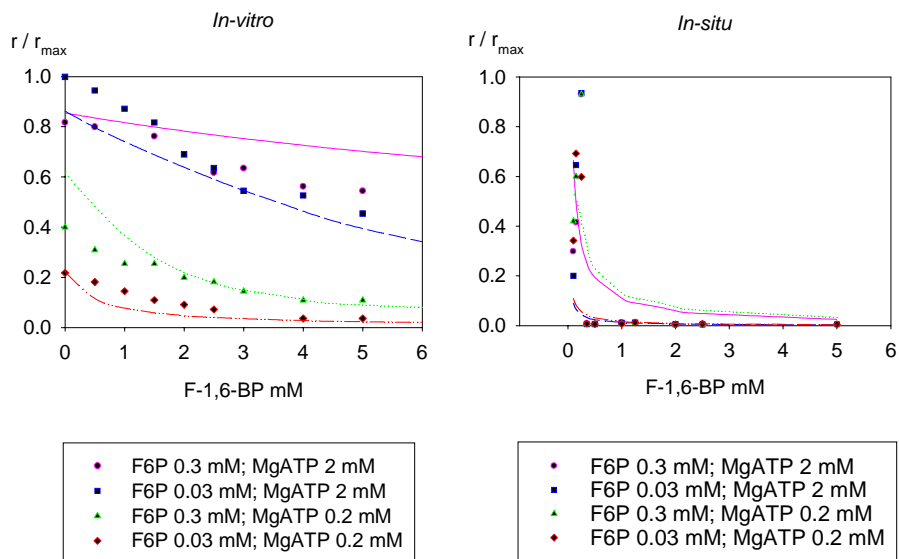


Abbildung 48. Datensatz V (PRZYBILSKY, 1986): Aktivität der PFK1 unter *in-vitro* (links) bzw. *in-situ* (rechts) Bedingungen in Abhängigkeit von F6P, MgATP und F-1,6-BP, Vergleich zwischen Modellsimulation (V-Modell) und Experiment (s. a. Abschnitt 4.4.3.5). Die Konzentration von F-2,6-BP beträgt 20 μ M.

Zur Identifikation der jeweiligen Parameter wurde das Marquardt-Levenberg Algorithmus eingesetzt (MARQUARDT, D. W., 1963) (PRESS ET AL., 1986). Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Software-Packets SIGMAPLOT™ (SPSS Inc., CA USA) durchgeführt. Als Optimierungskriterium diente die relative Fehlerquadratsumme entsprechend dem folgenden Ansatz:

$$\varepsilon_{rel,PFK1} = \sum_k \left(\frac{r_{PFK1}(C_k) - \hat{r}_{PFK1}(C_k)}{r_{PFK1}(C_k)} \right)^2 \quad (4.5)$$

Tabelle 17. Ergebnisse der Parameterschätzung für das F-, HK und V-Modell unter *in-vitro* und *in-situ* Bedingungen.

Parameter	<i>In-vitro</i>			<i>In-situ</i>		
	V-Modell	F-Modell	HK-Modell	V-Modell	F-Modell	HK-Modell
L ₀	40.57	40.57	10.86	3.4e-9	3.4e-9	34.74
K _{ATP,S}	27.15	27.15	85.80	6.55	6.55	9.4
K _{ATP,I}	0.4	0.4	-	0.11	0.11	-
K _{ATP,A}	6.48	6.48	1.56	1.1	1.1	0.56
K _{F6P,R0}	4.48	4.48	1.84	9.61	9.61	15.40
K _{F6P,T0}	0.92	0.92	-	200.18	200.18	-
K _{ADP,I}	1.22	1.22	5.0	2.15	2.15	0.46
K _{ADP,A}	0.52	0.52	4.0	1.13	1.13	0
K _{ADP,C}	3.07	3.07	4.0	0	0	0
K _{AMP,I}	NI ^a	NI ^a	-	NI ^a	NI ^a	-
K _{AMP,A}	NI ^a	NI ^a	-	NI ^a	NI ^a	-
K _{F26BP,I}	NI ^a	-	-	NI ^a	-	-
K _{F26BP,A}	NI ^a	-	-	NI ^a	-	-
K _{F16BP,I}	28.43	-	-	0.0	-	-
K _{F16BP,A}	273.2	-	-	1.74e+4	-	-

^a NI: Nicht identifizierbar.

Die Ergebnisse der Parameterschätzung für das V-, F- bzw. HK-Modell sind in der Tabelle 17 zusammengestellt. Der Tabelle 17 ist zu entnehmen, daß mit Ausnahme der Parameter $K_{F16BP,I}$ und $K_{F16BP,A}$, die Anzahl der identifizierten Modellparameter für das V- und F-Modell gleich sind.

Die Parameter $K_{F26BP,I}$ und $K_{F26BP,A}$, wie auch $K_{AMP,I}$ und $K_{AMP,A}$ sind jedoch aus folgenden Gründen nicht identifizierbar. Betrachtet man die Kontrollebene im jeweiligen Minimum der Fehlerquadratsumme $\varepsilon_{rel,PFKI}$, stellt man die in Abbildung 49 und Abbildung 50 gezeigten linearen Abhängigkeiten der Parameters $K_{F26BP,I}$ von $K_{F26BP,A}$, bzw. $K_{AMP,I}$ von $K_{AMP,A}$ fest.

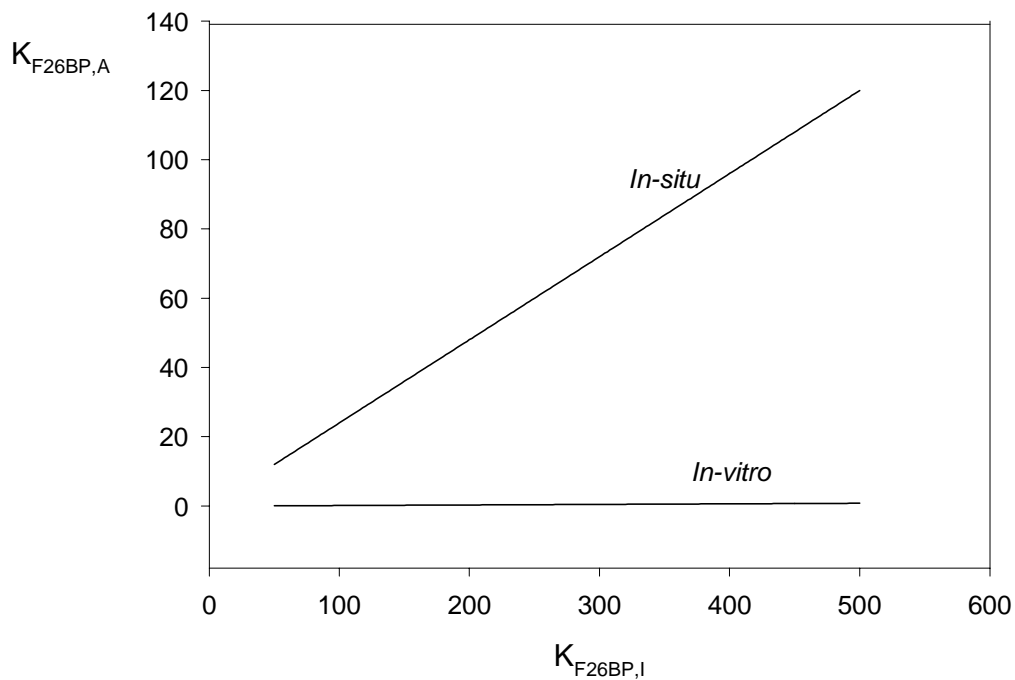


Abbildung 49. Minima der relativen Fehlerquadratsumme in der Parameterebene $(K_{F26BP,A}, K_{F26BP,I})$ für die Parameteridentifikation unter *in-vitro* bzw. *in-situ* Bedingungen.

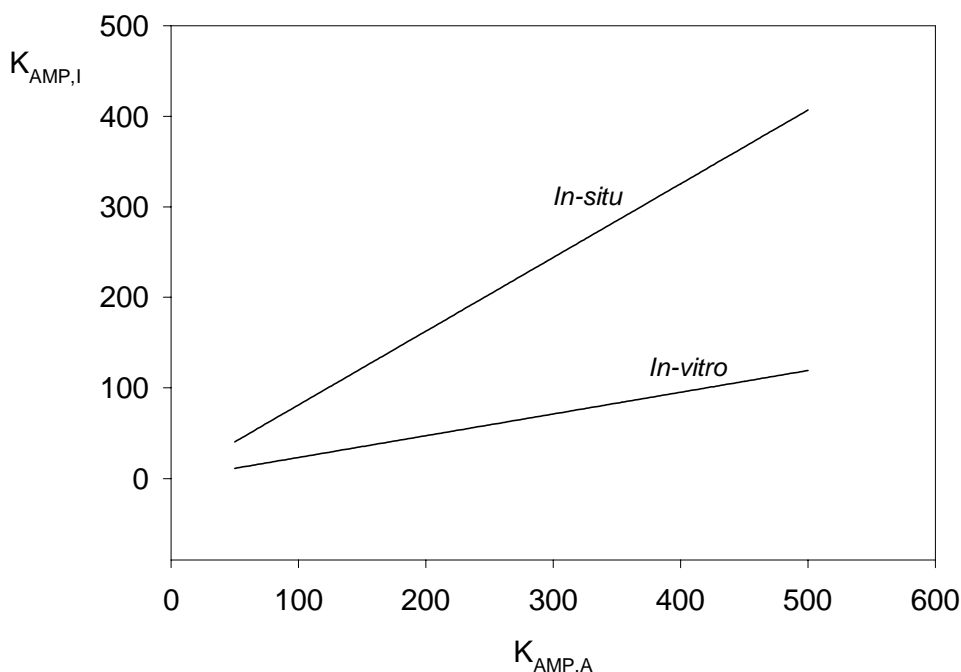


Abbildung 50. Minima der relativen Fehlerquadratsumme in der Parameterebene ($K_{AMP,A}, K_{AMP,I}$) für die Parameteridentifikation unter *in-vitro* bzw. *in-situ* Bedingungen.

Zur Bestimmung der linearen Abhängigkeiten entsprechend Abbildung 49 und Abbildung 50 wurde die Parameteridentifikation mit 500 verschiedenen Sätzen von Anfangsparametern durchgeführt. Die Anfangs-Parameter wurden innerhalb eines physiologisch relevanten Bereiches über einen Zufallsgenerator erzeugt. In der Tabelle 18 sind die entsprechenden mathematischen Gleichungen für die linearen Abhängigkeiten der Parameter zusammengefaßt. Diese Abhängigkeiten deuten auf strukturelle Mängel des Modells hin.

Tabelle 18. Lineare Abhängigkeiten der Parameter bezüglich F-2,6-BP bzw. AMP (V-Modell).

<i>In-vitro</i> mM	<i>In-situ</i> mM
$K_{F26BPA} = -0.05 + 0.0016 K_{F26BP,I}$	$K_{F26BPA} = -0.038 + 0.24 K_{F26BP,I}$
$K_{AMP,A} = -0.75 + 0.24 K_{AMP,I}$	$K_{AMP,A} = -0.176 + 0.814 K_{AMP,I}$

In der Tabelle 19 sind die in dieser Arbeit anhand von *in-vitro* Daten identifizierten Parameter mit Angaben aus der Literatur verglichen. Wegen der oben erwähnten Nicht-identifizierbarkeit der Parameter für AMP und F-2,6-BP, müssen die im Schriftum angegebenen Zahlenwerte für die Parameter angezweifelt werden.

Tabelle 19. Vergleich der Parameterwerte aus dieser Arbeit mit der Literatur.

<i>Parameter</i>	F	HK	F	HK
	Literatur ^a	Literatur ^b	Diese Arbeit	
L_0	1.55	14.75	40.57	10.86
$K_{ATP,S}$	30.2	32.26	27.15	85.80
$K_{ATP,I}$	0.34	-	0.4	-
$K_{ATP,A}$	5.6	4.0	6.48	1.56
$K_{F6P,RO}$	4.4	5.0	4.48	1.84
$K_{F6P,TO}$	0.66	-	0.92	-
$K_{ADP,I}$	0.45	5.0	1.22	5.0
$K_{ADP,A}$	0.2	4.0	0.52	4.0
$K_{ADP,C}$	4.0	4.0	3.07	4.0
$K_{AMP,I}$	NI ^c	-	NI ^c	-
$K_{AMP,A}$	NI ^c	-	NI ^c	-

^a Freyer (1977)^b Hofmann und Kopperschläger (1982)^c NI: Nicht identifizierbar

Für den weiteren Vergleich der Parameter sind zusätzlich die Konfidenzintervalle heranzuziehen, welche eine Aussage über die Verlässlichkeit der geschätzten Parameter erlauben. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konfidenzintervalle werden durch eine Linearisierung der Fehlerquadratoberfläche im Bereich der geschätzten Parameter mit Hilfe der partiellen Ableitungen berechnet (DRAPER UND SMITH, 1966). Diese geben für jeden Parameter das Intervall φ_i an, indem er sich mit 95%iger Wahrscheinlichkeit befindet. Dieses Intervall läßt sich für einen Parameter p_j wie folgt darstellen:

$$\varphi_i = [p_j - \delta p_j, p_j + \delta p_j] \quad (4.6)$$

Die Breite des Intervalls δp_j läßt sich nach DRAPER UND SMITH (1966) durch:

$$\delta p_j = 2 \sqrt{\mathbf{Z} s^2} \quad (4.7)$$

berechnen, wobei gilt:

$$\mathbf{Z} = (\mathbf{A} \cdot \mathbf{A})^{-1} \quad (4.8)$$

und:

$$s^2 = \frac{\mathcal{E}_{rel, PFK1}}{n - m} \quad (4.9)$$

Die Matrix \mathbf{A} enthält die partiellen Ableitungen des kinetischen Ansatzes bezüglich der einzelnen Parameter. Sie besitzt n Zeilen zu den n verschiedenen Werten des Zustandsvektors der Konzentrationen, $C_i (i=1\dots n)$, sowie m Spalten zu den m Parametern, die den Parametervektor $p_j (j=1\dots m)$ zusammensetzen. Zur Berechnung der einzelnen Elemente $a_{i,j}$ der Matrix \mathbf{A} gilt:

$$a_{i,j} = \left. \frac{\partial r_{PFK1}}{\partial p_j} \right|_{C_i} \quad (4.10)$$

Die Berechnung der Konfidenzintervalle erfolgte mit Hilfe des Software-Packets ENZYMFIT (Universität Stuttgart, Institut für Bioverfahrenstechnik). Ein breiter Konfidenzintervall deutet darauf hin, daß entweder das Modell ungeeignet ist oder der Informationsgehalt der Messung nicht ausreicht. Letzteres ist in der Regel dann der Fall, wenn in Bereichen gemessen wird, in denen die Parameter vergleichsweise geringe Sensitivität besitzen und daher schlecht identifiziert werden können. Durch die Matrix \mathbf{Z} wird die Sensitivität der jeweiligen Parameter in der Berechnung mit einbezogen.

In der Abbildung 51 sind die Konfidenzintervalle der Parameter für die einzelnen Modelle unter *in-situ* bzw. *in-vitro* Bedingungen verglichen. Sowohl unter *in-situ* als auch unter *in-vitro* Bedingungen liegen die Konfidenzintervalle der meisten Parameter für das HK-Modell niedriger als für das F- bzw. V-Modell. Eine Ausnahme stellen die Konfidenzintervalle der Parameter L_0 unter *in-situ* Bedingungen bzw. $K_{ATP,S}$ unter *in-vitro* Bedingungen, dar. Es ist nicht auszuschließen, daß hier ein zusätzlicher Mangel an Parametersensitivität durch ungünstig gewählte experimentelle Bedingungen vorliegt.

Die Ursache hierfür könnte entweder in der geringeren Zahl der zu identifizierenden Parameter oder aber in einer höheren Modellqualität liegen. Zur weiteren Untersuchung dieser Unterschiede wurde zusätzlich die relative Fehlerquadratsumme als Kriterium herangezogen. Aus einem Vergleich der Fehlerquadratsummen gemäß Abbildung 52 wird deutlich, daß das HK-Modell sowohl unter *in-vitro* als auch *in-situ* Bedingungen für den jeweiligen Datensatz (I bzw. II, s. Abbildung 44 bis Abbildung 48) eine signifikant höhere Fehlerquadratsumme aufweist.

Daraus geht hervor, daß die engeren Konfidenzintervalle beim HK Modell ihren Grund nicht in einer höheren Qualität des Modells sondern in der geringeren Anzahl der Modellparameter haben. Demnach ist zwar die Identifikationsgüte beim HK-Modell höher, dennoch beschreibt das F- bzw. V-Modell die kinetischen Eigenschaften des Enzyms signifikant besser. Die Unterschiede hinsichtlich der Modellqualität sind darauf zurückzuführen, daß beim HK-Modell die Affinitäten des Enzyms bezüglich F6P im Konformationszustand T vernachlässigt werden. Daraus läßt sich schließen, daß die Berücksichtigung dieser Affinitäten einen entscheidenden Beitrag zur Verbesserung der Beschreibung der kinetischen Eigenschaften der PFK1 unter *in-vitro* bzw. *in-situ* Bedingungen leistet.

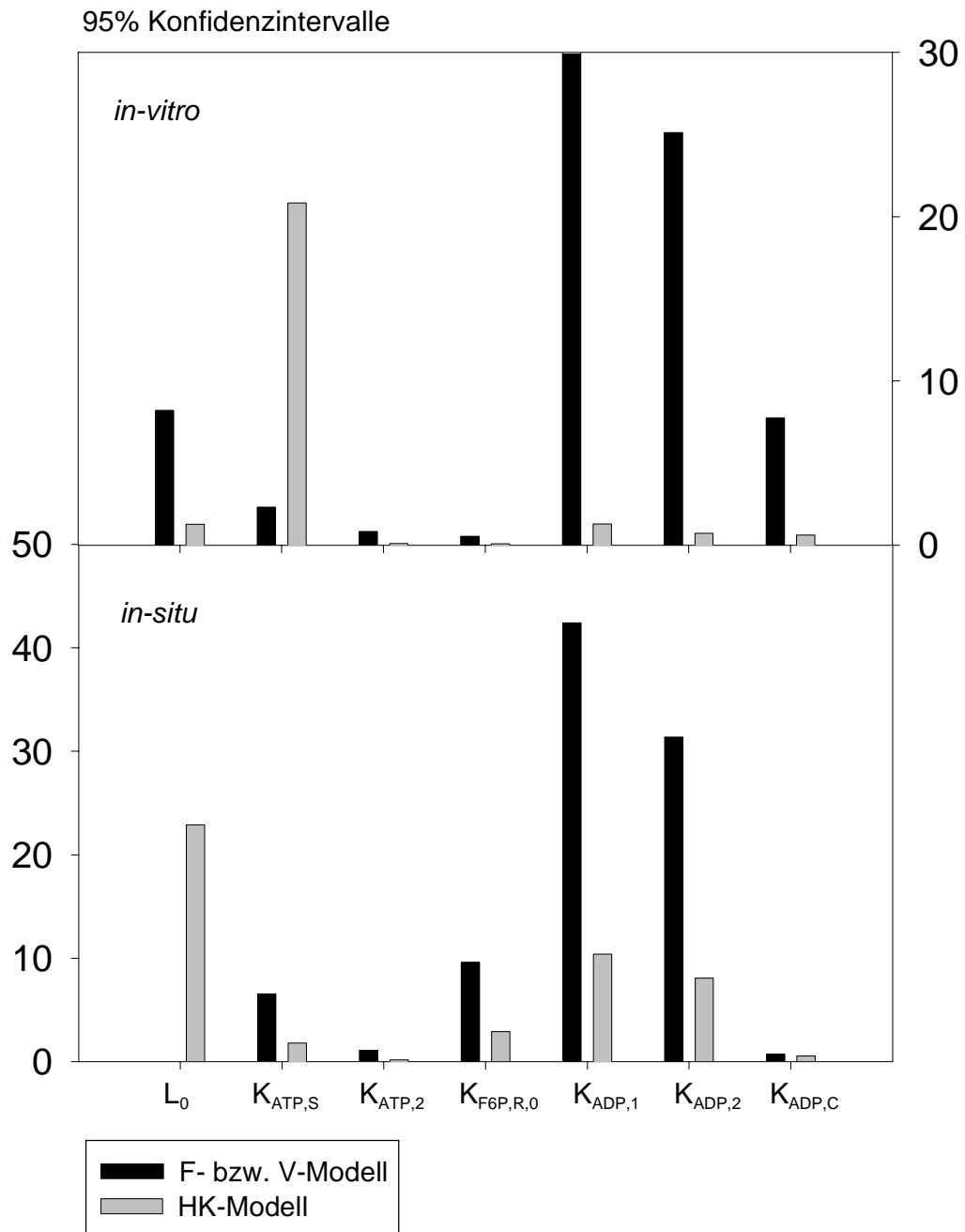


Abbildung 51: Vergleich der Konfidenzintervalle einzelner Modellparameter für das F-/V-, HK-Modell unter *in-vitro* (oben) bzw. *in-situ* (unten) Bedingungen.

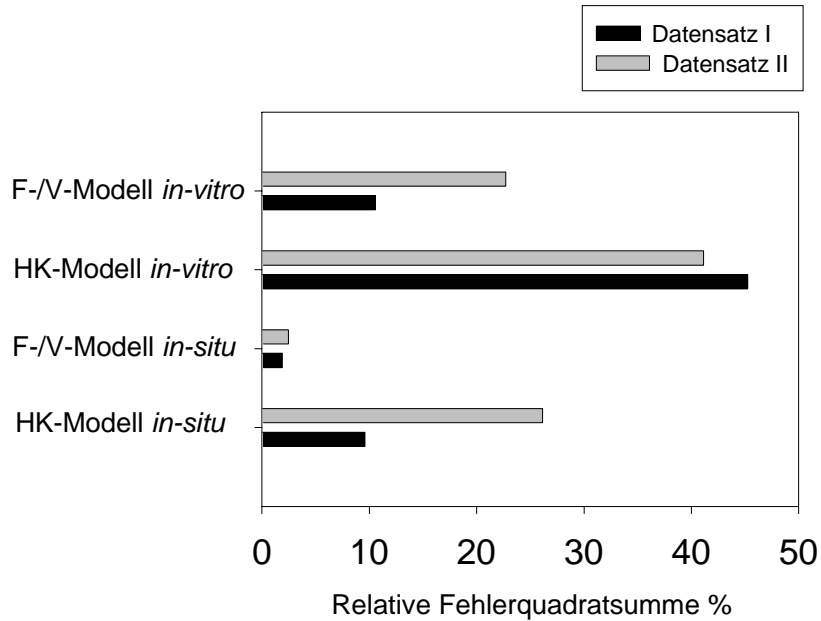


Abbildung 52. Relative Fehlerquadratsummen für das HK- bzw. F-/V-Modell unter *in-vitro* bzw. *in-situ* Bedingungen (Datensatz I bzw. II, s. Abbildung 44 bis Abbildung 48).

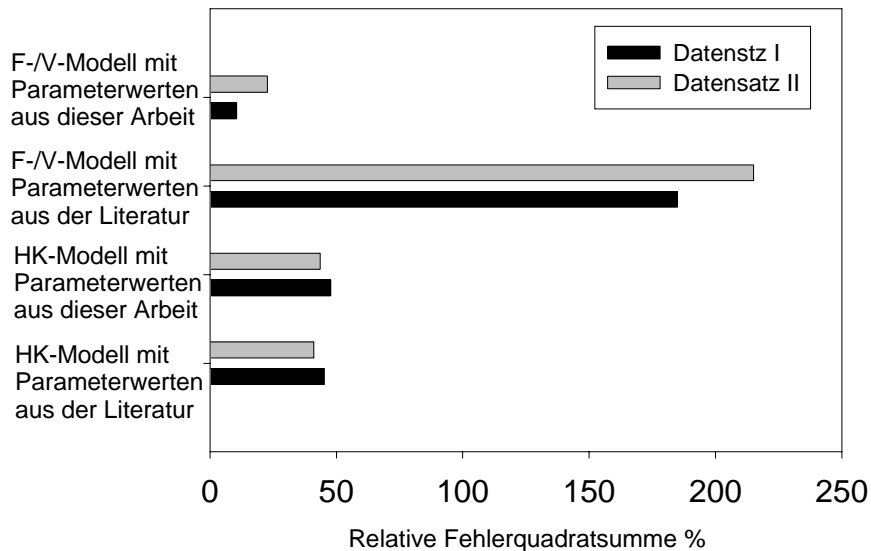


Abbildung 53. Vergleich der relativen Fehlerquadratsummen im HK- bzw. F/V-Modell bei Verwendung von Parameterwerten aus der Literatur (FREYER, 1977) (HOFMANN UND KOPPERSCHLÄGER, 1982) bzw. dieser Arbeit unter *in-vitro* Bedingungen (Datensatz I bzw. II, s. Abbildung 44 bis Abbildung 48).

Schließlich wurden die geschätzten Parameterwerte mit entsprechenden Literaturwerten (FREYER, 1977) (HOFMANN UND KOPPERSCHLÄGER, 1982) aus *in-vitro* Messungen verglichen (s. Tabelle 19). Als Kriterium dienten wiederum die Konfidenzintervalle bzw. die relativen Fehlerquadratsummen. Der Vergleich der relativen Fehlerquadratsummen entsprechend (s. Abbildung 53) läßt auf eine niedrige Identifikationsgüte bei den Literaturwerten schließen (FREYER, 1977) (HOFMANN UND KOPPERSCHLÄGER, 1982). Dies läßt sich auch durch die Konfidenzintervalle bestätigen, die in den Abbildung 54 und Abbildung 55 gezeigt sind. Man erkennt, daß mit Ausnahme der Parametern $K_{ATP,S}$ im HK-Modell und L_0 im V-Modell, die Literaturwerte zu breiteren Konfidenzintervallen führen.

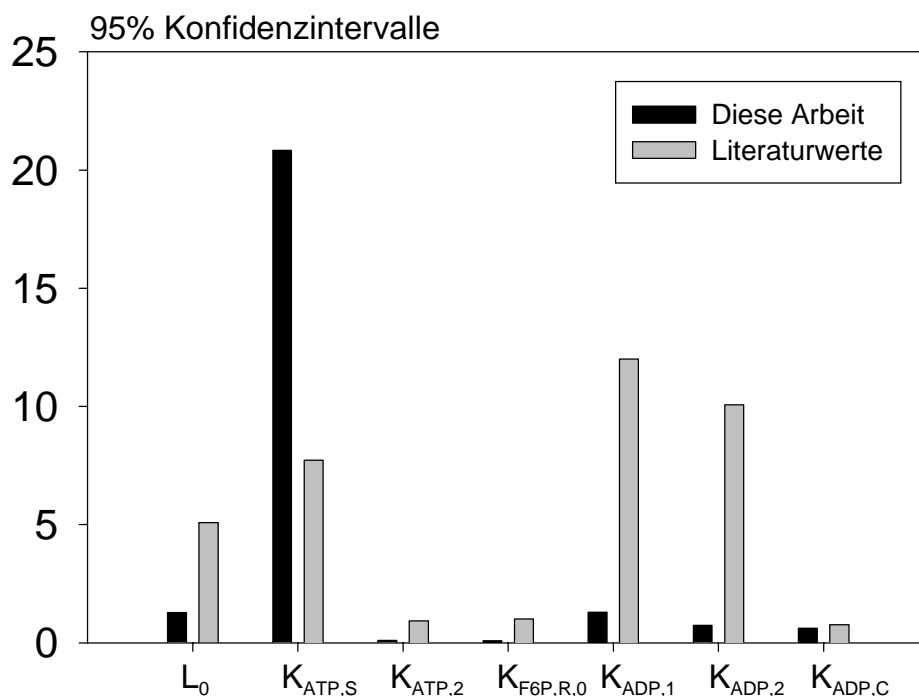


Abbildung 54. Vergleich der Konfidenzintervalle für das HK-Modell bei Verwendung der Parameterwerte aus der Literatur (FREYER, 1977) (HOFMANN UND KOPPERSCHLÄGER, 1982) bzw. dieser Arbeit unter *in-vitro* Bedingungen.

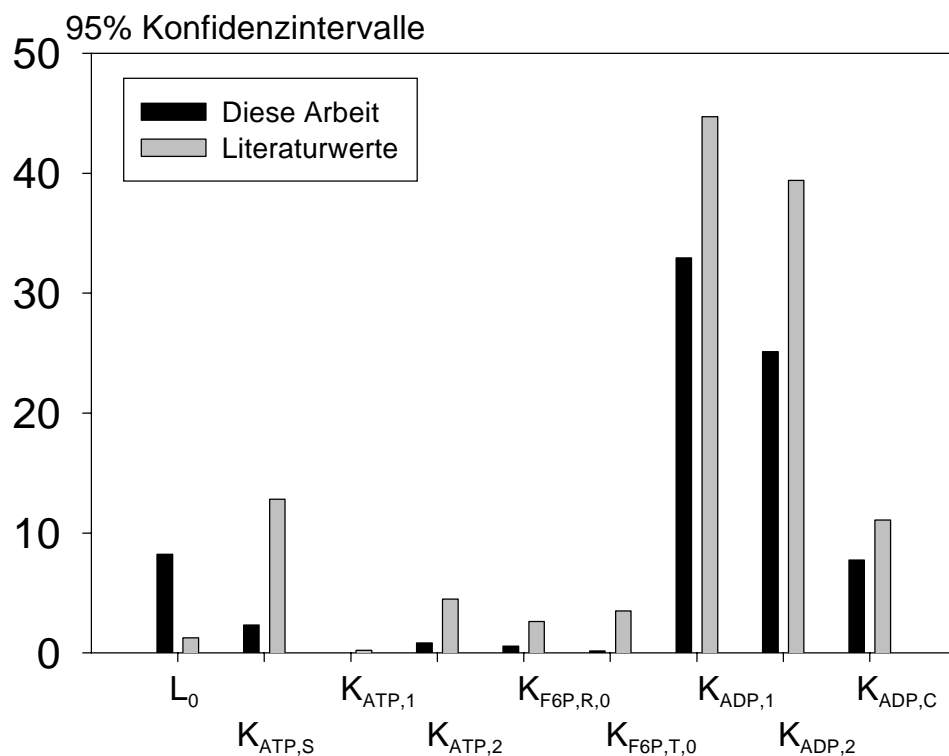


Abbildung 55. Vergleich der Konfidenzintervalle für das V-Modell unter Einsatz der Parameterwerte aus der Literatur (FREYER, 1977) (HOFMANN UND KOPPERSCHLÄGER, 1982) bzw. dieser Arbeit unter *in-vitro* Bedingungen.

4.4.3 Vergleich der kinetischen Parameter für *in-vitro* und *in-situ* Bedingungen

Im folgenden werden die reaktionskinetischen Eigenschaften der PFK1 unter *in-vitro* bzw. *in-situ* Bedingungen anhand des V-Modells und den entsprechenden experimentellen Daten näher untersucht.

4.4.3.1 Der Einfluß der Substrate F6P und MgATP

In der Abbildung 56 sind die Ergebnisse der Simulation des V-Modells für verschiedene MgATP und F6P Konzentrationen den entsprechenden experimentellen Daten gegenüber gestellt.

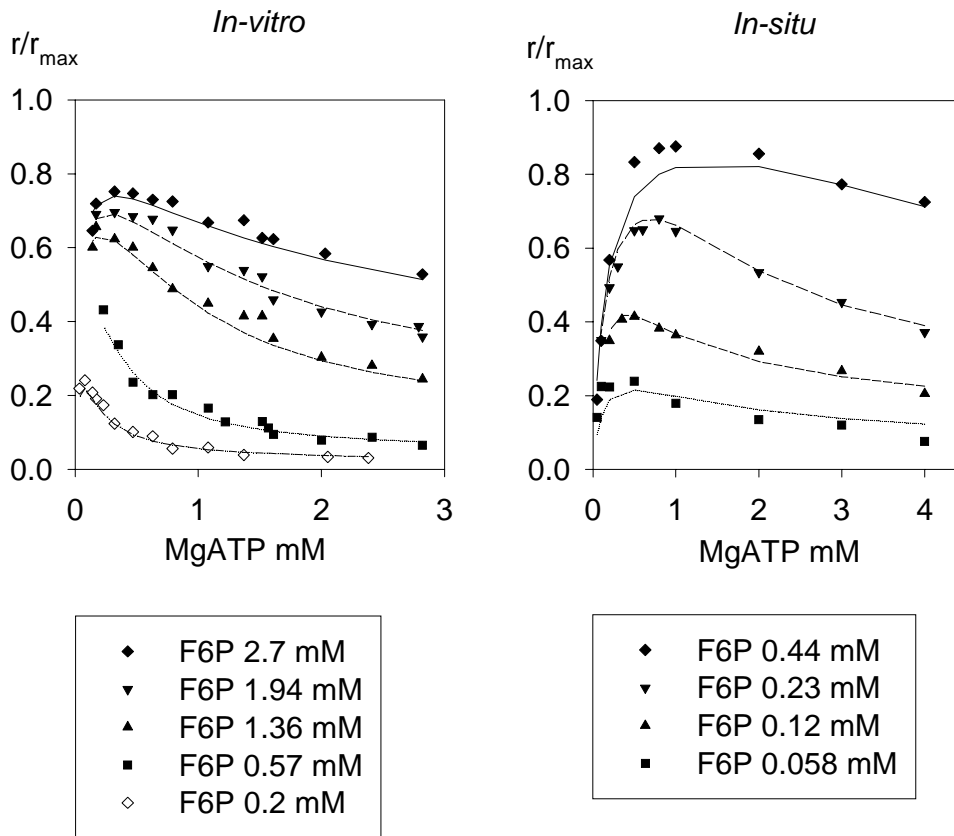


Abbildung 56. Aktivität der PFK1 *in-vitro* (links) bzw. *in-situ* (rechts) in Abhängigkeit von MgATP und F6P: Vergleich zwischen Modellsimulation und Experiment.

Wie bereits in Abschnitt (2.1.1.1) erwähnt, folgt die Aktivität des Enzyms bei niedrigen MgATP Konzentrationen sowohl *in-situ* als auch *in-vitro* einer Michaelis-Menten Kinetik. Bei höheren Konzentrationen hingegen, wirkt MgATP in beiden Fällen als allosterischer Inhibitor des Enzyms.

Allerdings beobachtet man Unterschiede in der inhibierenden Wirkung des MgATP unter *in-vitro* und *in-situ* Bedingungen. In der Abbildung 57 ist ein Ausschnitt der *in-situ* bzw. *in-vitro* Messungen in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich aufgetragen. In diesem Ausschnitt wird deutlich, daß bei vergleichbaren F6P- und MgATP-Konzentrationen die inhibierende Wirkung von MgATP *in-vitro* deutlich stärker ausgeprägt ist als unter *in-situ* Bedingungen.

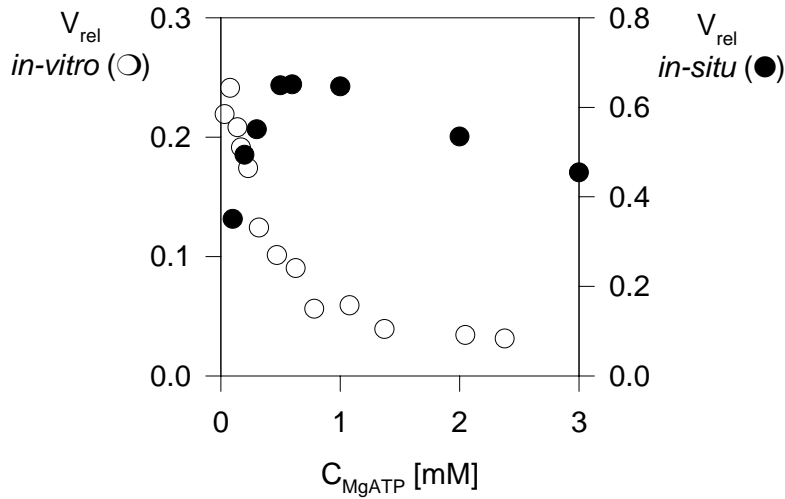


Abbildung 57. Aktivität der PFK1 in Abhängigkeit von MgATP: Vergleich *in-vitro* (0.23 mM F6P) und *in-situ* (0.27 mM F6P).

Diese Beobachtung läßt sich weiter interpretieren. Der Wert für den Allosteriefaktor L_0 liegt unter *in-situ* Bedingungen (s. Tabelle 17) um drei Größenordnungen niedriger als unter *in-vitro* Bedingungen. Der niedrigere Wert von L_0 sorgt für einen niedrigeren Beitrag der Effektoren (u.a. MgATP) zur Regulation des Enzyms, es gilt nämlich:

$$L = \frac{T}{R} = L_0 \left(\frac{1 + \alpha_{F6P,T}}{1 + \alpha_{F6P,R}} \right)^8 = L_0 f(C_{\text{Effektor}}, K_{\text{Effektor}}) \quad (4.11)$$

wobei gilt:

$$r_{\text{PFK1}} = f(L) \quad (4.11.a)$$

Darüber hinaus deutet der niedrige Wert für L_0 unter *in-situ* Bedingungen daraufhin, daß sich das Enzym in Abwesenheit der Liganden nahezu vollständig im Konformationszustand R befindet, bei der eine höhere Affinität zum Substrat F6P vorliegt.

Schließlich geht aus der Abbildung 57 auch hervor, daß die MgATP-Konzentration, bei der die maximale Aktivität erreicht wird, unter *in-situ* Bedingungen 7-fach höher als unter *in-vitro* Bedingungen liegt. Demnach weist das Enzym *in-situ* eine geringere Affinität zum Substrat MgATP auf als unter *in-vitro* Bedingungen. Dieser Zusammenhang wird durch den Wert des geschätzten Parameters $K_{ATP,S}$ (s. Tabelle 17) bestätigt: Der Wert für diese Affinitätskonstante liegt *in-vitro* deutlich höher als *in-situ*.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß homologe Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den Enzymmolekülen der PFK1 sowohl die Affinität des Enzyms bezüglich MgATP als auch dessen inhibitorische Wirkung herabsetzen. Diese Überlegung wird durch Beobachtungen von BÄR ET AL. (1990) und ARAGÓN UND SÁNCHEZ (1985) bekräftigt. Die Autoren bestätigen nämlich bei höheren Enzym-Konzentrationen von 2 bis 200 $\mu\text{g/ml}$ eine ausgeprägte Reduktion des modulatorischen Beitrags von MgATP unter *in-vitro* Bedingungen. Ob heterologe Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und anderen cytoplasmatischen Proteinen (wie etwa die Bestandteile des Cytoskeletts) auch einen Beitrag leisten können, ist Gegenstand laufender Untersuchungen (KOPPERSCHLÄGER, persönliche Mitteilung).

In der Abbildung 58 sind die Enzymaktivitäten gegen die Konzentration des F6P aufgetragen. Es wird ersichtlich, daß das V-Modell zwar die *in-vitro* Verhältnisse gut beschreibt jedoch zur Beschreibung der *in-situ* Verhältnisse im Bereich von 0.5–1.0 MgATP- und 0.2–0.5 mM F6P-weniger geeignet ist.

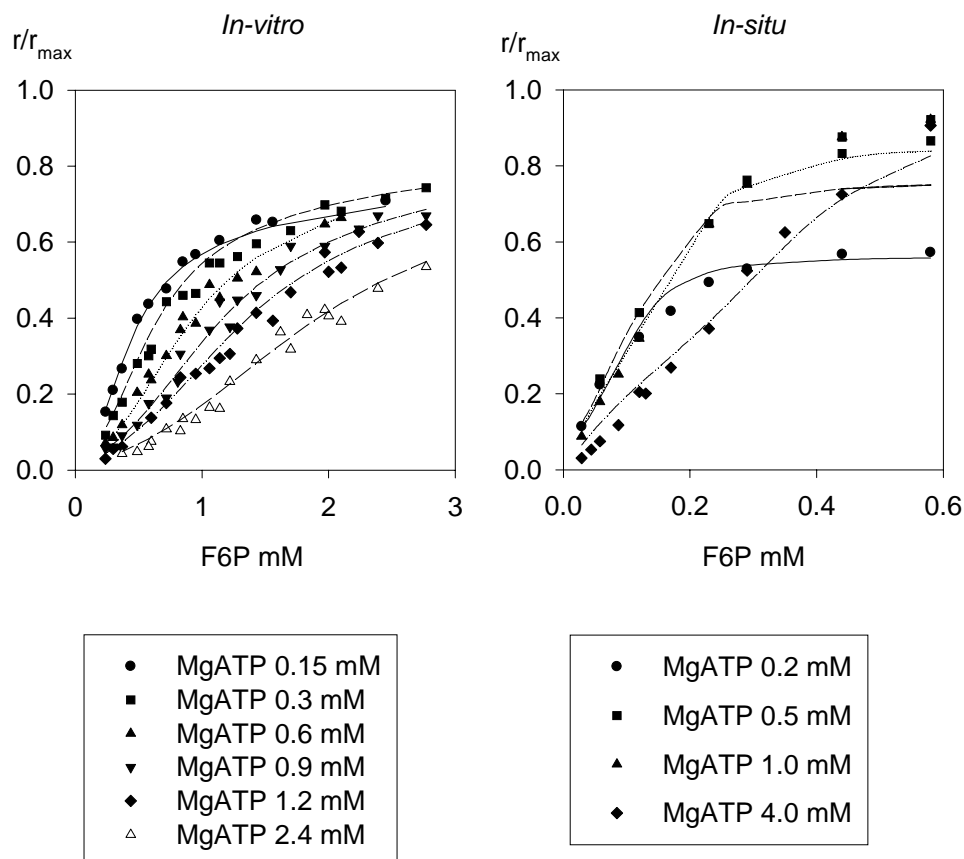


Abbildung 58. Aktivität der PFK1 *in-vitro* (links) bzw. *in-situ* (rechts) in Abhängigkeit von MgATP und F6P: Vergleich zwischen Modellsimulation (V-Modell) und Experiment.

Für einen weiteren Vergleich der Daten wurde in der Abbildung 59 der Verlauf der Aktivität *in-situ* bzw. *in-vitro* bei einer MgATP-Konzentration von 0.2 mM aufgetragen. Man erkennt, daß die Affinität des Enzyms zum Substrat F6P unter *in-situ* Bedingungen deutlich höher liegt als unter *in-vitro* Bedingungen. Diese Beobachtung läßt sich erneut durch die Zahlenwerte der geschätzten Parameter bestätigen: Entsprechend Tabelle 17 liegt die Affinität des Enzyms bezüglich des Substrats F6P im R- ($K_{F6P,R,0}$) bzw. T-Zustand ($K_{F6P,T,0}$) unter *in-situ* Bedingungen deutlich höher als unter *in-vitro* Bedingungen.

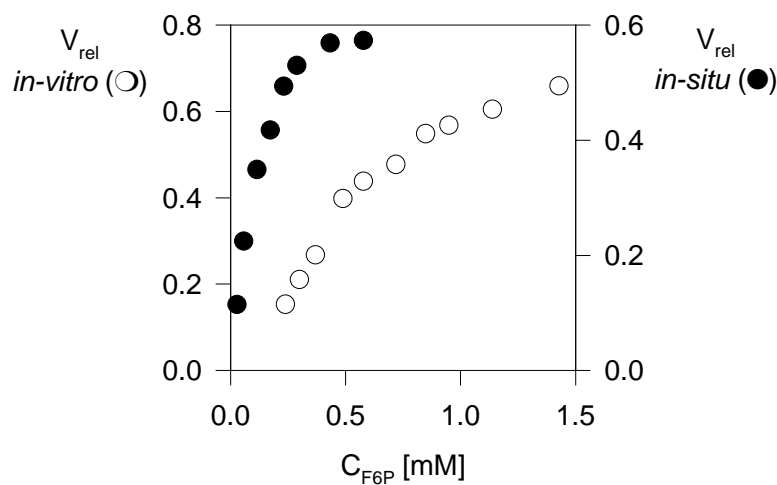


Abbildung 59. Aktivität der PFK1 in Abhängigkeit von F6P: Vergleich unter *in-vitro* und *in-situ* Bedingungen. Die Konzentration des MgATP beträgt 0.2 mM.

In-vitro Messungen bei einer physiologisch relevanten Enzymkonzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ (ARAGÓN UND SÁNCHEZ, 1985) (BÄR ET AL., 1990) deuten jedoch nicht auf eine Erhöhung der Affinität bezüglich F6P aufgrund homologer Protein-Protein-Wechselwirkungen der Enzym-Moleküle hin. Man darf daher vermuten, daß die höhere Affinität zum Substrat F6P unter *in-situ* Bedingungen auf heterologe Wechselwirkungen des Enzyms mit cytoplasmatischen Proteinen zurück zuführen ist (KOPPERSCHLÄGER, persönliche Mitteilung).

4.4.3.2 Der Einfluß des Effektors AMP

In Abbildung 60 ist die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Aktivator AMP dargestellt. Für die Modellsimulation wurden die Parameterwerte gewählt, die den in Tabelle 18 gezeigten Minima der relativen Fehlerquadratsumme entsprechen. Der Vergleich zwischen Messung und Modellsimulation zeigt, daß das V-Modell den Effekt der Aktivierung durch AMP unter den entsprechenden experimentellen Bedingungen nur begrenzt beschreiben kann. Bessere Ergebnisse zeigen sich unter *in-vitro* Bedingungen bei hohen MgATP Konzentrationen und *in-situ* bei niedrigen MgATP Konzentrationen.

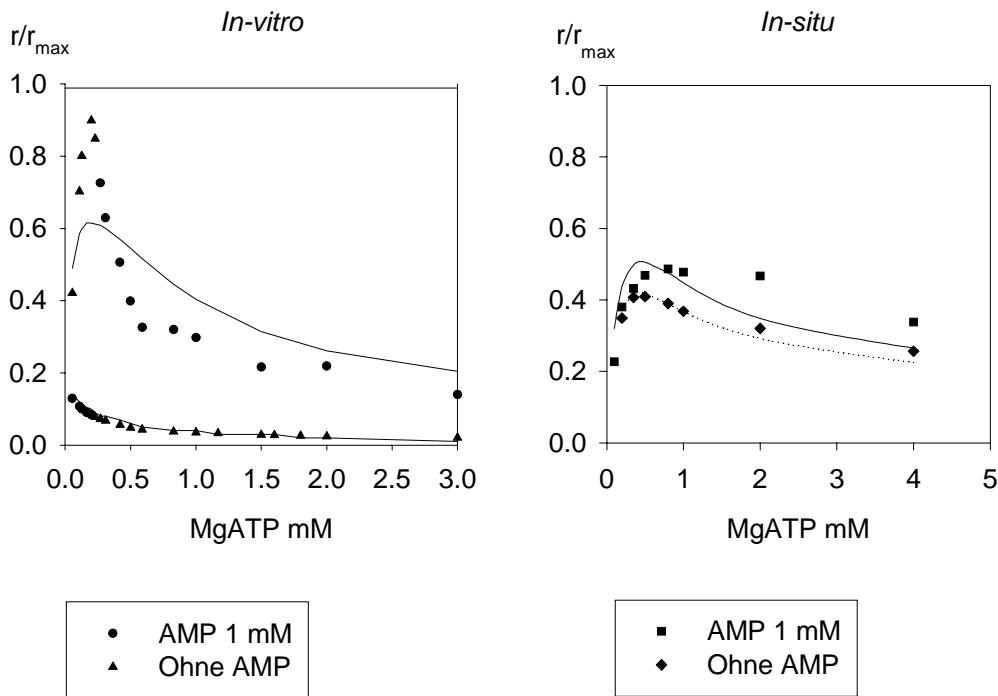


Abbildung 60. Aktivität der PFK1 *in-vitro* (links, F6P 0.3 mM) bzw. *in-situ* (rechts, F6P 0.12 mM) in Abhängigkeit von MgATP und AMP: Vergleich zwischen Modellsimulation (V-Modell) und Experiment.

Der Aktivator AMP erhöht sehr deutlich die maximale Aktivität des Enzyms sowohl unter *in-vitro* als auch unter *in-situ* Bedingungen. Aus den Messungen geht hervor, daß die Aktivierung durch AMP unter *in-situ* Bedingungen jedoch deutlich geringer ausgeprägt ist als unter *in-vitro* Bedingungen. Auch hier dürfte der Grund der sehr viel niedrigere Wert des Allosteriefaktors L_0 unter *in-situ* Bedingungen sein.

4.4.3.3 Der Einfluß des Effektors F-2,6-BP

Im Unterschied zu AMP verläuft die Aktivierung durch F-2,6-BP bereits im mikromolaren Bereich. Wie aus der Abbildung 61 ersichtlich, erhöht F-2,6-BP die maximale Aktivität des Enzyms sowohl unter *in-vitro* als auch unter *in-situ* Bedingungen, wobei unter *in-situ* Bedingungen dieser Effekt weniger ausgeprägt ist. Auch diese Eigenschaft steht im direkten Zusammenhang mit dem sehr niedrigen Wert des Allosteriefaktors L_0 .

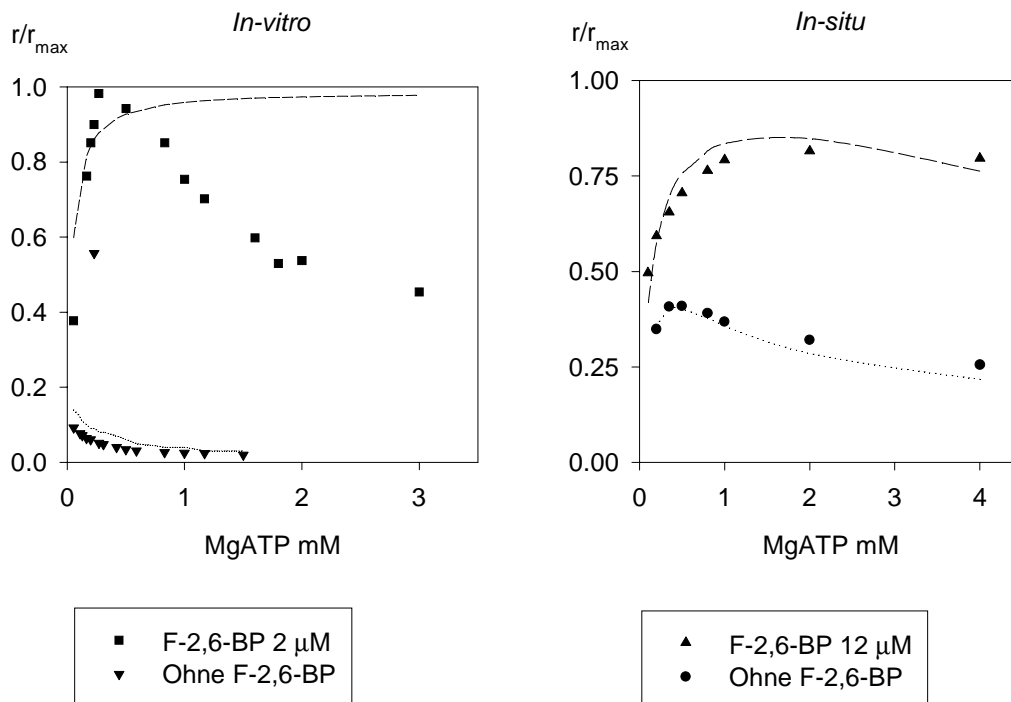


Abbildung 61. Aktivität der PFK1 *in-vitro* (links, F6P 0.3 mM) bzw. *in-situ* (rechts, F6P 0.12 mM) in Abhängigkeit von MgATP und F-2,6-BP: Vergleich zwischen Modellsimulation (V-Modell) und Experiment.

4.4.3.4 Der Einfluß des Effektors ADP

In der Abbildung 62 ist die Wirkung von ADP auf die Aktivität von PFK1 unter *in-situ* bzw. *in-vitro* Bedingungen dargestellt. Wie bereits von FREYER (1977) nachgewiesen, spielt die Konzentration des MgATP und F6P bei der Inhibition durch ADP unter *in-vitro* Bedingungen eine entscheidende Rolle. Aus der Abbildung geht hervor, daß im Bereich hoher F6P-Konzentrationen und niedriger MgATP-Konzentrationen eine ausgeprägte Inhibition bezüglich ADP vorliegt. Dieses unerwartete Ergebnis (in Lehrbüchern wie z. Bsp. LEHNINGER (1979) wird üblicherweise ADP als Aktivator ausgewiesen) läßt sich jedoch unter *in-situ* Bedingungen nicht vorfinden.

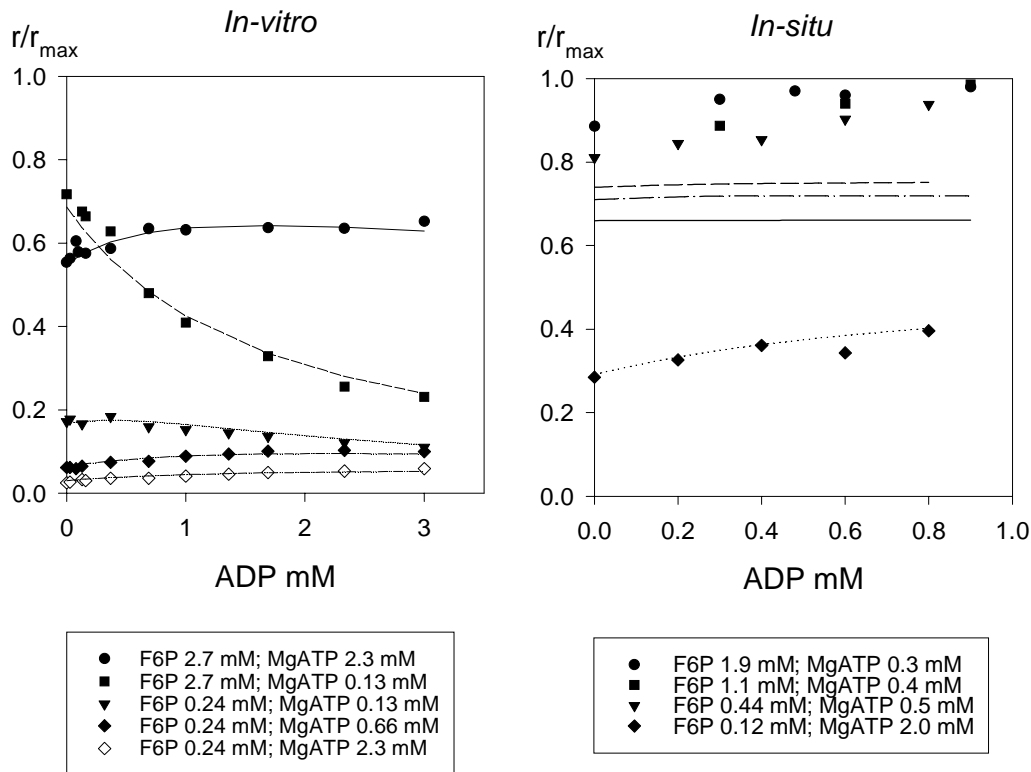


Abbildung 62. Aktivität der PFK1 unter *in-vitro* (links) bzw. *in-situ* (rechts) Bedingungen in Abhängigkeit von MgATP und ADP: Vergleich zwischen Modellsimulation (V-Modell) und Experiment.

Wie Abbildung 62 zeigt, ist unter *in-situ* Bedingungen kein Einfluß von ADP zu erkennen. Dieser fehlender Einfluß spiegelt sich auch in den identifizierten Parameter $K_{ADP,C}$ wieder. Der Zahlenwert von $K_{ADP,C}$ liegt unter *in-situ* Bedingungen entsprechend Tabelle 17 bei Null.

4.4.3.5 Der Einfluß des Effektors F-1,6-BP

F-1,6-BP konkurriert mit F-2,6-BP um dieselbe Bindungsstelle im Enzym und setzt somit die aktivierende Wirkung von F-2,6-BP deutlich herab. Der Vergleich der Ergebnisse aus den *in-vitro* bzw. *in-situ* Untersuchungen anhand Abbildung 63 verdeutlicht, daß unter *in-situ* Bedingungen die inhibierende Wirkung des F-1,6-BP in Gegenwart von F-2,6-BP deutlich höher ausgeprägt ist. Aus den Modellsimulationen geht hervor, daß das V-Modell nur begrenzt zur Beschreibung der Eigenschaften des Enzyms bezüglich F-1,6-BP in der Lage ist.

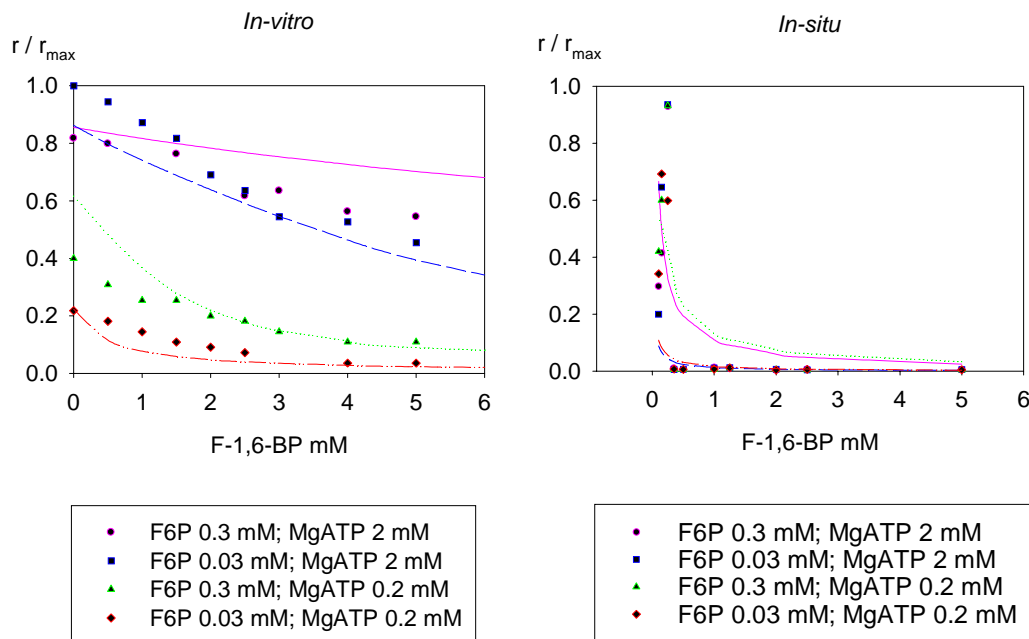


Abbildung 63. Aktivität der PFK1 unter *in-vitro* (links) bzw. *in-situ* (rechts) Bedingungen in Abhängigkeit von F6P, MgATP und F-1,6-BP: Vergleich zwischen Modellsimulation (V-Modell) und Experiment. Die Konzentration des F-2,6-BP beträgt 20 μ M.

Es ist darauf hinzuweisen, daß entsprechend diesen Beobachtungen, F-1,6-BP den einzigen Effektor darstellt, welcher unter *in-situ* Bedingungen einen höheren Einfluß auf die Aktivität des Enzyms ausübt als unter *in-vitro* Bedingungen.

4.4.4 Das V_{situ} -Modell

Die Untersuchungen zur reaktionskinetischen Charakterisierung der PFK1 unter *in-vitro* bzw. *in-situ* Bedingungen lassen auf einige zentrale Aussagen schließen, die im folgenden zusammengestellt sind.

Aus den oben gezeigten Abbildungen geht hervor, daß keiner der gezeigten Modelle alle experimentellen Beobachtungen unter *in-vitro* und *in-situ* Bedingungen zuverlässig erfassen kann. Gleichwohl zeigt die statistische Analyse der Parameter, daß ein qualitativer Unterschied zwischen den Modellen existiert. Aus diesen Analysen geht hervor, daß das V-Modell gegenüber anderen reaktionskinetischen Ansätzen aus der Literatur (F-Modell und HK-Modell), sowohl zur Beschreibung von *in-vitro* als auch *in-situ* Eigenschaften des Enzyms zu bevorzugen ist. Hinzu kommt, daß das V-Modell auch den Beitrag der Effektoren F-1,6-BP und F-2,6-BP berücksichtigt. Die *in-vivo* Analyse (s. Abschnitt 4.4.5) wird zeigen, daß diese Eigenschaft des Modells essentiell ist.

Unter *in-situ* Bedingungen zeigt das Enzym hinsichtlich seiner reaktionskinetischen Eigenschaften eine Reihe von Besonderheiten, welche durch die Parameterwerte des V-Modells einer deterministischen Deutung zugänglich sind. Zunächst werden Unterschiede in den jeweiligen Affinitätskonstanten festgestellt. Hinzu kommt, daß mit Ausnahme von F-1,6-BP, die Wirkung aller Effektoren *in-situ* deutlich weniger ausgeprägt ist als *in-vitro*. Diese allgemeine Beobachtung läßt sich anhand des V-Modells durch den niedrigen Wert der Allosteriekonstante unter *in-situ* Bedingungen verdeutlichen. Diese Beobachtung wird im folgenden für eine Reduktion des V-Modells unter *in-situ* Bedingungen genutzt. Unter der Annahme, daß:

$$L_0 \rightarrow 0 \quad (4.12)$$

bzw.:

$$L = \frac{T}{R} = L_0 \left(\frac{1 + \alpha_{F6P,T}}{1 + \alpha_{F6P,R}} \right)^8 \rightarrow 0 \quad (4.13)$$

läßt sich schließen, daß unter *in-situ* Bedingungen die Kooperativität zwischen den acht Untereinheiten keine entscheidende Rolle mehr spielt. Darüber hinaus ergibt sich aus Gleichung 4.13 die Konsequenz, daß:

$$R \gg T \quad (4.14)$$

d.h., das Enzym liegt unter *in-situ* Bedingungen überwiegend in der R-Konformation (aktivere Form) vorliegt. Daraus läßt sich die Annahme treffen, daß:

$$T \rightarrow 0 \quad (4.15)$$

Der entscheidende Unterschied zwischen *in-situ* und *in-vitro* Bedingungen liegt in der höheren Enzymkonzentration sowie der Zusammensetzung der Strukturproteine in den permeabilisierten Zellen (SERRANO ET AL., 1973) (SOLS ET AL., 1974) (BANUELOS ET AL., 1978). Andere Parameter, wie pH, Ionenstärke bzw. Temperatur, liegen bei *in-vitro* und *in-situ* Bedingungen in einem vergleichbaren Bereich. Intrazelluläre Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen glycolytischen Enzymen und Bestandteilen des Cytoskeletts wurden bereits von einer Vielzahl von Autoren sowohl in *S. cerevisiae* als auch in anderen Mikroorganismen nachgewiesen (s. Abschnitt 2.1.1.2).

Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, daß in permeabilisierten Zellen, Wechselwirkungen zwischen den Enzymmolekülen selbst (homolog) bzw. mit Strukturproteinen des Cytoskeletts (heterolog) zu einer Stabilisierung des R-Zustands führen. Auch die Kooperativität zwischen den Untereinheiten verliert in permeabilisierten Zellen an Bedeutung. Eine Erklärung hierfür wäre, daß Wechselwirkungen zwischen den Enzymmolekülen untereinander wie auch mit Strukturproteinen der Zelle zu einer Art "höheren Kooperativität" innerhalb des intrazellulären Proteinverbands führt, wodurch eine Kooperativität zwischen den Untereinheiten zwar vorliegen kann, aber an Bedeutung verliert. Diese Vermutung wird durch die im Abschnitt (2.1.1.2) bereits zitierten Arbeiten von

KRIEGEL ET AL. (1987) und KOPPERSCHLÄGER UND HEINRISCH (1997) bestätigt. Hierbei wurde festgestellt, daß die Dissoziationskonstanten der Untereinheiten eine Funktion der Proteinkonzentration sind.

Unter der Annahme, daß der Anteil des Enzyms in der T-Konformation vernachlässigbar klein ist (s. Gleichung 4.15), läßt sich die Sättigungsfunktion bezüglich F6P (s. Gl. 2.32) wie folgt vereinfachen:

$$N_{F6P} = M_{F6P,R} R \quad (4.16)$$

Es sei darauf hingewiesen, daß diese Annahme bereits von HOFMANN UND KOPPERSCHLÄGER (1982) in Zusammenhang mit dem HK-Modell für *in-vitro* Bedingungen vorgeschlagen wurde (s. Abschnitt 2.1.2.3). Es sei aber daran erinnert, daß sich das HK-Modell sowohl *in-situ* als auch *in-vitro* durch den hohen Wert der Allosteriekonstante vom V-Modell unterscheidet und dadurch die entsprechenden statistischen Kriterien nicht erfüllt.

Unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Annahmen ergibt sich ein reduziertes V-Modell zur Beschreibung der kinetischen Eigenschaften des Enzyms unter *in-situ* Bedingungen. Der reaktionskinetische Ansatz hierzu ist in der Abbildung 64 zusammengefaßt. Das Modell wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als das V_{situ} -Modell bezeichnet.

$$\begin{aligned}
 N &= (1 + \alpha_{ATP,A}) (1 + \alpha_{AMP,A}) (1 + \alpha_{F1,6BP,A} + \alpha_{F2,6BP,A}) \\
 Z &= (1 + \alpha_{ATP,I}) (1 + \alpha_{AMP,I}) (1 + \alpha_{F1,6BPP,A} + \alpha_{F2,6BPP,A}) \\
 Q &= \frac{Z}{N} \\
 K_{F6P,R} &= K_{F6P,R,0} Q \\
 \alpha_{F6P,R} &= K_{F6P,R} C_{F6P} \\
 M_{F6P,R} &= \frac{\alpha_{F6P,R}}{\alpha_{F6P,R} + 1} \\
 N_{F6P} &= M_{F6P,R} \quad R = M_{F6P,R} \quad R = \frac{1}{1+L} \rightarrow 1 \\
 L &= L_0 \left(\frac{1}{1 + \alpha_{F6P,R}} \right)^8 \rightarrow 0 \\
 N_{ATP} &= \frac{\alpha_{ATP,S}}{1 + \alpha_{ATP,S}} \\
 \frac{r_{PFK1}}{r_{PFK1}^{max}} &= N_{F6P} N_{ATP}
 \end{aligned}$$

Abbildung 64. Reaktionskinetischer Ansatz des V_{situ} -Modells.

Der entsprechende reaktionskinetische Mechanismus für das V_{situ} -Modell ist in der Abbildung 65 veranschaulicht.

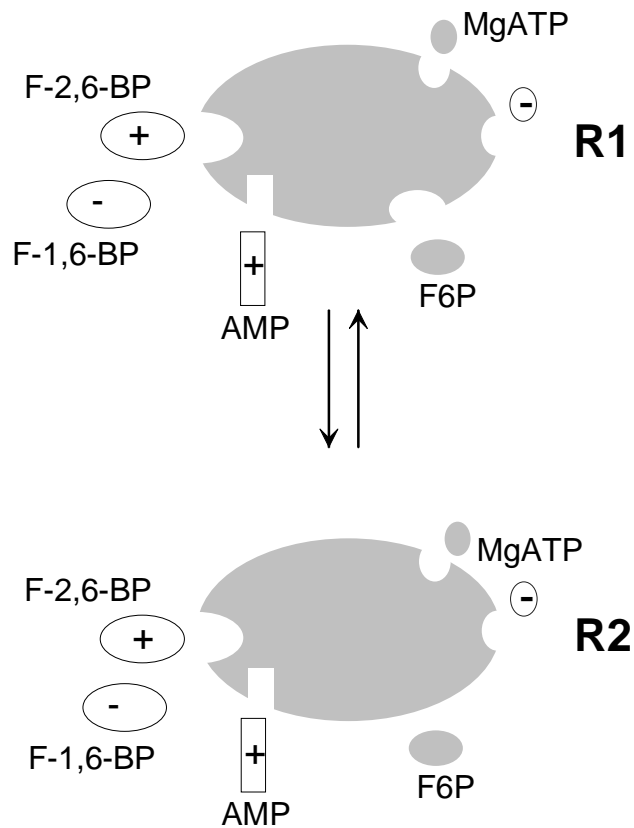


Abbildung 65. Reaktionkinetischer Mechanismus des V_{situ} -Modells.

Inwiefern die Beobachtungen aus *in-vitro* bzw. *in-situ* Studien auf die *in-vivo* kinetischen Eigenschaften des Enzyms übertragbar sind, bedarf einer getrennten Untersuchung, welche Gegenstand der folgenden Kapitel sein wird.

4.4.5 Kinetische Charakterisierung der PFK1 unter *in-vivo* Bedingungen

Im Anschluß an die reaktionskinetische Charakterisierung der PFK1 unter stationären *in-vitro* und *in-situ* Bedingungen, werden im folgenden Abschnitt die *in-vivo* kinetische Eigenschaften des Enzyms unter dynamischen Bedingungen anhand des V-Modells untersucht (s. Abbildung 66).

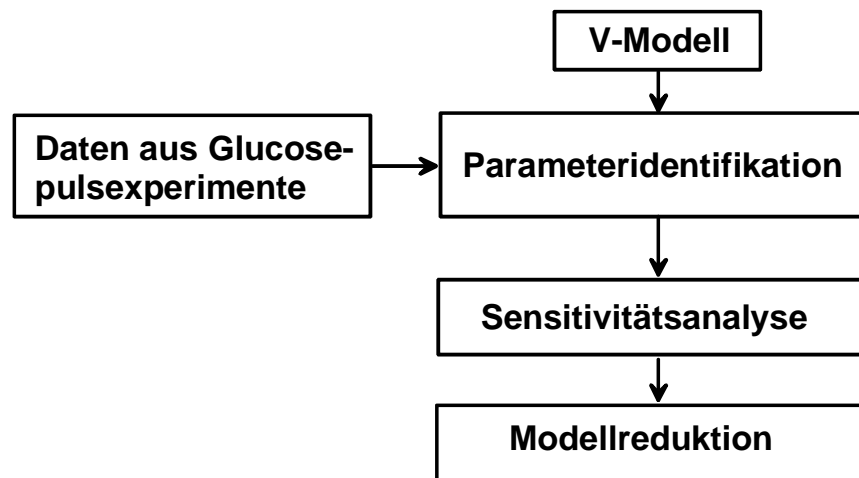


Abbildung 66. Prinzipielle Vorgehensweise bei der Untersuchung der *in-vivo* kinetischen Eigenschaften des Enzyms unter dynamischen Bedingungen.

Zur Identifikation der Parameter des V-Modells unter *in-vivo* Bedingungen, wird der Bilanzraum um den intrazellulären Pool des F6P herangezogen (s. Abbildung 67). Die Bilanzgleichung für das intrazelluläre F6P lautet:

$$\frac{dC_{F6P}}{dt} = -r_{PFK1} + r_{PGI,G6P} + r_{TAL}(t) + r_{TKL2}(t) - \mu C_{F6P}(t) \quad (4.17)$$

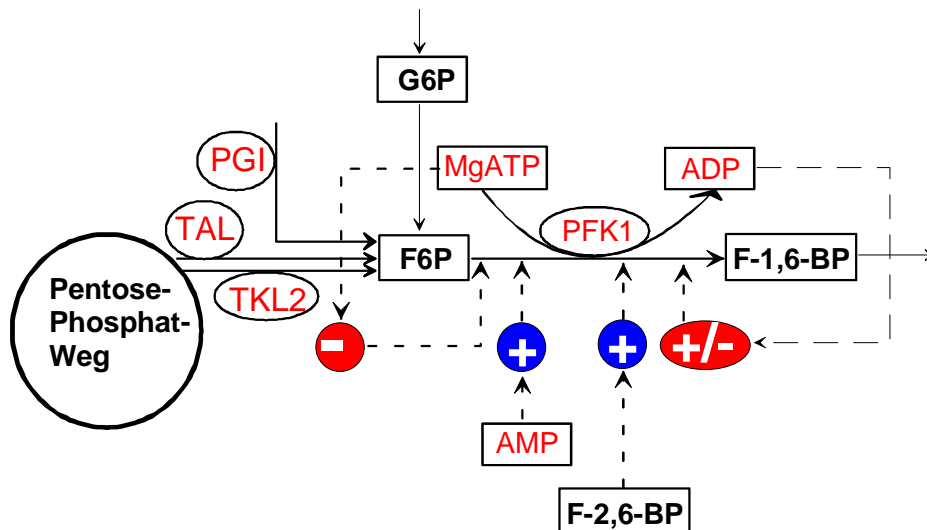


Abbildung 67. Reaktionen um den Bilanzraum des F6P-Pools (TAL:Transaldolase, TKL2:Transketolase-2, PGI: Phosphoglucose-isomerase, PFK1: Phosphofruktokinase-1). Das positive Vorzeichen (+) kennzeichnet eine Aktivierung, das negative hingegen eine Inhibierung (-).

Nachfolgend werden zunächst die Beiträge der Enzyme FBPase1 und PFK1 untersucht. Anschließend wird die Identifikation der Parameter des V-Modells mit entsprechenden Daten aus Glucosepuls-Experimenten durchgeführt. Schließlich werden die Ergebnisse der Modell-Identifikation vorgestellt und zur Beschreibung kinetischer Eigenschaften der PFK1 unter *in-vivo* Bedingungen herangezogen. Diese Vorgehensweise erlaubt schließlich die Herleitung eines reduzierten V-Modells zur Beschreibung der *in-vivo* kinetischen Eigenschaften des Enzyms unter dynamischen Bedingungen.

4.4.5.1 Untersuchungen zur Aktivität der FBPase1

Wie bereits erwähnt, katalysiert PFK1 eine irreversible Reaktion, bei der F6P zu F-1,6-BP phosphoryliert wird. Die entgegengesetzte Reaktion, welche die irreversible Hydrolyse von F-1,6-BP unter Abspaltung einer Phosphatgruppe (s. Abbildung 68) einleitet, wird von einem zweiten Enzym, nämlich die FBPase1 katalysiert. Während die PFK1 in der Zelle ein regulatorisches Schlüsselenzym der Glykolyse darstellt, wirkt die FBPase1 in entgegengesetzter Richtung als Schlüsselenzym der Gluconeogenese (s. Abbildung 68).

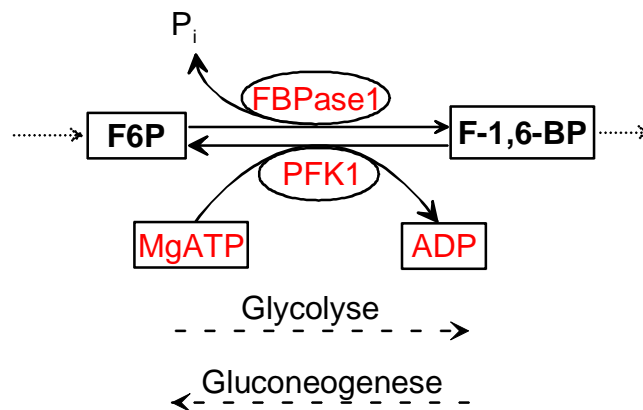


Abbildung 68: PFK1 und FBPase1 katalysieren entgegengesetzte Reaktionen.

Würden die Reaktionen der PFK1 und FBPase1 gleichzeitig ablaufen, ergibt sich entsprechend Abbildung 69, ein MgATP verbrauchender Reaktionszyklus. Ein solcher Zyklus wird als Leerlaufzyklus (engl. *futile cycle*) bezeichnet (REICH UND SEL'KOV, 1981).

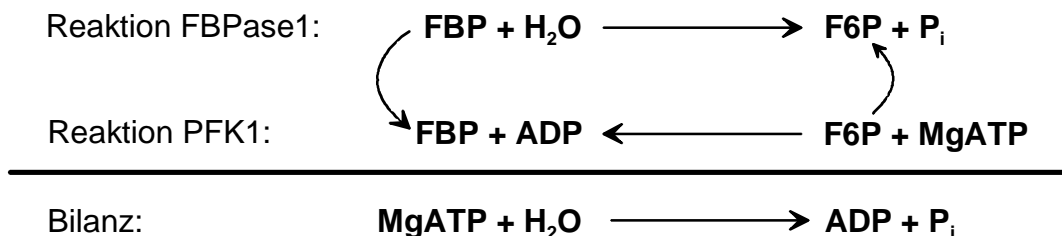


Abbildung 69. Abbau des MgATP durch simultanen Ablauf der Reaktionen FBPase1 und PFK1.

In Gegenwart von Glucose als einzige Kohlenstoffquelle kann die Zelle einen solchen Zyklus durch verschiedene Mechanismen vermeiden:

1. Modulation der Enzymaktivität: Die Enzyme PFK1 und FBPase1 werden von AMP und F-2,6-BP gegenläufig reguliert. Während die FBPase1 durch AMP und F-2,6-BP inhibiert wird, aktivieren beide Effektoren die PFK1 (GANCEDO ET AL., 1965) (GANCEDO ET AL., 1982) (SCHELLENBERGER UND HERVAGULT, 1991).

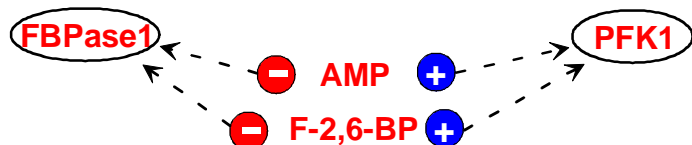


Abbildung 70. Gegenläufige Modulation der FBPase1 und PFK1 auf der Ebene der Enzymaktivität.

2. Enzymphosphorylierung: Die aktive Proteinkinase A (PKA) (s. Abbildung 17) ist in der Lage die FBPase1 zu phosphorylieren. Durch diese Phosphorylierung wird die aktive FBPase1 in eine inaktive Form überführt. Dieser Prozeß wird als Katabolitinaktivierung (engl. *catabolit inactivation*) bezeichnet (HOLZER ET AL., 1976) (LENZ UND HOLZER, 1980) (MAZON ET AL., 1982) (ENTIAN UND BARNETT, 1992).

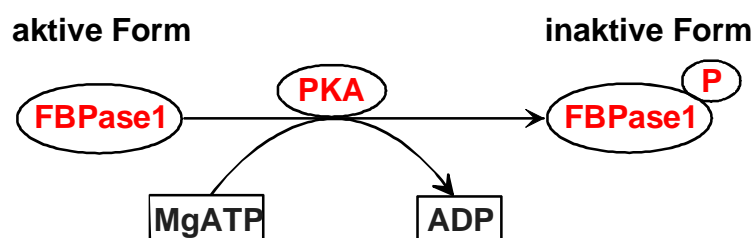


Abbildung 71. Reaktion der Phosphorylierung der FBPase1 durch PKA.

3. Katabolitrepression: Die Gegenwart von Glucose als einzige Kohlenstoffquelle bewirkt die Repression der für die Transkription von FBPase1 essentiellen Gene. Dieser Mechanismus wird als Katabolitrepression bezeichnet. Als Folge dessen sinkt die Konzentration der FBPase1 in der Zelle (ENTIAN UND SCHÜLLER, 1997).

4. Die vakuoläre Degradation: Sowohl die phosphorylierte als auch die nicht-phosphorylierte Form der FBPase1 kann in den Vakuolen transportiert und dort proteolytisch degradiert werden. Bevorzugt wird jedoch die phosphorylierte Form in die Vakuole transportiert (MOLANO ET AL., 1974) (GANCEDO ET AL., 1971).

5. Die Degradation im Proteasom: Die FBPase1 kann auch durch das Proteasom degradiert werden. Das Proteasom stellt eine cytoplasmatische Degradations-Maschinerie für Proteine dar. Kennzeichnend für die Degradation über den Proteasom ist die sogenannte Ubiquitinierung des zu degradierenden Proteins (WOLF ET AL., 1979) (TEICHERT ET AL., 1989) (SCHORK ET AL., 1994) (RIVETT ET AL., 1993) (PETERS ET AL., 1994).

Vor dem Hintergrund dieser Mechanismen sowie der Tatsache, daß bei der kontinuierlichen Kultur entsprechend Abschnitt 3.5 über mehrere Generationszeiten nur Glucose als Kohlenstoffquelle vorliegt, ist die Annahme naheliegend, daß die maximale Rate der FBPase1 im Vergleich zu PFK1 vernachlässigend klein ist:

$$r_{FBPase1}^{\max} \ll r_{PFK1}^{\max} \quad (4.18)$$

Zur Stützung dieser Hypothese wurde die maximale Rate der Enzyme FBPase1 und PFK1 in Zellen *in-situ* gemessen. Hierzu wurden Zellen aus dem stationären Zustand der kontinuierlichen Kultur verwendet (s. Abschnitt 3.12.4). Für die maximale Rate der FBPase1 ergab sich:

$$r_{FBPase1}^{\max, situ} = 8.6 \text{ U/gTS} \quad (4.19)$$

während die maximale Rate der PFK1 um eine Größenordnung höher liegt:

$$r_{PFK1}^{\max, situ} = 105 \text{ U/gTS} \quad (4.20)$$

Hieraus ergibt sich das Verhältnis der maximalen Raten der FBPase1 und PFK1 zu:

$$\xi_{FBPase1/PFK1}^{\max} = \frac{r_{FBPase1}^{\max, situ}}{r_{PFK1}^{\max, situ}} \approx \frac{r_{FBPase1}^{\max, vivo}}{r_{PFK1}^{\max, vivo}} = 0.08 \quad (4.21)$$

Es wurde also angenommen, daß dieses Verhältnis für *in-vivo* bzw. *in-situ* Bedingungen annähernd übereinstimmt. In der Zeitspanne nach dem Glucosepuls kommt es zusätzlich zu einer Inhibition der FBPase1 bzw. Aktivierung der PFK1 durch F-2,6-BP. Damit ist für die dynamische Phase nach dem Glucosepuls anzunehmen, daß:

$$\xi_{FBPase1/PFK1}^{dyn} \ll \xi_{FBPase1/PFK1}^{stat} \quad (4.22)$$

Wegen des niedrigen Verhältnisses der maximalen Raten beider Enzyme sowohl im stationären als auch im dynamischen Zustand, wird in den folgenden Abschnitten der Beitrag der FBPase1 bei einer Bilanzierung des F6P Pools vernachlässigt.

Die Untersuchungen in den permeabilisierten Zellen bestätigen, daß die Zelle unter den genannten physiologischen Bedingungen den Leerlaufzyklus der PFK1/FBPase1 vermeidet. Eine strenge Regulation zur Vermeidung eines Leerlaufzyklus konnte auch von NAVAS ET AL. (1993) nachgewiesen werden. Die Autoren zeigen unter Einsatz von ^{13}C -NMR, daß eine Überexpression der FBPase1 in Mutanten der Hefe *S. cerevisiae* beim Wachstum auf Glucose, weder die Wachstumsrate noch den Ausbeutekoeffizienten beeinflußt. Der nach der Mutation noch vorhandene Anteil des Leerlaufzyklus beträgt weniger als 2% des glycolytischen Flusses durch PFK1/FBPase1.

4.4.5.2 Der kinetische Ansatz für PGI

Zur Beschreibung der Reaktionskinetik der PGI schlagen DYSON UND NOLTMANN (1968) und RICHTER ET AL. (1975) einen reversiblen Michaelis-Menten Ansatz vor. Dieser setzt sich aus einer Hin- und einer Rückreaktion zusammen:

$$r_{PGI} = r_{PGI,H} - r_{PGI,R} \quad (4.23)$$

Für die jeweiligen Teilreaktionen gilt:

$$r_{PGI,H} = \frac{r_{PGI,G6P}^{\max} K_{F6P} C_{G6P}}{K_{G6P} K_{F6P} + K_{F6P} C_{G6P} + K_{G6P} C_{F6P}} \quad (4.24)$$

$$r_{PGI,R} = \frac{r_{PGI,F6P}^{\max} K_{G6P} C_{F6P}}{K_{G6P} K_{F6P} + K_{F6P} C_{G6P} + K_{G6P} C_{F6P}} \quad (4.25)$$

Unter Berücksichtigung der Definition der Gleichgewichtskonstante nach Haldane (s. SEGEL, 1993):

$$K_{Eq,PGI} = \frac{r_{PGI,G6P}^{\max} K_{F6P,PGI}}{r_{PGI,F6P}^{\max} K_{G6P,PGI}} \quad (4.26)$$

läßt sich der Ansatz in die folgende Form überführen:

$$r_{PGI,H} = r_{PGI,G6P}^{\max} \frac{C_{G6P} - \frac{C_{F6P}}{K_{Eq,PGI}}}{K_{G6P} \left(1 + \frac{C_{F6P}}{K_{F6P}} \right) + C_{G6P}} \quad (4.27)$$

Der Wert der Gleichgewichtskonstante $K_{Eq,PGI}$ wurde in unabhängigen Studien von DYSON UND NOLTMAN (1968), NEWSHOLME (1973) sowie REICH UND SEL'KOV (1981) bestimmt. Dieser beträgt:

$$K_{Eq,PGI} = \frac{C_{F6P}^{GG}}{C_{G6P}^{GG}} = 0.3 \pm 0.02 \quad (4.28)$$

und wird für die weiteren Berechnungen im Rahmen dieser Arbeit übernommen.

4.4.5.3 *In-vivo* Diagnose des V-Modells

Zur Schätzung der Parameter der PFK1 und PGI unter *in-vivo* Bedingungen wurde die von BALTES (1996) und RIZZI ET AL. (1997) vorgeschlagene Strategie der *in-vivo* Diagnose eingesetzt.

Im ersten Schritt wurden die aus den Glucosepuls-Experimenten gewonnene Daten für F6P, F-1,6-BP, F-2,6-BP, MgATP, ADP und AMP mit entsprechenden analytischen Funktionen approximiert. Diese sind im Anhang 2 zusammengefaßt. Der Vergleich zwischen dem Verlauf der Approximationsfunktionen und den entsprechenden Messungen ist in den Abbildung 72 und Abbildung 73 zusammengefaßt.

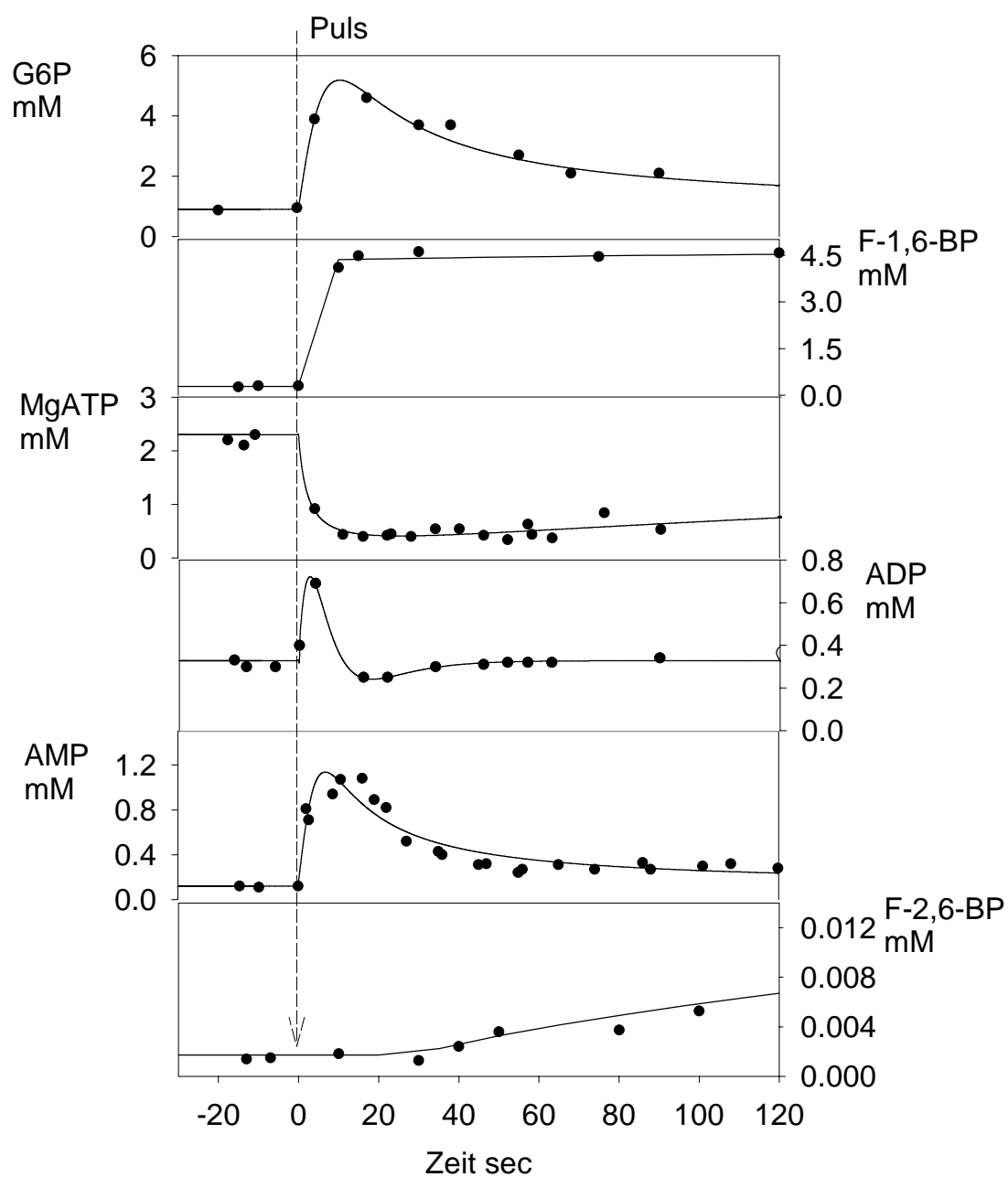


Abbildung 72. Zeitlicher Verlauf intrazellulärer Konzentrationen im Zeitraum von 120 sec nach dem Glucosepuls. Ausgezogene Kurvenzüge sind nach den in Anhang 2 zusammengestellten analytischen Funktionen berechnet.

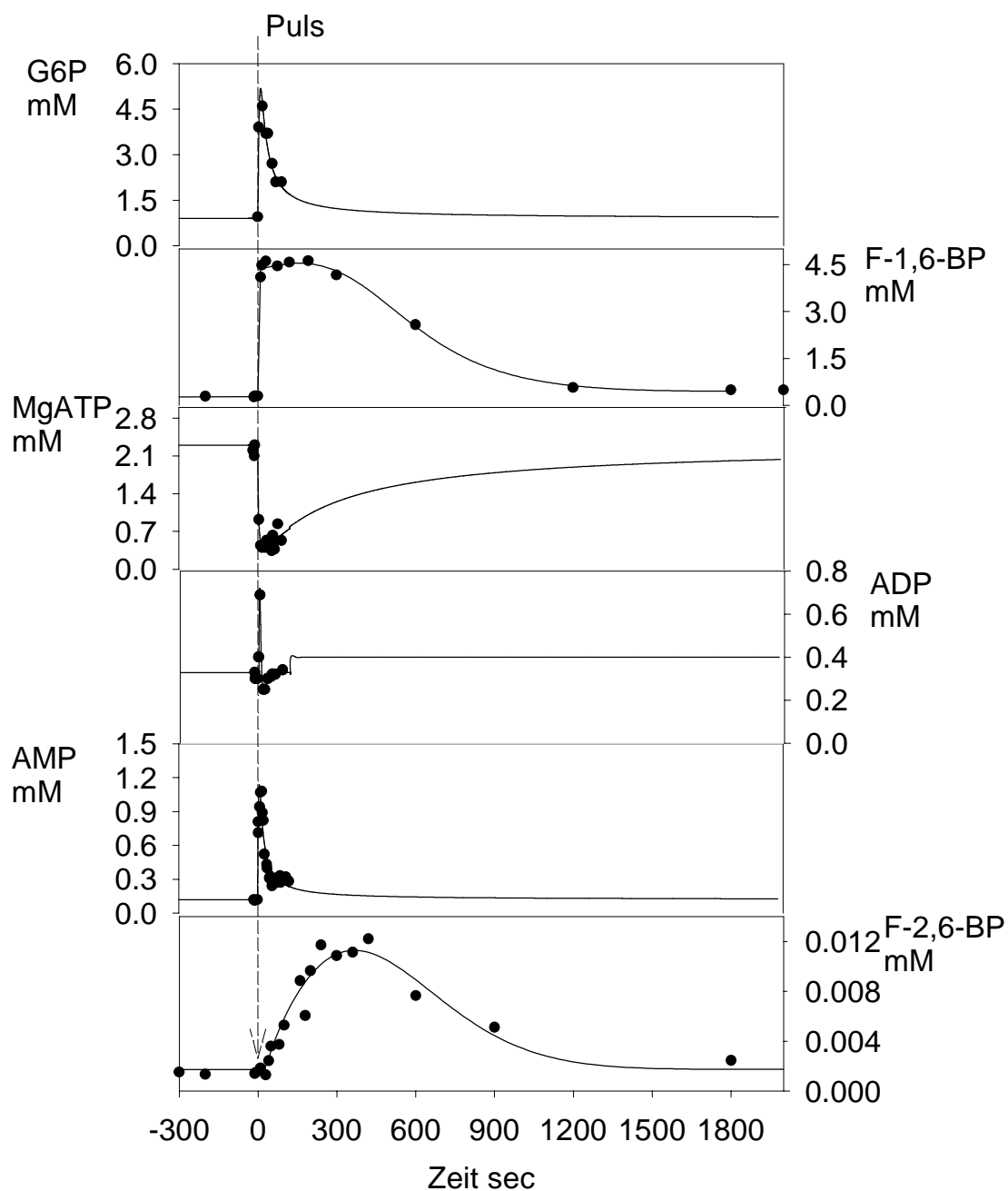


Abbildung 73. Zeitlicher Verlauf intrazellulärer Konzentrationen im Zeitraum von 2000 sec nach dem Glucosepuls. Ausgezogene Kurvenzüge sind nach den in Anhang 2 zusammengestellten analytischen Funktionen berechnet.

Setzt man diese Approximationsfunktionen $\hat{C}_i(t)$ in die entsprechenden Ratengleichungen für PFK1 bzw. PGI ein, so ergeben sich folgende funktionale Beziehungen:

$$r_{PFK1} = r_{PFK1}^{\max} f_{PFK1}(\hat{C}_{MgATP}(t), \hat{C}_{ADP}(t), \hat{C}_{AMP}(t), \hat{C}_{F1,6BP}(t), \hat{C}_{F2,6BP}(t), C_{F6P}(t), \mathbf{P}_{PFK1}) \quad (4.29)$$

und:

$$r_{PGI} = r_{PGI,G6P}^{\max} f_{PGI}(\hat{C}_{G6P}(t), C_{F6P}(t), \mathbf{P}_{PGI}) \quad (4.30)$$

wobei f_{PFK1} bzw. f_{PGI} die kinetischen Terme und \mathbf{P}_{PFK1} bzw. \mathbf{P}_{PGI} die zugehörigen Parametervektoren der jeweiligen Reaktionsraten repräsentieren.

Kurz gefaßt läßt sich auch schreiben:

$$r_{PFK1} = r_{PFK1}^{\max} f_{PFK1}(t, C_{F6P}, \mathbf{P}_{PFK1}) \quad (4.31)$$

und:

$$r_{PGI} = r_{PGI,G6P}^{\max} f_{PGI}(t, C_{F6P}, \mathbf{P}_{PGI}) \quad (4.32)$$

Damit ergibt sich für die Bilanzgleichung des F6P-Pools entsprechend Abbildung 74:

$$\frac{dC_{F6P}}{dt} = -r_{PFK1}^{\max} f_{PFK1}(t, C_{F6P}, \mathbf{P}_{PFK1}) + r_{PGI,G6P}^{\max} f_{PGI}(t, C_{F6P}, \mathbf{P}_{PGI}) + r_{TAL}(t) + r_{TKL2}(t) - \mu C_{F6P}(t) \quad (4.33)$$

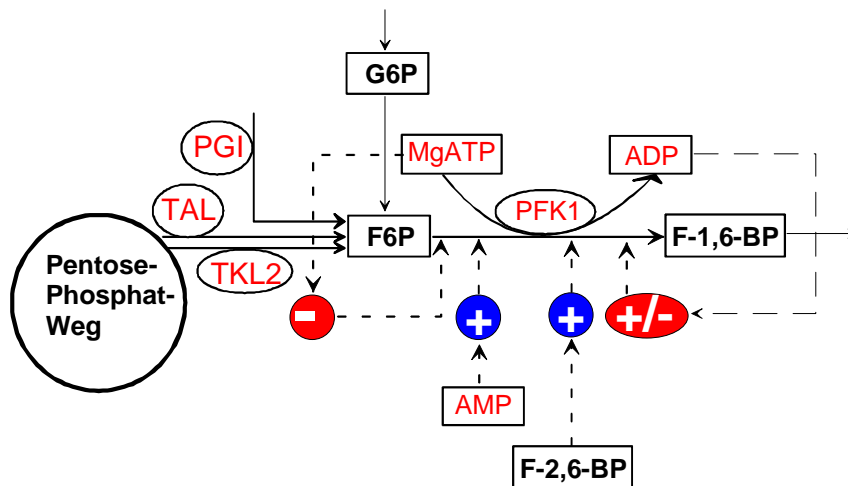


Abbildung 74. Reaktionen um den Bilanzraum des F6P-Pools (TAL:Transaldolase, TKL2:Transketolase-2, PGI: Phosphoglucose-isomerase, PFK1: Phosphofruktokinase-1). Das positive Vorzeichen (+) kennzeichnet eine Aktivierung, das negative hingegen eine Inhibierung (-).

Der Beitrag der FBPase1 wurde entsprechend den Überlegungen im Abschnitt (4.4.5.1) vernachlässigt. Die Beiträge der Reaktionen von TAL und TKL2 wurden anhand eines Modells für den Pentose-Phosphat-Weg nach VASEGHI ET AL. (1999) berechnet. Als Anfangsbedingung für die numerische Integration wurde die gemessene Konzentration des F6P im stationären Zustand herangezogen, nämlich $C_{F6P}(t = 0) = 0.17$ mM.

Als Optimierungskriterium für die Parameteridentifikation wurde die relative Fehlerquadratsumme $\varepsilon_{rel,F6P}$ herangezogen. Das verwendete Funktional zur Parameterschätzung ist dementsprechend wie folgt definiert:

$$\varepsilon_{rel,F6P} = \sum_{ki} \left(\frac{C_{F6P}(t_k) - \hat{C}_{F6P}(t_k)}{C_{F6P}(t_k)} \right)^2 \quad (4.34)$$

Neben diesem Optimierungsfunktional wurden auch eine Reihe von Nebenbedingungen bei der Parameteridentifikation hinzugezogen. Diese werden im Verlauf des Parameterschätzverfahrens bei jedem Iterationsschritt erneut überprüft:

- Die Variation jedes Parameters erfolgte innerhalb vorgeschriebenen Grenzen, welche einem physiologisch relevanten Bereich einschließen. Diese Variationsbreite ist in der Tabelle 20 für die jeweiligen Parameter angegeben.
- Da das V-Modell bezüglich der Wirkung des Beitrags der Effektoren eine symmetrische Modellstruktur aufweist ist bei jedem Iterationsschritt zu überprüfen ob die sogenannten dynamischen Elastizitäten (MAUCH ET AL., 1997):

$$\varepsilon_i(t) = \frac{\partial r_{PFK1}(t)}{\partial C_i(t)} \quad (4.35)$$

für die positiven Effektoren F-2,6-BP, ADP und AMP positiv bzw. für die negativen Effektoren MgATP und F-1,6-BP negativ sind. Diese Überprüfung erfolgt mit Hilfe eines Unterprogramms, in dem die Elastizitäten der einzelnen Parameter anhand der Approximationsfunktionen für den zeitlichen Verlauf der Metabolite (s. Anhang 2) berechnet werden. Der hierfür erforderliche Algorithmus ist im Abschnitt (4.4.5.4.1) beschrieben.

- Es wurde angenommen, daß der Fluß über PGI und PFK1 unmittelbar nach dem Puls nicht sinkt, d.h.:

$$\left. \frac{\partial r_j}{\partial t} \right|_{t=0} \geq 0 \quad (4.36)$$

- Jede Simulation erfaßt den Verlauf der Konzentrationen und Flüsse in einem Zeitraum von 10000 sec nach dem Puls. Es wurde nach jeder Iteration überprüft ob der stationäre Zustand erreicht und der Wert der Konzentrationen und Flüsse mit den entsprechenden Werten vor dem Puls übereinstimmt.

Die Software-Pakete ACSL™ (Mitchel Gauthier, Concord USA) und OptdesX™ (Design Synthesis Inc., Orem, UT) wurden zur Integration und Schätzung der Parametervektoren \mathbf{P}_{PFK1} und \mathbf{P}_{PGI} eingesetzt. Hierbei wurde mit zwei verschiedenen Algorithmen gearbeitet.

Zunächst wurde zur groben Lokalisierung des Zielvektors das *Simulated-annealing* Verfahren nach KIRKPATRICK ET AL. (1983) eingesetzt, anschließend wurde die Suche mit Hilfe des *Generalised-reduced-gradient* Algorithmus nach PARKINSON UND WILSON (1988) verfeinert. Die Ergebnisse dieser Parameterschätzung sind in der Tabelle 20 zusammengefaßt.

Tabelle 20. Ergebnisse der Parameteridentifikation für *in-vivo* Bedingungen mit den entsprechenden Variationsbreiten.

<i>Parameter</i>			<i>Variationsbreite</i>	
$K_{PGI,G6P}$	10.0	mM	0 – 100	mM
$K_{PGI,F6P}$	4.0	mM	0 – 100	mM
$K_{ATP,I}$	0.05	mM ⁻¹	0 – 100	mM ⁻¹
$K_{ATP,A}$	0.47	mM ⁻¹	0 – 100	mM ⁻¹
$K_{ADP,I}$	0.25	mM ⁻¹	0 – 100	mM ⁻¹
$K_{ADP,A}$	0.07	mM ⁻¹	0 – 100	mM ⁻¹
$K_{AMP,I}$	0.01	mM ⁻¹	0 – 100	mM ⁻¹
$K_{AMP,A}$	0.01	mM ⁻¹	0 – 100	mM ⁻¹
$K_{F-2,6-BP,I}$	3500.0	mM ⁻¹	0 – 10000	mM ⁻¹
$K_{F-2,6-BP,A}$	1000.0	mM ⁻¹	0 – 10000	mM ⁻¹
$K_{F6P,R,0}$	1.0	mM ⁻¹	0 – 100	mM ⁻¹
$K_{F6P,T,0}$	0.01	mM ⁻¹	0 – 100	mM ⁻¹
$K_{C,ADP}$	4.0	mM ⁻¹	0 – 100	mM ⁻¹
$K_{S,ATP}$	300.8	mM ⁻¹	0 – 500	mM ⁻¹
$K_{F-1,6-BP,I}$	1.0	mM ⁻¹	0 – 100	mM ⁻¹
$K_{F-1,6-BP,A}$	2.0	mM ⁻¹	0 – 100	mM ⁻¹
L_0	0.01	–	0 – 100	–

Auch die Berechnung der maximalen Raten erfolgte im Verlaufe des Parameterschätzverfahrens entsprechend einer iterativen Strategie nach BALTES (1996) und RIZZI ET AL. (1997). Gemäß dieser Strategie läßt sich die Ratengleichung des Enzym j im stationären Zustand wie folgt schreiben:

$$\tilde{r}_j = \tilde{r}_j^{\max} f_j(\tilde{C}_j, \mathbf{P}_j) \quad (4.37)$$

wobei f_j den kinetischen Term, \mathbf{P}_j den Parametervektor der betreffenden Reaktionsrate und \tilde{C}_j den Vektor der an dieser Reaktion beteiligten Metabolitkonzentrationen im stationären Zustand darstellt.

Unter der Annahme, daß \tilde{r}_j aus einer stationären Flußanalyse (s. Tabelle 21), \tilde{C}_j aus Messungen und \mathbf{P}_j aus einer ersten Parameterschätzung bekannt wären, läßt sich die maximale Rate r_j^{\max} im Verlaufe der Parameterschätzung iterativ aus der folgenden Gleichung errechnen:

$$r_j^{\max} = \frac{\tilde{r}_j}{f_j(\tilde{C}_j, \mathbf{P}_j)} \quad (4.38)$$

Die Ergebnisse dieser Berechnung sind in der Tabelle 22 zusammengefaßt.

Tabelle 21. Werte für die stationäre Flüsse (BALTES, 1996) (VASEGHI, 1999).

<i>Parameter</i>		
\tilde{r}_{PGI}	0.054	mM/sec
\tilde{r}_{PFK1}	0.082	mM/sec
\tilde{r}_{TKL2}	0.012	mM/sec
\tilde{r}_{TAL}	0.016	mM/sec

Tabelle 22. Werte für die maximalen Raten.

<i>Parameter</i>		
$r_{PGI,G6P}^{\max}$	1.84	mM/sec
$r_{PGI,F6P}^{\max}$	2.45	mM/sec
r_{PFK1}^{\max}	0.33	mM/sec

In der Abbildung 75 sind die Ergebnisse der Modellsimulation mit den experimentellen Daten verglichen. Mit einer relativen Fehlerquadratsumme von 1.8% ist das V-Modell in der Lage die dynamischen Eigenschaften von PFK1 mit zufriedenstellender Genauigkeit zu beschreiben.

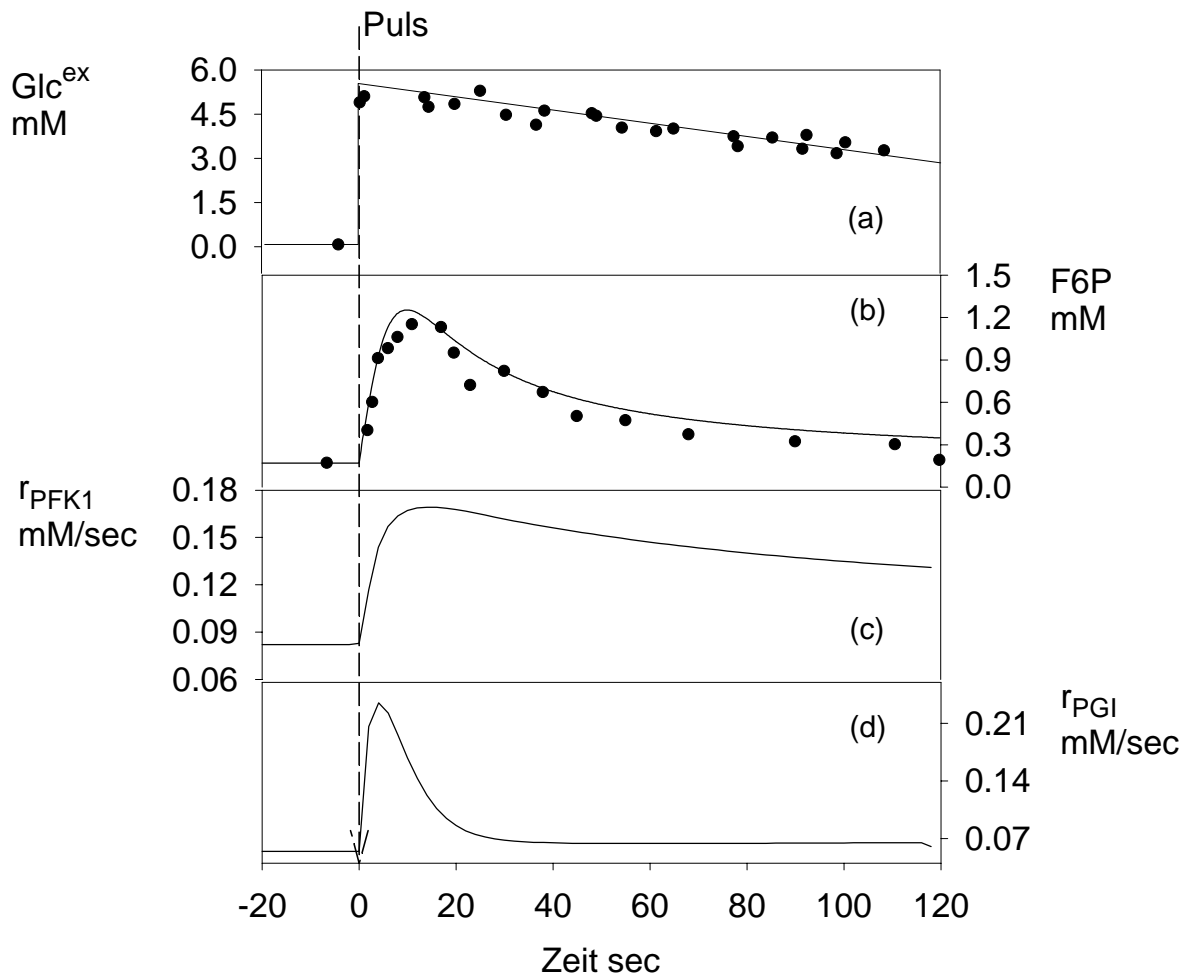


Abbildung 75. (a) Verlauf der extrazellulären Glucose-Konzentration nach einem Glucosepuls. (b) Vergleich zwischen Simulation und Messung für die F6P Konzentration. (c) Verlauf der Trajektorie der Flüsse PGI bzw. (d) PFK1.

Das oben beschriebene Parameterschätzverfahren führt zwar zu einem Satz von Parameterwerten, welche mit einer relativen Fehlerquadratsumme der F6P-Trajektorie von 1.8% die Optimierungsbedingungen erfüllen, liefert jedoch keinerlei Information über die Validität der einzelnen Parameterwerte. Zur Untersuchung dieser Fragestellung werden im nächsten Abschnitt spezielle Methoden der Sensitivitätsanalyse herangezogen.

4.4.5.4 Parametersensitivitätsanalyse und Modellreduktion

4.4.5.4.1 Erste Modellreduktion: Das V^* -Modell

Für einen Vergleich des Einflusses einzelner Substrate bzw. Effektoren auf dem Fluß der PFK1 im Verlauf des Puls-Experiments, wurden die sogenannten dynamischen

Elastizitätskoeffizienten $\varepsilon_i(t)$ berechnet (TOMOVIC UND VUCOBRATOWITCH, 1972) (MAUCH ET AL., 1997). Diese Koeffizienten beschreiben den Anteil lokaler Veränderungen der j -ten Reaktionsrate $r_j(t)$ bei einer sehr kleinen Veränderung der Konzentration des i -ten Metabolits $C_i(t)$ und werden wie folgt definiert:

$$\varepsilon_i(t) = \frac{\partial r_{PFK1}(t)}{\partial C_i(t)} \quad (4.39)$$

Das Differential auf der rechten Seite dieser Gleichung konnte unter Einsatz der symbolorientierten Programmiersprache MAPLEV™ (Waterloo, Maple Software) analytisch bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde zuerst die Ratengleichung der PFK1 (V-Modell) bezüglich der jeweiligen Konzentrationen differenziert. Im zweiten Schritt wurden die numerischen Werte für die zeitlichen Verläufe $C_i(t)$ aus der numerischen Simulation für F6P bzw. den Approximationsfunktionen für alle anderen Metabolite in die analytisch berechneten Differentiale eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Abbildung 76 zusammengestellt.

Für einen Vergleich des Einflusses der verschiedenen Effektoren auf die Aktivität der PFK1 ist es anschaulicher den zeitlich gemittelten Wert der Elastizitäten heranzuziehen. Dieser läßt sich für 10000 sec nach dem Puls wie folgt aus dem zeitlichen Integral der dynamischen Elastizitätskoeffizienten berechnen:

$$E_i = \frac{1}{10000} \int_{t=0}^{10000} \left| \frac{\partial r_{PFK1}(t)}{\partial C_i(t)} \right| dt \quad (4.40)$$

Die Ergebnisse dieser Berechnung sind in der Abbildung 77 gezeigt. Man erkennt, daß die Effektoren AMP, ADP und F1,6BP einen vergleichsweise niedrigen Beitrag zur Modulation der Enzymaktivität leisten.

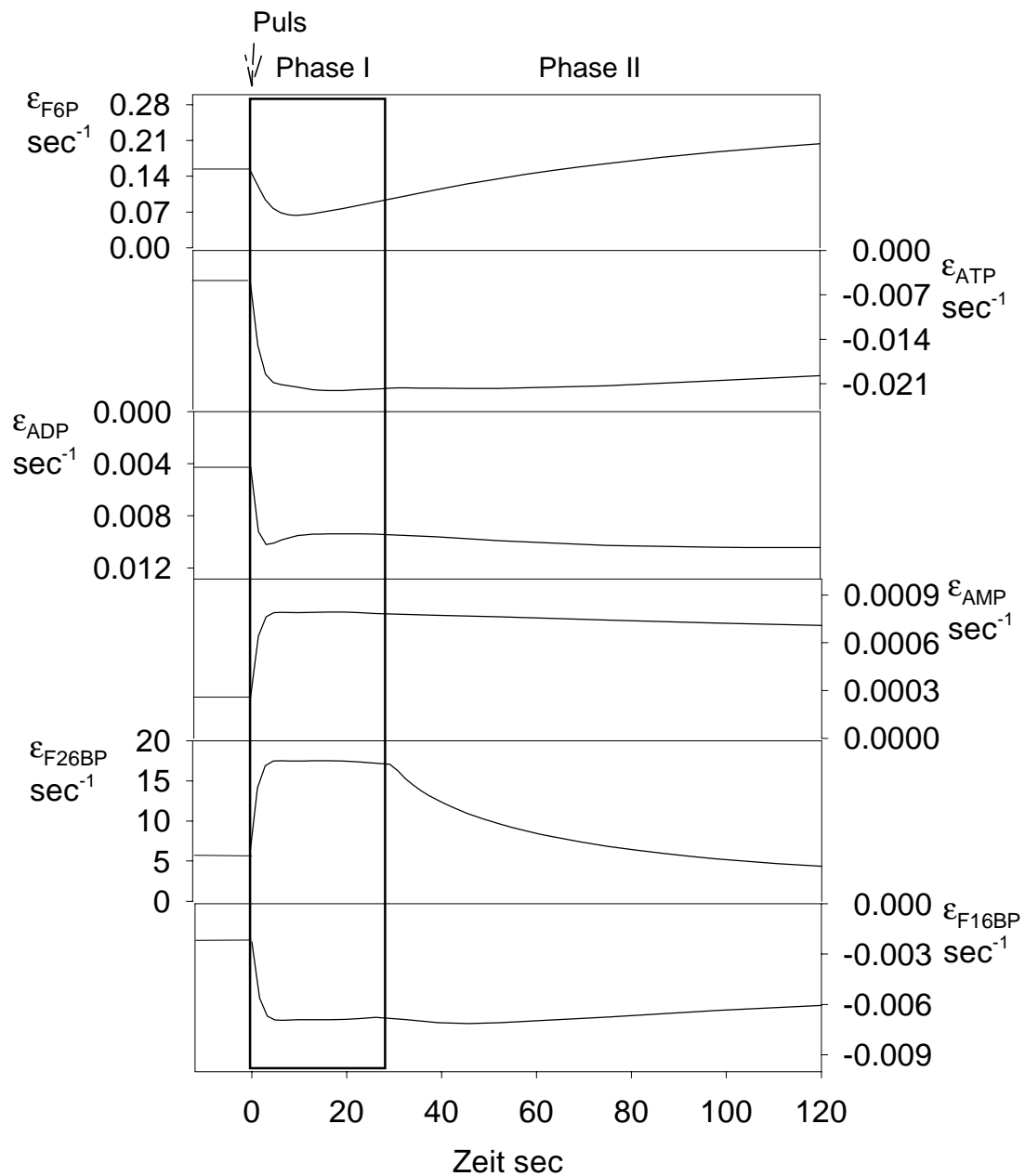


Abbildung 76. Zeitlicher Verlauf des dynamischen Elastizitätskoeffizienten der PFK1 (V-Modell) bezüglich der verschiedenen Metabolite für die ersten 120 Sekunden nach dem Glucosepuls.

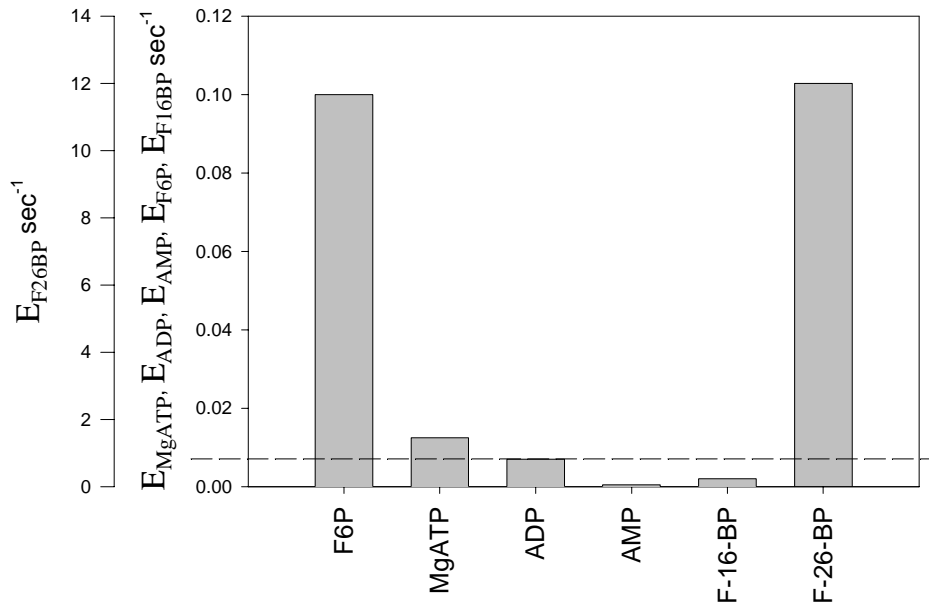


Abbildung 77. Vergleich der zeitlichen Mittelwerte der dynamischen Elastizitätskoeffizienten.

Auf der Grundlage dieses Vergleichs wurde die in der Tabelle 23 gezeigte Klassifikation vorgenommen. Als Schwellenwert für die Zuordnung "inelastisch" wurde der Wert E_{ADP} gewählt.

Die gezeigten Ergebnisse legen es nahe, die geringe Elastizität bezüglich einiger Metabolite zu einer Reduktion des Modells heranzuziehen.

Tabelle 23. Klassifizierung von elastischen und inelastischen Metaboliten.

<i>Elastisch</i>	<i>Inelastisch</i>
F6P	ADP
MgATP	AMP
F-2,6-BP	F-1,6-BP

Wenn durch:

$$\varepsilon_i(t) = \frac{\partial r_{PFK1}(C_i^{\text{inelastisch}}, C_i^{\text{elastisch}}, t)}{\partial C_i^{\text{inelastisch}}(t)} \rightarrow 0 \quad (4.41)$$

der Einfluß von C_i auf die Elastizität verschwindet, sollte wegen:

$$\alpha_i^{\text{inelastisch}}(t) = K_{i,j} C_i^{\text{inelastisch}}(t) \rightarrow 0 \quad (4.42)$$

der Parameter $K_{i,j}$ gegen Null gehen. Also:

$$K_{i,j} \rightarrow 0 \quad (4.43)$$

Aus dem Vergleich der zeitlichen Mittelwerte der verschiedenen Elastizitätskoeffizienten entsprechend Tabelle 23 läßt sich also der Schluß ziehen, daß das V-Modell bezüglich der Affinitätskonstanten für ADP, AMP und F-1,6-BP insensitiv ist. Den entsprechenden Parameterwerten (s. Tabelle 20) sollte demnach in den folgenden Untersuchungen keine weitere Bedeutung beigemessen werden.

Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurden die exklusiven Bindungskoeffizienten von ADP, AMP und F-1,6-BP in die Ratengleichung eingesetzt und die Wirkung auf die Trajektorie der PFK1 Aktivität durch Modellsimulationen verfolgt. Entsprechend der Tabelle 23 konnte kein Beitrag der Konzentrationen von ADP, AMP bzw. F-1,6-BP *in-vivo* Bedingungen festgestellt werden, so daß das V-Modell für *in-vivo* Bedingungen in ein reduziertes Modell überführt werden kann. Im folgenden wird das reduzierte Modell als das V*-Modell bezeichnet. Die entsprechende reaktionskinetische Gleichung ist in der Abbildung 78 zusammengestellt.

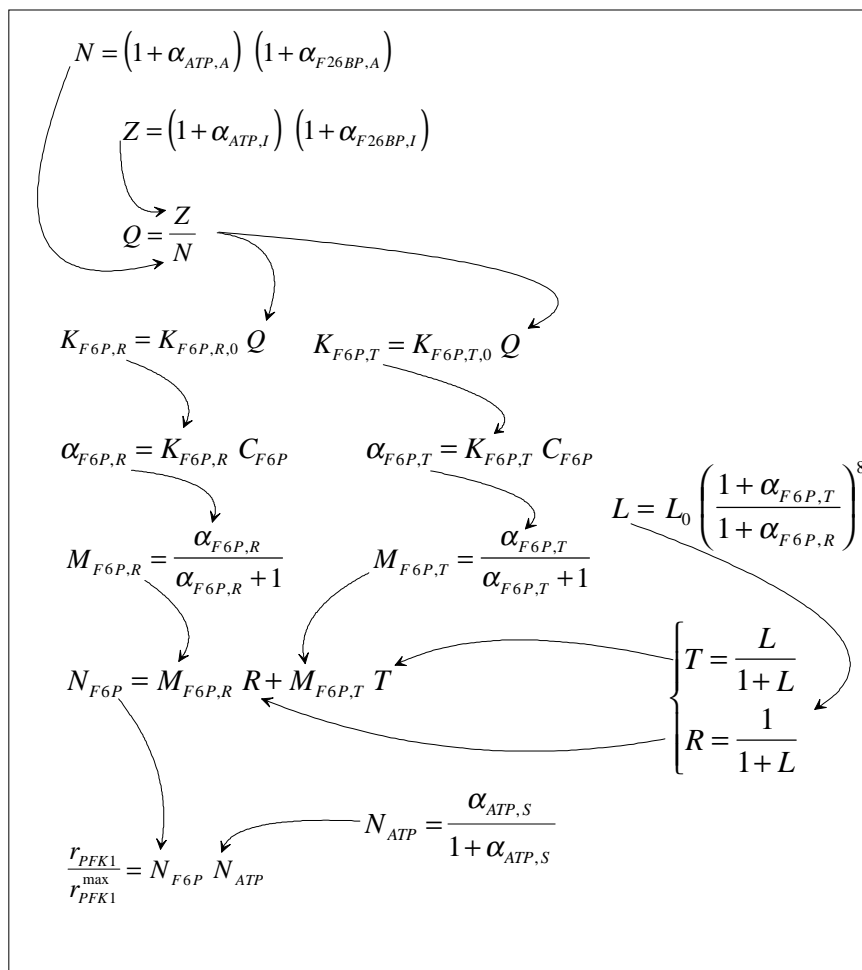


Abbildung 78. Reaktionskinetischer Ansatz für das V*-Modells.

4.4.5.4.2 Zweite Modell-Reduktion: Das V_{vivo} -Modell

Zwar führt die Berechnung der dynamischen Elastizitätskoeffizienten zu einer klaren Aussage bezüglich des Einflusses der Affinitätskonstanten von ADP, AMP und F-1,6-BP unter *in-vivo* Bedingungen, Informationen hinsichtlich der Sensitivitäten der übrigen Modellparameter lassen sich jedoch nicht gewinnen.

Die Voraussetzung für eine weiterreichende Analyse liefern die sogenannten globalen Flußkontrollkoeffizienten. Die globalen Flußkontrollkoeffizienten der PFK1 werden von MAUCH ET AL. (1997) wie folgt definiert:

$$\frac{dr_{\text{PFK1}}}{dP_j} = \frac{\partial r_{\text{PFK1}}}{\partial P_j} + \left[\sum_i \frac{\partial r_{\text{PFK1}}}{\partial C_i} \frac{\partial C_i}{\partial P_j} \right] \quad (4.44)$$

wobei P_j für den Modellparameter j steht. Der erste Term auf der rechten Seite dieser Gleichung wird als lokaler Flußkontrollkoeffizient bezeichnet. Er berücksichtigt den direkten Einfluß einer Veränderung des Parameters P_j auf die Aktivität des Enzyms. Wird z.B. die Affinität eines Substrats zu seiner Bindungsstelle durch einen Eingriff verändert, kann diese Veränderung einen direkten Einfluß auf die Aktivität des Enzyms ausüben. Hierbei wird ausgeschlossen, daß durch die Veränderung der betreffenden Substrataffinität eine Veränderung anderer Metabolitkonzentrationen (Substrate bzw. Effektoren) hervorgerufen wird, welche ihrerseits die Aktivität des Enzyms beeinflussen könnten. Letzteres tritt z. B. dann ein, wenn die Veränderung der Affinität bezüglich eines Effektors ($K_{k,i}$) eine Veränderung der Affinität bezüglich eines anderen Effektors ($K_{j,i}$) an der selben Bindungsstelle i verursacht. Ein Beispiel hierfür liefert die kompetitive Hemmung, bei der zwei verschiedene Inhibitoren die selbe Bindungsstelle am Enzym besetzen können. Eine Veränderung der Inhibitionskonstante bezüglich eines der Inhibitoren könnte unter Umständen zu einer Veränderung der Inhibitionskonstante des anderen Inhibitors führen, woraufhin die Konzentration des zweiten Inhibitors und dadurch die Aktivität des Enzyms beeinträchtigt werden kann. Ist eine derartige wechselseitige Abhängigkeit der Parameter von Bedeutung, müßte Gleichung (4.44) wie folgt erweitert werden:

$$\frac{dr_{\text{PFK1}}}{dK_j} = \frac{\partial r_{\text{PFK1}}}{\partial K_j} + \left[\sum_i \frac{\partial r_{\text{PFK1}}}{\partial C_i} \frac{\partial C_i}{\partial K_{k,i}} \frac{\partial K_{k,i}}{\partial K_{j,i}} \right], \quad i \neq j \neq k \quad (4.45)$$

Im vorliegenden Fall der PFK1 könnten folgende Regulationsphänomene in der Weise betroffen sein:

- Kompetitive Eigenschaften zwischen MgATP und ADP für dieselbe Bindungsstelle (ATZPODIEN ET AL., 1969).
- Synergistische Eigenschaften zwischen F-2,6-BP und AMP (KESSLER ET AL., 1982) (NISSLER ET AL., 1983) (NISSLER ET AL., 1984).
- Kompetitive Eigenschaften zwischen F-1,6-BP und F-2,6-BP (PRZYBILSKI ET AL., 1985) (KESSLER ET AL., 1986) (OTTO ET AL., 1986).

Die drei Fälle sind prinzipiell im V-Modell erfaßt. Für die denkbare Abhängigkeit der Modellparameter sind diese Phänomene von untergeordneter Bedeutung, weil bereits gezeigt wurde (s. Gleichung 4.43) daß unter *in-vivo* Bedingungen die Parameter für ADP, AMP und F-1,6-BP keinen Beitrag leisten.

Für die verbleibenden Parameter läßt sich Gleichung (4.44) also wie folgt ausschreiben:

$$\frac{dr_{PFK1}}{dK_j} = \frac{\partial r_{PFK1}}{\partial K_j} + \frac{\partial r_{PFK1}}{\partial C_i} \frac{\partial C_i}{\partial K_j}, \quad j = i = (F6P, MgATP, F2,6BP) \quad (4.46)$$

Da der zeitliche Verlauf der Konzentrationen aller Metabolite außer F6P als Approximationsfunktionen dem System aufgeprägt und F6P die einzige Zustandsvariable darstellt, erlaubt diese Vorgehensweise nun die Berechnung der zeitlichen Integrale der Flußkontrollkoeffizienten bezüglich der Parameter für F6P:

$$\Xi_{F6P,T,0} = \frac{1}{10000} \int_0^{10000} \left| \frac{dr_{PFK1}}{dK_{F6P,T,0}} \right| dt = \frac{1}{10000} \int_0^{10000} \left| \frac{\partial r_{PFK1}}{\partial K_{F6P,T,0}} + \frac{\partial r_{PFK1}}{\partial C_{F6P}} \frac{\partial C_{F6P}}{\partial K_{F6P,T,0}} \right| dt \quad (4.47)$$

bzw.:

$$\Xi_{F6P,R,0} = \frac{1}{10000} \int_0^{10000} \left| \frac{dr_{PFK1}}{dK_{F6P,R,0}} \right| dt = \frac{1}{10000} \int_0^{10000} \left| \frac{\partial r_{PFK1}}{\partial K_{F6P,R,0}} + \frac{\partial r_{PFK1}}{\partial C_{F6P}} \frac{\partial C_{F6P}}{\partial K_{F6P,R,0}} \right| dt \quad (4.48)$$

Der erste Term auf der rechten Seite beider Gleichungen stellt den lokalen Flußkontrollkoeffizienten dar und läßt sich mit Hilfe der symbol orientierten Programmiersprache MapleV™ (Waterloo, Maple Software) durch Differentiation der PFK1 Rate bezüglich der entsprechenden Parameter analytisch berechnen. Nachfolgend wurden die Konzentrationen $C_i(t)$ aus der numerischen Integration von Gleichung (4.33) für F6P sowie die Approximationsfunktionen $\hat{C}_i(t)$ für die Metabolite MgATP und F-2,6-BP (s. Anhang 2) eingesetzt.

Der zweite Term auf der rechten Seite der obigen Gleichungen setzt sich aus der dynamischen Elastizität:

$$\varepsilon_i(t) = \frac{\partial r_{PFK1}(t)}{\partial C_i(t)} \quad (4.49)$$

und dem lokalen Konzentrationskontrollkoeffizienten:

$$\frac{\partial C_{F6P}(t)}{\partial K_{F6P,R,0}} \quad (4.50)$$

zusammen. Die dynamischen Elastizitäten konnten bereits im letzten Abschnitt (4.4.5.4.1) analytisch bestimmt werden. Die lokalen Konzentrationskontrollkoeffizienten lassen sich

durch stückweise Linearisierung der Trajektorie von F6P zu jedem Zeitpunkt t_m in nächster Umgebung des betreffenden Parameters numerisch berechnen:

$$\frac{\partial C_{F6P}(t)}{\partial K_j} \approx \frac{\Delta C_{F6P}(t_m)}{\Delta K_j} \quad (4.51)$$

Diese Berechnungen liefern:

$$\Xi_{F6P,T,0} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mM}^2 / \text{sec} \quad (4.52)$$

bzw.:

$$\Xi_{F6P,R,0} = 2.4 \text{ mM}^2 / \text{sec} \quad (4.53)$$

Da, gemäß der Definition im Originalmodell von MONOD ET AL. (1967) L_0 (Konstante des Gleichgewichts zwischen den Konformationen R und T in Abwesenheit von Liganden) nur Einfluß auf die Konzentration des F6P nimmt gilt:

$$\frac{\partial C_i}{\partial L_0} = 0, \quad i = (MgATP, F26BP) \quad (4.53.a)$$

Die Berechnung des Flußkontrollkoeffizienten bezüglich dieses Parameters liefert wieder einen sehr kleinen Wert:

$$\Xi_{L_0} = \frac{1}{10000} \int_0^{10000} \left| \frac{dr_{PFK1}}{dL_0} \right| dt = \frac{1}{10000} \int_0^{10000} \left| \frac{\partial r_{PFK1}}{\partial L_0} + \frac{\partial r_{PFK1}}{\partial C_{F6P}} \frac{\partial C_{F6P}}{\partial L_0} \right| dt = 3 \cdot 10^{-7} \text{ mM} / \text{sec} \quad (4.54)$$

Zusammengefaßt ergibt sich folgendes Ergebnis:

$$\begin{cases} \Xi_{F6P,T,0} \rightarrow 0 \\ \Xi_{L_0} \rightarrow 0 \end{cases} \quad (4.55)$$

Dieses Ergebnis wurde durch Variationen der Parameter L_0 und $K_{F6P,T,0}$ anhand zusätzlicher Modellsimulationen abgesichert.

Offenbar leisten die Parameter L_0 und $K_{F6P,T,0}$ keinen Beitrag zur Regulation der PFK1-Aktivität unter *in-vivo* Bedingungen, weshalb für die weitere Behandlung der Wert beider Parameter zu Null gesetzt wird:

$$\begin{cases} L_0 \rightarrow 0 \\ K_{F6P,T,0} \rightarrow 0 \end{cases} \quad (4.56)$$

Somit läßt sich das V^* -Modell schließlich zu einem minimalen Modell reduzieren, welches in der Lage ist, *in-vivo* Eigenschaften der PFK1 unter dynamischen Bedingungen hinreichend genau zu beschreiben.

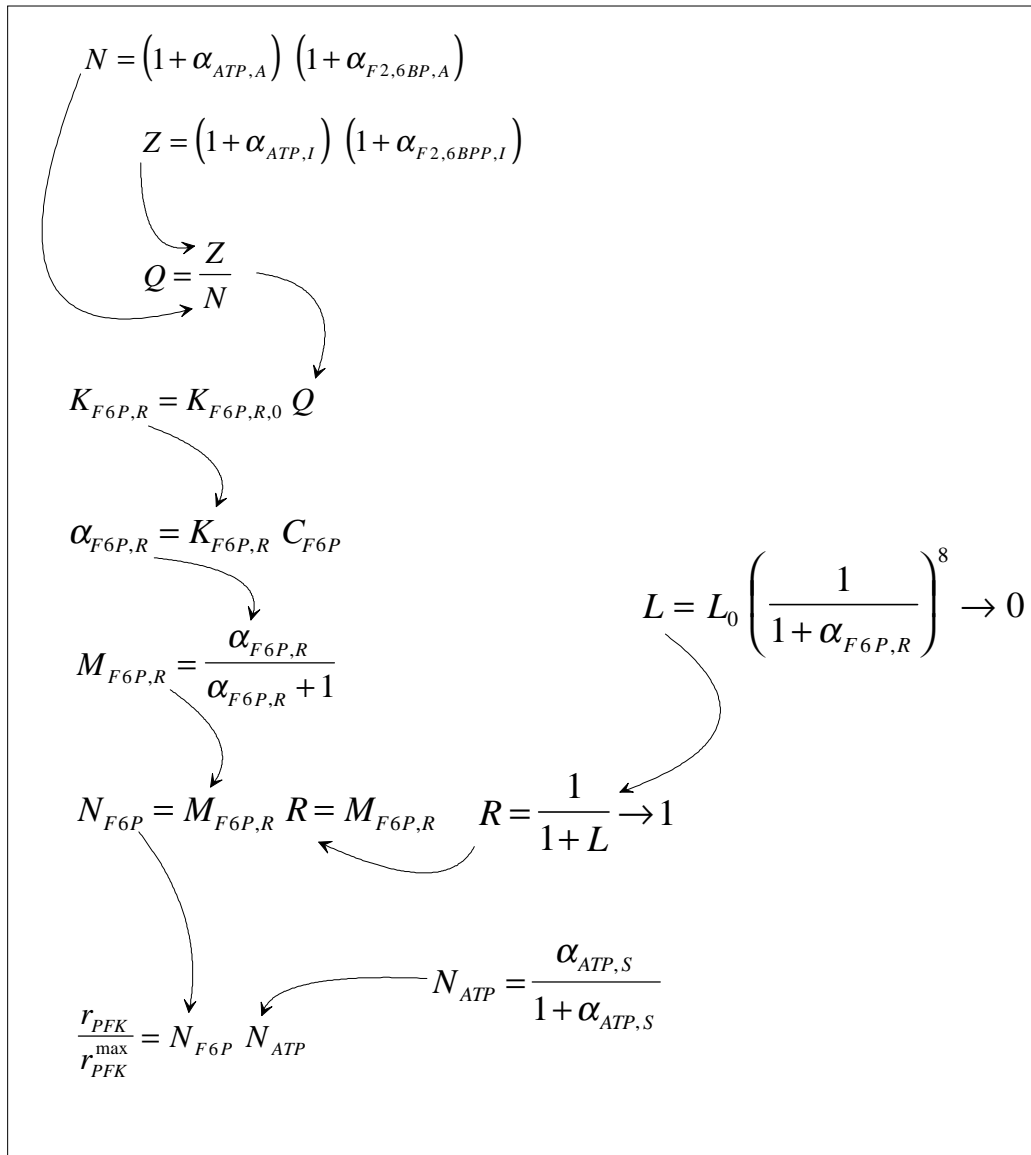


Abbildung 79. Reaktionskinetischer Ansatz für das V_{vivo} -Modell.

Die reaktionskinetische Gleichung für dieses Modell ist in der Abbildung 79 zusammengefaßt. Dieses reduzierte Modell wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als das V_{vivo} -Modell bezeichnet. Die zugehörigen Parameterwerte sind in der Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 24. Parameter des V_{vivo} -Modells.

<i>Parameter</i>			<i>Vertrauensbereich</i>
$K_{ATP,I}$	0.05	mM^{-1}	$\pm 2\%$
$K_{ATP,A}$	0.47	mM^{-1}	$\pm 7\%$
$K_{F-2,6-BP,I}$	3500.0	mM^{-1}	$\pm 20\%$
$K_{F-2,6-BP,A}$	1000.0	mM^{-1}	$\pm 17\%$
$K_{F6P,R,0}$	1.0	mM^{-1}	$\pm 23\%$
$K_{S,ATP}$	300.8	mM^{-1}	$\pm 5\%$

In der Tabelle 24 sind zusätzlich die Vertrauensbereiche für die einzelnen Parameter angegeben. Hierfür wurde unter der Annahme eines maximalen Meßfehlers für F6P von $\pm 10\%$ (THEOBALD, 1995) die für die Parameterschätzung eingesetzte gemessene Trajektorie entsprechend ausgelenkt und jeweils eine getrennte Parameteroptimierung durchgeführt.

In der Abbildung 80 ist der Reaktionsmechanismus der PFK1 dargestellt. Wegen $L_0=0$ nimmt das Enzym unter *in-vivo* Bedingungen entweder den Grundkonformationszustand R1 oder den Subkonformationszustand R2 an. Das Enzym liegt demnach ständig bezüglich F6P in einem hochaffinen Konformationszustand vor. Der Übergang zwischen dem höheraffinen Grundkonformationszustand und den niederaffinen Subkonformationszustand ist vom Beitrag der allosterischen Effektoren MgATP bzw. F-2,6-BP abhängig.

Wegen:

$$L_0 \rightarrow 0 \quad (4.57)$$

und demzufolge:

$$L = \frac{T}{R} = L_0 \left(\frac{1 + \alpha_{F6P,T}}{1 + \alpha_{F6P,R}} \right)^8 \rightarrow 0 \quad (4.58)$$

gelten die für die *in-situ* Bedingungen bereits aufgeführten Hypothesen der "übergeordneten Kooperativität" über homologe und heterologe Protein-Protein Wechselwirkungen (s. Abschnitt 4.4.4).

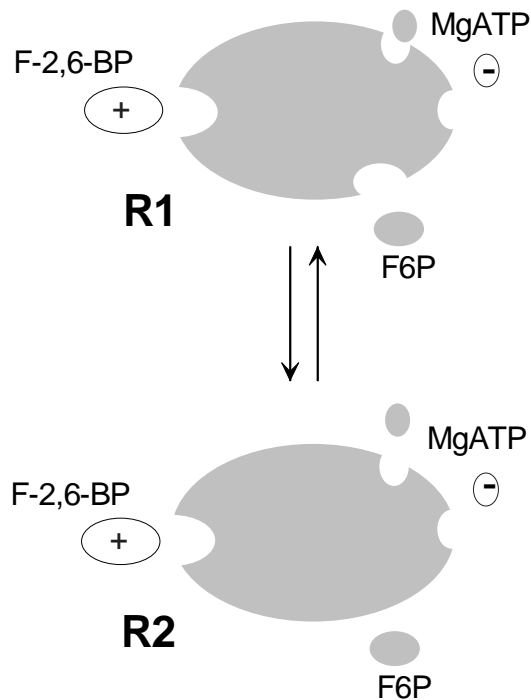


Abbildung 80. Reaktionskinetischer Mechanismus des V_{vivo} -Modells.

Bezüglich des reaktionskinetischen Mechanismus unterscheidet sich das V_{vivo} -Modell vom V_{situ} -Modell nur hinsichtlich des Einflusses der Effektoren. Unter *in-vivo* Bedingungen ist der Beitrag der Effektoren F-1,6-BP, AMP und ADP unbedeutend, während unter *in-situ* Bedingungen der Beitrag der Effektoren zwar im Vergleich zu *in-vitro* Verhältnissen geringer ausgeprägt dennoch nicht zu vernachlässigen ist.

4.4.5.5 Interpretation des zeitlichen Verlaufs der dynamischen Elastizitäten

Verfolgt man den zeitlichen Verlauf der dynamischen Elastizitätskoeffizienten im V_{situ} -Modell (s. Abbildung 82), so zeigen sich eine Reihe charakteristische Eigenschaften hinsichtlich des Beitrags der einzelnen Substrate bzw. Effektoren zur Modulation der Enzymaktivität.

Aus der Abbildung 82 wird ersichtlich, daß sich der Einfluß des Substrats F6P reziprok zum Verlauf dessen Konzentration verhält. Dieser reziproke Verlauf zwischen Konzentration und dynamischer Elastizität läßt sich als einen Beitrag des Substrats zur Homeostase des Flusses interpretieren (REICH UND SEL'KOV, 1981). Der lokale Beitrag läßt sich aus dem folgenden Zusammenhang erkennen:

$$\frac{\partial r_{\text{PFK1}}(C_{\text{F6P}}(t))}{\partial t} = \frac{\partial r_{\text{PFK1}}(t)}{\partial C_{\text{F6P}}(t)} \frac{\partial C_{\text{F6P}}(t)}{\partial t} \quad (4.59)$$

bzw.:

$$\frac{\partial r_{PFK1}(t)}{\partial t} = \varepsilon_{F6P}(t, \hat{C}_{F6P}, \hat{C}_{MgATP}, \hat{C}_{F26BP}) \frac{\partial C_{F6P}(t)}{\partial t} \quad (4.60)$$

Würde bei zunehmender Konzentration von F6P, die Elastizität und dementsprechend der positive Einfluß dieses Substrats auf die Aktivität des Enzyms zunehmen, so würde sich der Fluß über PFK1 fortwährend erhöhen. Sollte hingegen die Elastizität bei sinkender Konzentration des Substrats abnehmen, so würde der Fluß fortwährend sinken. In beiden Fällen erweist sich die Trajektorie des Flusses als instabil. Offenbar leisten die kinetischen Eigenschaften des Enzyms unter dynamischen Bedingungen einen entscheidenden Beitrag zur Stabilisierung bzw. Homeostase des Flusses (s. Abbildung 81).

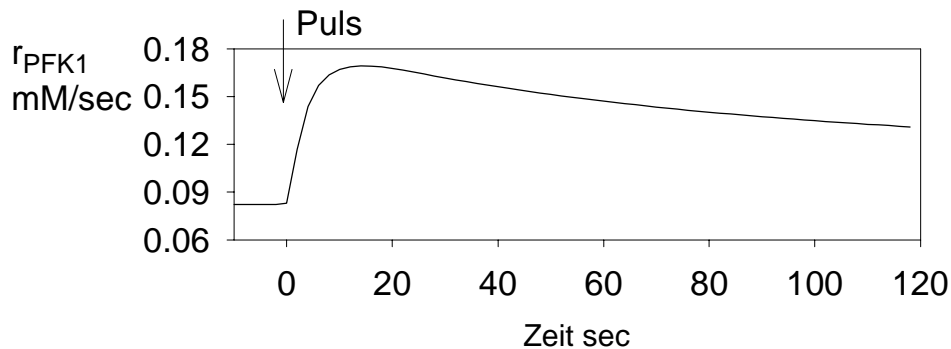


Abbildung 81. Zeitlicher Verlauf des PFK1 Flusses nach einem Glucosepuls.

Eine weitere interessante Schlußfolgerung, ergibt sich aus dem Vergleich des zeitlichen Verlaufs der dynamischen Elastizitätskoeffizienten bezüglich der Effektoren F-2,6-BP und MgATP. Hierbei ist zu beachten, daß MgATP zugleich auch als Substrat auftritt. Konzentration und Elastizität bezüglich MgATP verlaufen nach dem Glucosepuls gleichsinnig. Eine abnehmende MgATP Konzentration direkt nach dem Puls wird begleitet von einer entsprechenden Abnahme der inhibitorischen Wirkung des Metaboliten auf das Enzym. Dieses synchrone Verhalten von MgATP-Pool und Elastizität ε_{ATP} verhindert ein weiteres Absinken der MgATP-Konzentration durch weitere Aktivierung der PFK1.

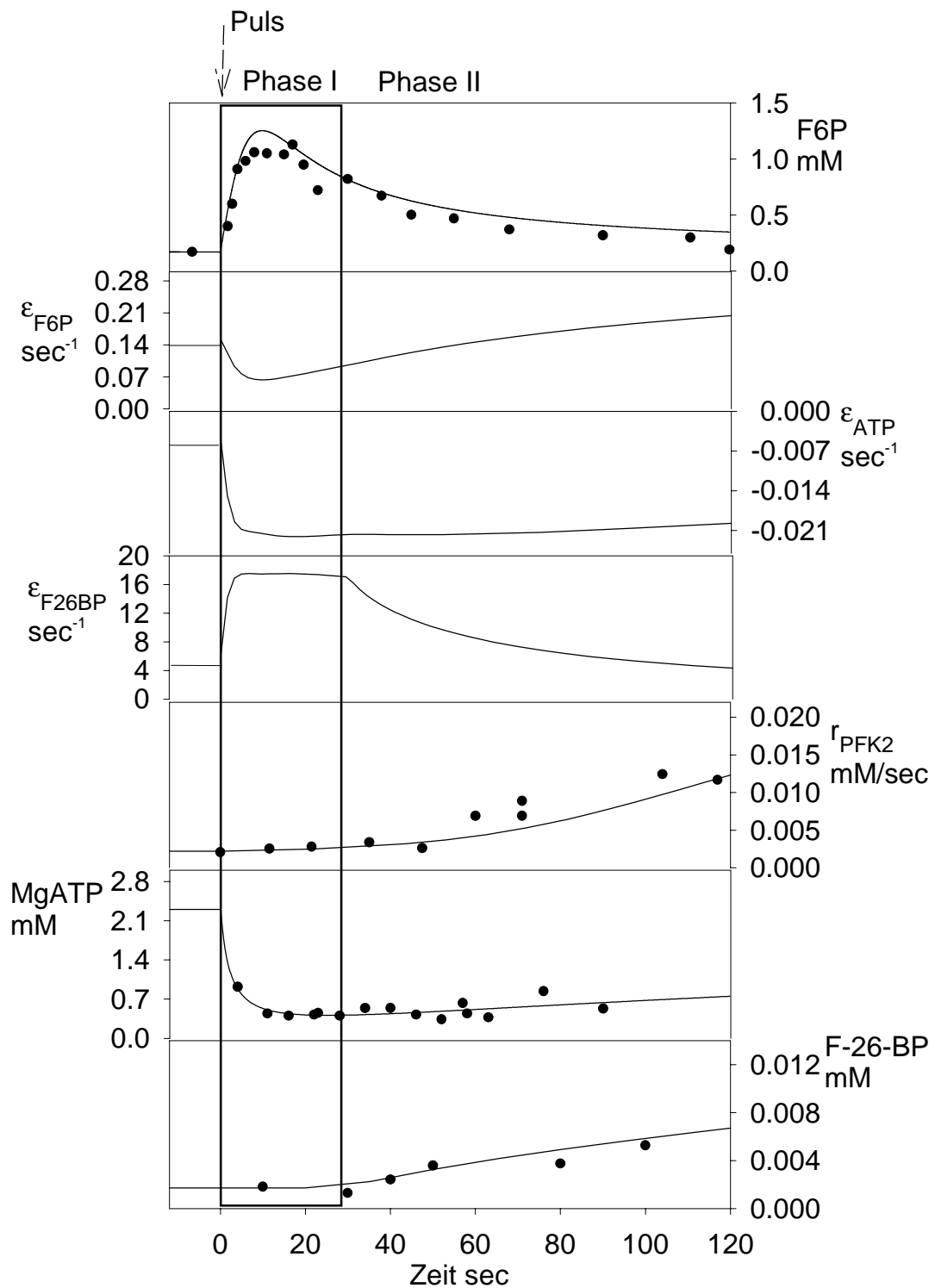


Abbildung 82. Zeitlicher Verlauf der PFK2 Aktivität sowie der Konzentrationen des F-2,6-BP, MgATP bzw. den zugehörigen dynamischen Elastizitätskoeffizienten.

Betrachtet man hingegen den Verlauf der dynamischen Elastizität bezüglich F-2,6-BP (s. Abbildung 82), so läßt sich in den ersten 30 Sekunden unmittelbar nach dem Glucosepuls (Phase I) ein Anstieg der Elastizität feststellen. Im selben Zeitraum steigt jedoch die Konzentration des F-2,6-BP nicht signifikant. Daraus geht hervor, daß in der Phase I Veränderungen in den Konzentrationen von F6P zu einer Erhöhung der Sensitivität der PFK1 Aktivität bezüglich F-2,6-BP führen. Beachtet man zusätzlich, daß entsprechend Abbildung 77 der Effektor F-2,6-BP den höchsten Beitrag zur Regulation der PFK1 Aktivität leistet, so läßt sich schließen, daß der F-2,6-BP Pool in der Phase I die Rolle eines Verstärkers spielt.

Der Rückgang der Elastizität bezüglich F-2,6-BP wird in der Phase II von einem Anstieg der F-2,6-BP Konzentration und der Aktivität der PFK2 begleitet. Diese zusätzliche Beobachtung läßt darauf schließen, daß die Regulation der PFK1 und des zugehörigen glycolytischen Flusses in der Phase II von der cAMP/PKA/PFK2 Signaltransduktionskaskade (s. Abschnitt 4.5) übernommen wird.

In der Abbildung 83 ist der Mechanismus der Regulation der PFK1 in der Phase I bzw. Phase II nach dem Glucosepuls noch einmal schematisch zusammengefaßt.

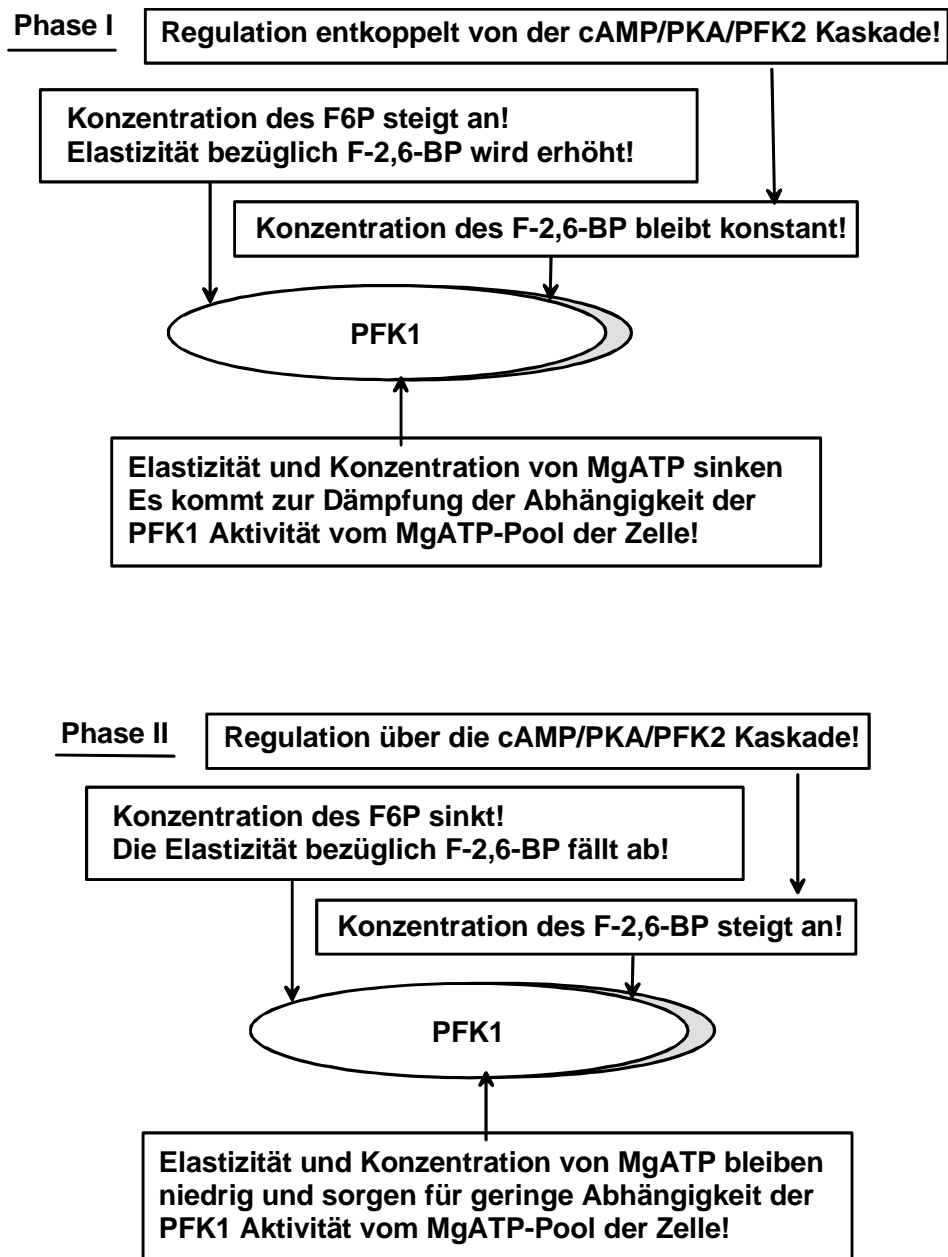


Abbildung 83. Verlauf der Regulation der PFK1 in der Phase I (oben) und II (unten) nach dem Glucosepuls.

4.4.5.6 Vergleich der Parameter *in-vitro*, *in-situ* und *in-vivo*

Vor dem Hintergrund der *in-vitro* bzw. *in-situ* Untersuchungen, läßt sich die wichtige Frage stellen, inwiefern die *in-vitro* bzw. *in-situ* Messungen zur Beschreibung der Verhältnisse *in-vivo* beitragen können.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde der Versuch unternommen anhand des V-Modells und den entsprechenden *in-vitro* bzw. *in-situ* Parametern (s. Tabelle 17) dynamische Verhältnisse unter *in-vivo* Bedingungen zu beschreiben. Hierzu wurde der Algorithmus der *in-vivo* Parameteridentifikation herangezogen, wobei für die PFK1 die *in-vitro* bzw. *in-situ* Parameter (s. Tabelle 17) in ihren Werten fixiert und nur die Parameter für PGI zur Minimierung der Fehlerquadratsumme $\varepsilon_{rel,F6P}$ variiert wurden. Die Ergebnisse dieser Modellsimulationen sind in der Abbildung 84 zusammengefaßt. Neben den Ergebnissen für die *in-situ* (s. Abbildung 84, rechts) bzw. *in-vitro* Parameter (s. Abbildung 84, mitte) sind auch die entsprechenden Simulationen mit den *in-vivo* Parametern (s. Tabelle 24) zum Vergleich dargestellt (s. Abbildung 84, links).

Berücksichtigt man bei der Identifikation die Nebenbedingung gemäß Gleichung 4.36, daß die Aktivität der PFK1 direkt nach dem Glucosepuls nicht sinken dürfte, dann konvergiert das Parameterschätzverfahren nicht. Hebt man diese Nebenbedingung wieder auf, so sinkt die PFK1 Aktivität unmittelbar nach dem Puls und die PGI erreicht bereits bei 20 sec eine negative Aktivität, daß eine Umwandlung von F6P in G6P zur Folge hätte. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß obwohl die experimentellen Daten bezüglich der F6P Konzentration anhand der *in-vitro* bzw. *in-situ* Parameter unter Umständen beschrieben werden können, dennoch der Verlauf der Trajektorie der Flüsse zu keinem physiologisch vertretbaren Ergebnis führt.

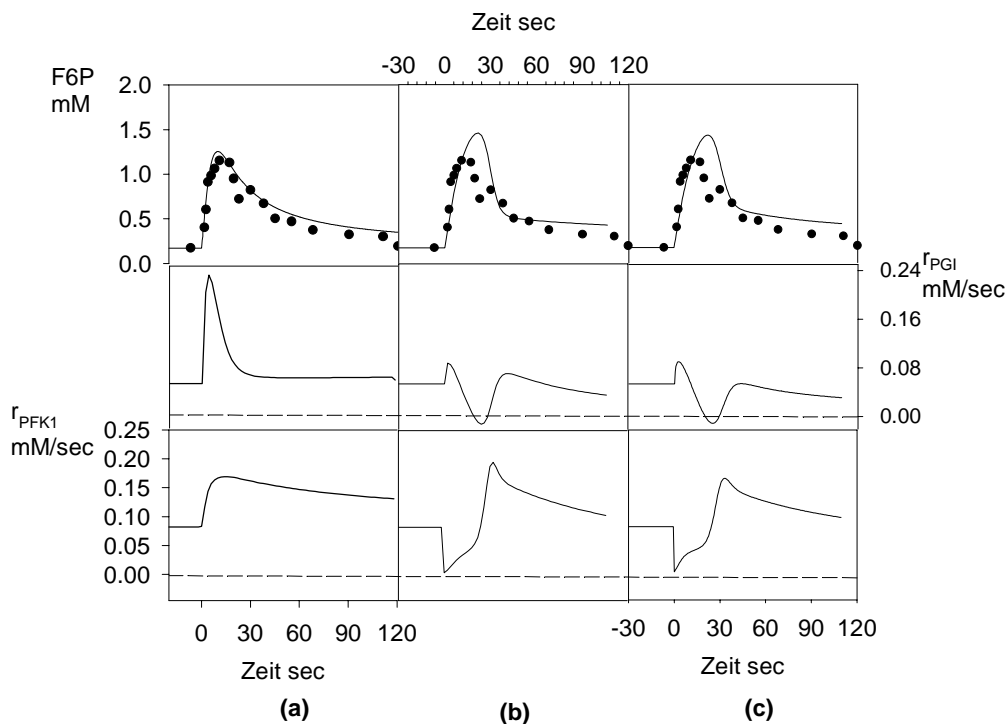


Abbildung 84. (a) Simulation mit optimalen Parameterschätzwerten auf der Grundlage der *in-vivo* Messungen. (b) Optimierung der Parameter der PGI und Fixierung der Parameter der PFK1 aus *in-vitro* Messungen. (c) Optimierung der Parameter der PGI und Fixierung der Parameter der PFK1 aus *in-situ* Messungen.

Vergleicht man schließlich zusammenfassend die Parameterwerte des V_{vivo} -Modells, die mit den unterschiedlichen Datensätzen aus den *in-vivo*, *in-situ* und *in-vivo* Messungen identifiziert wurden (s. Tabelle 25), sieht man, daß die beiden Parameter L_0 und K_{T0} unter *in-situ* und *in-vitro* Bedingungen gegen Null gehen. Dieser Sachverhalt wurde mit möglichen Einflüssen der homologen bzw. heterologen Protein-Protein-Wechselwirkungen in der Zelle interpretiert. Weitere Unterschiede in den Zahlenwerten der Parameter zwischen *in-vitro*, *in-situ* und *in-vivo* entsprechend Tabelle 25 entziehen sich einer mechanistischen Deutung.

Tabelle 25. Vergleich der Parameter des V_{vivo} -Modells *in-vitro*, *in-situ* und *in-vivo*.

<i>Parameter</i>	<i>in-vitro</i>	<i>in-situ</i>	<i>in-vivo</i>	
$K_{ATP,I}$	0.4	0.11	0.05	mM^{-1}
$K_{ATP,A}$	6.48	1.1	0.47	mM^{-1}
$K_{F-2,6-BP,I}$	NI	NI	3500.0	mM^{-1}
$K_{F-2,6-BP,A}$	NI	NI	1000.0	mM^{-1}
$K_{F6P,R,0}$	4.48	9.61	1.0	mM^{-1}
$K_{C,ADP}$	3.07	0.0	0.0	mM^{-1}
$K_{S,ATP}$	27.15	6.55	300.8	mM^{-1}
L_0	40.57	0.0	0.0	-
K_{T0}	0.92	0.0	0.0	mM^{-1}

1) NI: Nicht identifizierbar.

4.5 Das PFK2 System

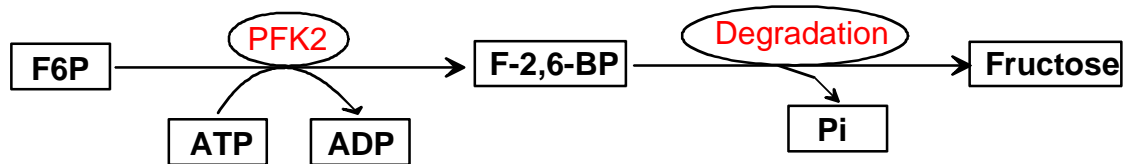


Abbildung 85. Der Bilanzraum um F-2,6-BP.

In der Abbildung 85 ist der Bilanzraum um F-2,6-BP mit den zugehörigen Reaktionen dargestellt. Demnach ist die cytoplasmatische Konzentration des F-2,6-BP sowohl von einer Bildungsrate über PFK2 (YAMASHOJI AND HESS, 1984), r_{PFK2} , als auch vom Beitrag eines Degradationssystems, r_{Deg} , abhängig. Entsprechend läßt sich der F-2,6-BP-Pool wie folgt bilanzieren:

$$\frac{dC_{F26BP}}{dt} = r_{PFK2} - r_{Deg} - \mu C_{F26BP} \quad (4.61)$$

Der dritte Term μC_{F26BP} , berücksichtigt den Beitrag der Verdünnung des Metabolits durch Zellwachstum (REICH UND SEL'KOV, 1981). Dabei wird angenommen, daß die Wachstumsrate μ im Verlaufe des Glucosepulses unverändert bleibt. Dieser entspricht der Verdünnungsrate der kontinuierlichen Kultur im stationären Zustand $\mu = D = 0.1 \text{ h}^{-1}$.

Im folgenden werden die einzelnen Reaktionen im PFK2 System hinsichtlich ihrer dynamischen Eigenschaften unter *in-vivo* Bedingungen näher untersucht.

4.5.1 Reaktionskinetischer Ansatz für die PFK2

S. cerevisiae besitzt nachweislich zwei verschiedene Typen von PFK2. Diese sind jeweils Produkte zweier verschiedenen Gene, nämlich *PFK26* (KRETSCHMER ET AL., 1991) und *PFK27* (BOLES ET AL., 1996) (ARAGÓN ET AL., 1987) (KRETSCHMER UND FRAENKEL, 1991).

Wie bereits BOLES ET AL. (1996) sowie KRETSCHMER UND FRAENKEL (1991) nachgewiesen haben, ist das Produkt des Gens *PFK27* im Gegensatz zum Produkt des Gens *PFK26* nicht-konstitutiv und leistet unter glucoselimitierten Bedingungen entsprechend ihrer niedrigen Aktivität keinen signifikanten Beitrag zur Gesamtreaktion der Phosphorylierung von F6P. Vor diesem Hintergrund wird ihr Beitrag auch im weiteren Verlauf dieser Arbeit vernachlässigt. Nachfolgend wird nur das Produkt des Gens *PFK26* mit der Abkürzung PFK2 gekennzeichnet.

Die PFK2 besteht aus zwei identischen Untereinheiten zu je 93.5 kD (KRETSCHMER ET AL., 1991). Untersuchungen hinsichtlich des Reaktionsmechanismus des Enzyms aus *S. cerevisiae* sind nicht bekannt. KATIJAMA ET AL. (1984) legen jedoch für PFK2 aus Leberzellen den möglichen Ansatz eines reversiblen Ordered-Bi-Bi Mechanismus mit Produktinhibierung durch ADP nahe (s. Abbildung 86, oben). Entsprechende reaktionskinetische Gleichungen werden jedoch von den Autoren nicht angegeben. Grund hierfür liegt möglicherweise in der Komplexität der Herleitung des betreffenden mathematischen Ansatzes bei der Berücksichtigung der Produkt-Inhibierung durch ADP.

Zwar weist PFK2 aus *S. cerevisiae* eine deutliche genetische Verwandtschaft (42% Homologie) mit dem entsprechenden Enzym aus Leberzellen (KRETSCHMER ET AL., 1991), jedoch zeigten FURUYA ET AL. (1981) und EL MAGHRABI ET AL. (1981) in unabhängigen *in-vitro* Studien, daß die Reaktion der PFK2 aus *S. cerevisiae* im Gegensatz zu Leberzellen, irreversibel ist. Diese Beobachtung wurde von FRANCOIS ET AL. (1984), FRANCOIS ET AL. (1988), SAKATA ET AL. (1990) und KRETSCHMER ET AL. (1991) bestätigt.

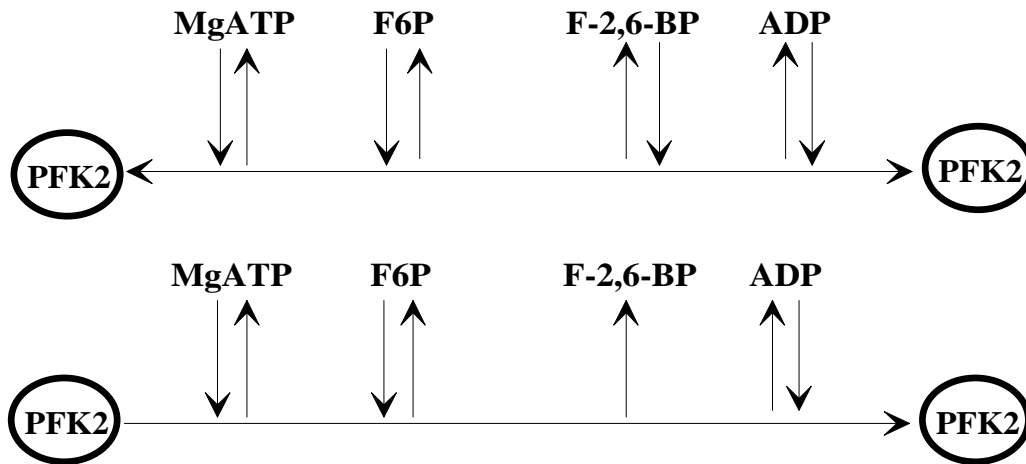


Abbildung 86. Reaktionsmechanismus der PFK2 aus Leberzellen (oben) (KATIJAMA ET AL., 1984) bzw. *S. cerevisiae* (unten) (FURUYA ET AL., 1981).

Vor diesem Hintergrund wurde zur Beschreibung der Reaktionskinetik der PFK2 in *S. cerevisiae* der Ansatz einer irreversiblen Ordered-Bi-Bi Mechanismus mit Produkt-Inhibierung durch ADP herangezogen (Abbildung 86, unten). Die Teilreaktionen eines solchen Mechanismus sind in der Abbildung 87 dargestellt.

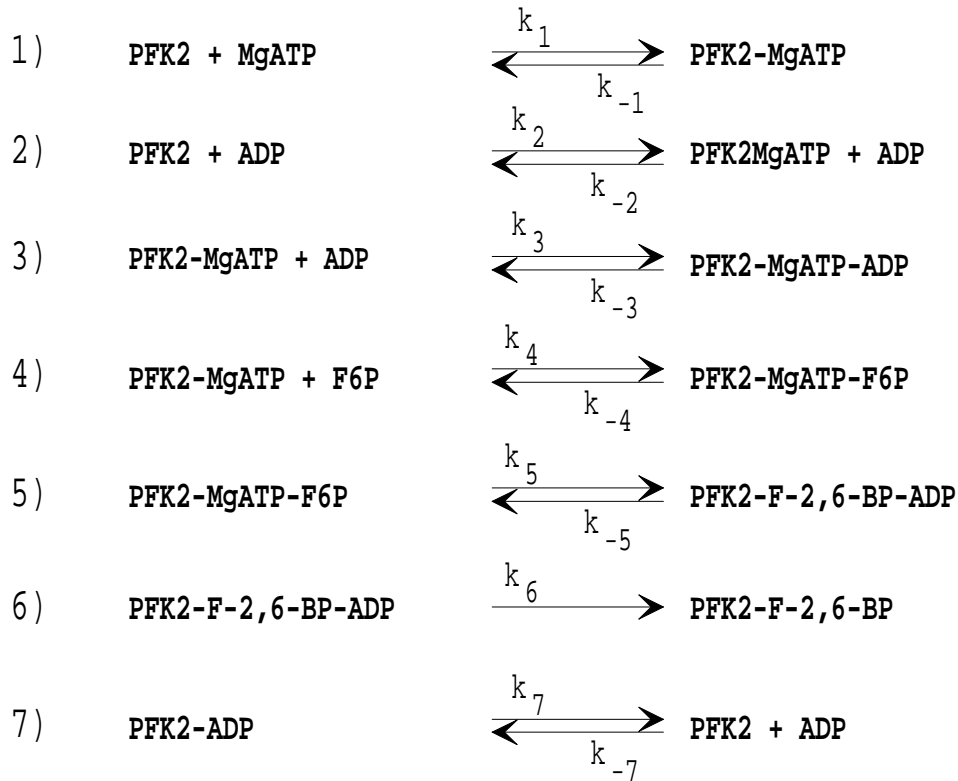


Abbildung 87. Teilreaktionen der PFK2 in *S. cerevisiae*. Angenommener Reaktionsmechanismus: Irreversibler Ordered-Bi-Bi mit Inhibierung durch ADP.

Der entsprechende kinetische Ansatz für die Bildungsrate des Produkts F-2,6-BP läßt sich aus den Bilanzgleichung dieser Teilreaktionen herleiten. Aufgrund des hohen rechnerischen Aufwandes wurde die Herleitung dieser Rate mit Hilfe eines speziellen Programms (ARNOLD, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, laufende Untersuchungen), welches auf der symbol-orientierten Programmiersprache MAPLEV™ (Waterloo, Maple Software) basiert durchgeführt. Daraus ergibt sich für die normierte Reaktionsrate:

$$\frac{r_{\text{PFK2}}}{r_{\text{PFK2}}^{\text{max}}} = \left(\frac{\left(\frac{k_3}{k_{-3}k_4} + \frac{k_3k_{-4}}{k_5k_{-3}k_4} \right) C_{\text{ADP}}}{C_{\text{F6P}}} + \frac{k_2 C_{\text{ADP}}}{k_1 k_{-2} C_{\text{MgATP}}} + \frac{\left(\frac{k_{-1}k_2k_{-4}}{k_5k_1k_{-2}k_4} + \frac{k_{-1}k_2}{k_1k_{-2}k_4} \right) C_{\text{ADP}}}{C_{\text{MgATP}} C_{\text{F6P}}} + \frac{1}{k_5} + \frac{1}{k_{-2}} + \frac{k_{-4}}{k_5k_4} + \frac{1}{k_4} + \frac{k_{-1}k_{-4}}{k_5k_1k_4} + \frac{k_{-1}}{k_1k_4} \right)^{-1}$$

(4. 62)

Die Reaktionskonstante k_j der Teilreaktion j bezieht sich auf die Nummerierung in Abbildung 87, wobei das positive Vorzeichen im Index eine Hinreaktion und das negative eine Rückreaktion kennzeichnet.

Zur Vereinfachung dieser Gleichung werden folgende Abkürzungen eingeführt:

$$K_{PFK2, MgATP} = \frac{k_5 k_{-2}}{(k_{-2} + k_5) k_1} \quad (4.63)$$

$$K_{PFK2, F6P} = \frac{(k_{-4} + k_5) k_{-2}}{k_4 (k_{-2} + k_5)} \quad (4.64)$$

$$K_{PFK2, i, F6P} = \frac{k_{-1} k_{-4} + k_{-1} k_5}{k_5 k_4} \quad (4.65)$$

$$K_{PFK2, i, MgATP} = \frac{k_{-1} k_2 k_{-3}}{k_1 k_{-2} k_3} \quad (4.66)$$

$$K_{PFK2, i, ADP, 1} = \frac{k_{-3}}{k_3} \quad (4.67)$$

$$K_{PFK2, i, ADP, 2} = \frac{k_{-2}}{k_2} \quad (4.68)$$

woraus es sich ergibt:

$$\frac{r_{PFK2}}{r_{PFK2}^{\max}} = \frac{C_{MgATP} C_{F6P}}{\frac{K_{PFK2, F6P}}{K_{PFK2, i, ADP, 1}} C_{MgATP} C_{ADP} + \frac{K_{PFK2, MgATP}}{K_{PFK2, i, ADP, 2}} C_{F6P} C_{ADP} + \frac{K_{PFK2, F6P} K_{PFK2, i, MgATP}}{K_{PFK2, i, ADP, 1}} C_{ADP} + C_{MgATP} C_{F6P} + \dots} \dots \frac{\dots}{K_{PFK2, F6P} C_{MgATP} + K_{PFK2, MgATP} C_{F6P} + K_{PFK2, i, F6P} K_{PFK2, MgATP}} \quad (4.69)$$

4.5.2 Dynamik der PFK2 Aktivität

FRANCOIS ET AL. (1984), DAVIES ET AL. (1992) und BOLES ET AL. (1993) haben bereits in unabhängigen Untersuchungen darauf hingewiesen, daß ein spezieller Signaltransduktionsweg für die Aktivierung der PFK2 nach einem Glucosepuls verantwortlich ist. Entsprechend dieser Hypothese wird durch das Auftragen des Glucosepulses ein sogenanntes Ras-Protein aktiviert, welches seinerseits für die Aktivierung der Acylase verantwortlich ist. Diese Aktivierungskaskade führt zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration (THEVELEIN, 1991). Der Anstieg der cAMP Konzentration führt zur Aktivierung der PKA, welche seinerseits in der Lage ist die PFK2 durch Phosphorylierung in einen aktiven Zustand zu überführen.

Die Hypothese der Aktivierung der PFK2 über den Signaltransduktionsweg Ras/cAMP/PKA, wird von den entsprechenden Autoren (FRANCOIS ET AL., 1984) (DAVIES ET AL., 1992) (BOLES ET AL., 1993) ausschließlich durch eine qualitative Interpretation experimenteller Daten begründet. Aus diesem Blickwinkel liefern die bereits bestehenden Studien kein quantitatives Bild über die dynamischen Eigenschaften des Enzyms unter *in-vivo* Bedingungen.

4.5.2.1 Entkopplung der PFK2 Aktivität vom glycolytischen Fluß

Zur genaueren Untersuchung der PFK2 Aktivierung durch Phosphorylierung, wird nachfolgend der zeitliche Verlauf der Konzentrationen der Substrate MgATP und F6P sowie des Produkts F-2,6-BP in den ersten 60 Sekunden nach dem Glucosepuls betrachtet (s. Abbildung 88).

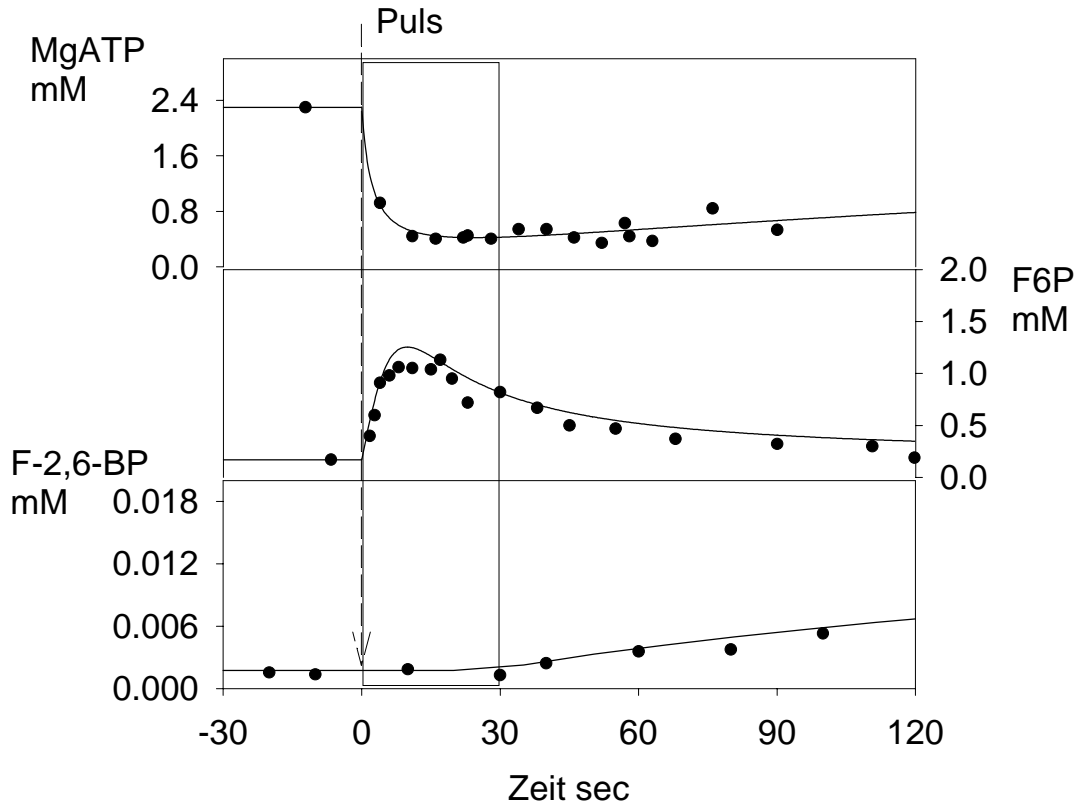


Abbildung 88. Verlauf der Konzentration von MgATP, F6P und F-2,6-BP in den ersten 120 sec nach dem Glucosepuls.

Aus der Darstellung geht hervor, daß sich F6P bzw. MgATP innerhalb der ersten 30 sec nach dem Glucose-Puls in einem Konzentrationsbereich von 0.1-1.2 mM bzw. 0.4-2.3 mM verändern, während die Konzentration von F-2,6-BP seinen stationären Wert beibehält. Hieraus folgt, daß die Reaktionsrate der PFK2 in den ersten 30 sec nach dem Glucose-Puls unabhängig von den Konzentrationen der Substrate F6P bzw. ATP ist. In diesem Zeitbereich herrscht eine Sättigung des Enzyms durch beide Substrate:

$$\begin{aligned}
 [r_{PFK2}]_{0 < t < 30} &= \lim(r_{PFK2}) = r_{PFK2}^{\max} \\
 C_{MgATP} &\rightarrow \infty \\
 C_{F6P} &\rightarrow \infty
 \end{aligned}
 \tag{4.70}$$

Da F6P und MgATP auch nach den ersten 30 sec nicht die entsprechenden Konzentrationsbereiche verlassen, läßt sich schließen, daß die PFK2 im gesamten Zeitraum nach dem Glucosepuls gesättigt und hinsichtlich seiner Aktivität unabhängig von den Konzentrationen der beteiligten Substrate ist. Diese Beobachtung widerspricht allerdings der Hypothese von LEDERER ET AL. (1981) und CLIFTON UND FRAENKEL (1983), welche die Aktivierung der PFK2 und den Anstieg der F-2,6-BP Konzentration auf den Anstieg des Substrats F6P zurückführen. Die Ergebnisse unterstützen jedoch erneut die Existenz eines speziellen Signaltransduktionsweges (FRANCOIS ET AL. 1984) (DAVIES ET AL. 1992) (BOLES ET AL. 1993) bei der die maximale Aktivität der PFK2 nur durch die Phosphorylierung des Enzyms erhöht werden kann. Entsprechend dieser Beobachtungen ist die Aktivierung der PFK2 vom glycolytischen Fluß entkoppelt. Die Signaltransduktion wirkt sowohl unabhängig von der Glucose-Aufnahmerate als auch vom glycolytischen Fluß. Die Glycolyse und die entsprechenden Stoffflüsse unterliegen zwar selbst dem Einfluß der Signaltransduktionskaskade, können jedoch ihrerseits keinen Einfluß auf die Signaltransduktion ausüben. Damit gewährleistet die Zelle eine Autonomie des cAMP/PKA/PFK2 Signaltransduktionsweges.

4.5.2.2 Aktivierung der PFK2 über die cAMP/PKA/PFK2 Signaltransduktions-Kaskade

Für die weitere Interpretation ist es erforderlich die Dynamik der cAMP-Kaskade zu untersuchen. MACHERHAMMER hat den zeitlichen Verlauf der cAMP Konzentration nach einem Glucosepuls in einer glucoelimitierten kontinuierlichen Kultur von *S. cerevisiae* gemessen (Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, laufende Untersuchungen). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 89 dem zeitlichen Verlauf der PFK2 Aktivität gegenübergestellt. Die Bestimmung der PFK2 Aktivität wurde mit Hilfe der in Abschnitt (3.13) beschriebenen Methoden durchgeführt. Es wird deutlich, daß die cAMP Konzentration unmittelbar nach dem Glucosepuls ansteigt, wenn in diesem Zeitraum die PFK2 Aktivität noch keine signifikante Veränderung aufweist. Erst nach 80 Sekunden, während die cAMP Konzentration bereits ihr Maximum erreicht hat und wieder abnimmt, beginnt ein Anstieg der PFK2 Aktivität.

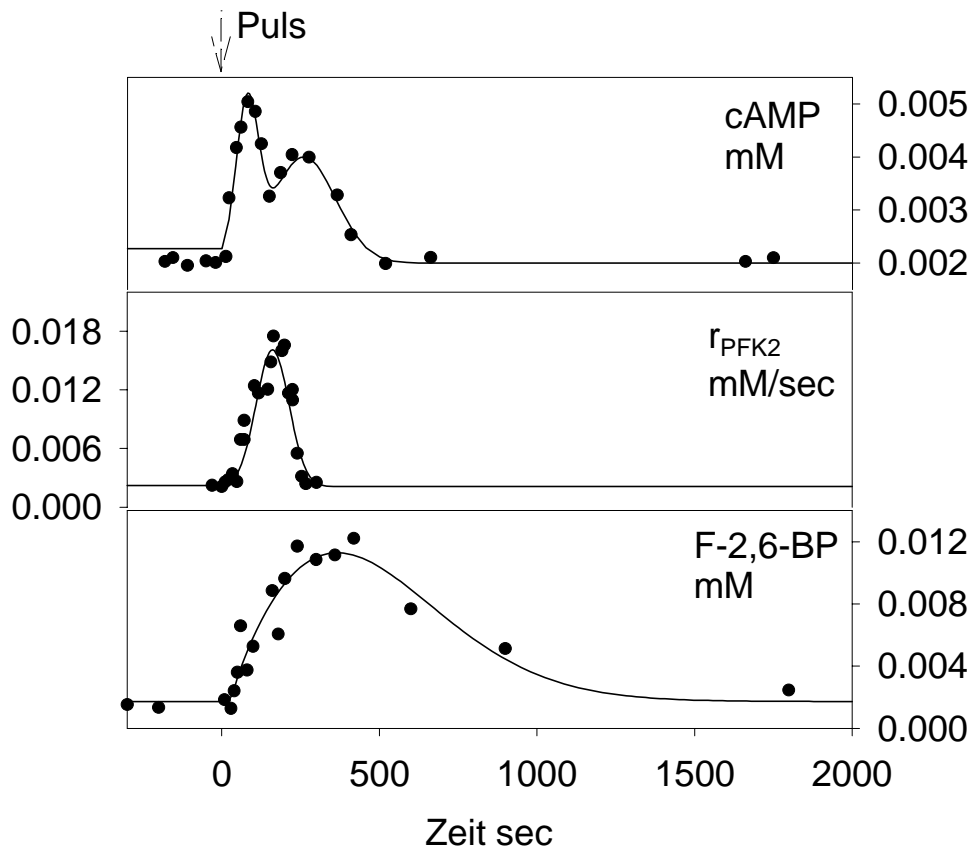


Abbildung 89. Zeitlicher Verlauf der PFK2 Aktivität (Messung entsprechend Abschnitt 3.7) sowie der cAMP Konzentration nach einem Glucose-Puls entsprechend (MACHERHAMMER, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, laufende Untersuchungen).

Zum besseren Verständnis der Zusammenhänge bezüglich der Aktivierung der PFK2 über die Signaltransduktionskaskade wurde der zeitliche Verlauf der cAMP Konzentration bzw. der PFK2 Aktivität nach dem Glucosepuls mit Hilfe der Approximationsfunktionen:

$$\hat{C}_{cAMP}(t) = \left[2.0 + 2.8 \exp\left(-0.5 \left(\frac{t-80.0}{35.0}\right)^2\right) + 2.0 \exp\left(-0.5 \left(\frac{t-260.0}{100.0}\right)^2\right) \right] 10^{-3} \quad (4.71)$$

bzw.:

$$\hat{r}_{PFK2}(t) = \left[0.3 + 2.0 \exp\left(-0.5 \left(\frac{t-t_0}{52.0}\right)^2\right) \right] 0.007 \quad (4.72)$$

korreliert. Diese wurden in Abbildung 90 in einem Phasendiagramm gegeneinander aufgetragen.

Aus dem Diagramm geht hervor, daß die Zunahme der cAMP Konzentration in den ersten 50 Sekunden keinen signifikanten Einfluß auf die PFK2 Aktivität nimmt. Erst nach dieser Verzögerung kommt es zu einer Aktivierung der PFK2 über die Signaltransduktionskaskade. Bei 80 sec erreicht die cAMP Konzentration seinen maximalen Wert und nimmt danach wieder ab. Dennoch steigt die Aktivität der PFK2 weiterhin.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß die Kaskade direkt nach dem Puls die Übertragung des cAMP Signals auf die PFK2 verzögert, jedoch nach Erreichen einer kritischen Konzentration des cAMP von 0.005 mM einen irreversiblen Aktivierungsvorgang auslöst, welcher autonom und unabhängig vom cAMP einen determinierten Lauf nimmt. Ist einmal die Schwellenkonzentration des cAMP erreicht, so ist der Prozess der Signaltransduktion nicht mehr aufzuhalten. Demnach wird entweder ein vollständiges Signalmodul übertragen oder es findet überhaupt keine Übertragung statt (*engl. All-or-none mechanism* (STEVENS, 1979)) Damit ergibt sich eine Entkopplung des Prozesses der Signaltransduktion von der Konzentration des cAMP nach den ersten 80 sec.

Der gesamte Verlauf der Signalübertragung von der cAMP auf die PFK2 zeichnet sich darüber hinaus durch seine ausgeprägte Hystereseeigenschaft aus. Wie aus der Abbildung 90 hervorgeht, durchläuft die Aktivität der PFK2 bei einer Zunahme bzw. Abnahme der cAMP Konzentrationen nicht dieselbe Trajektorie.

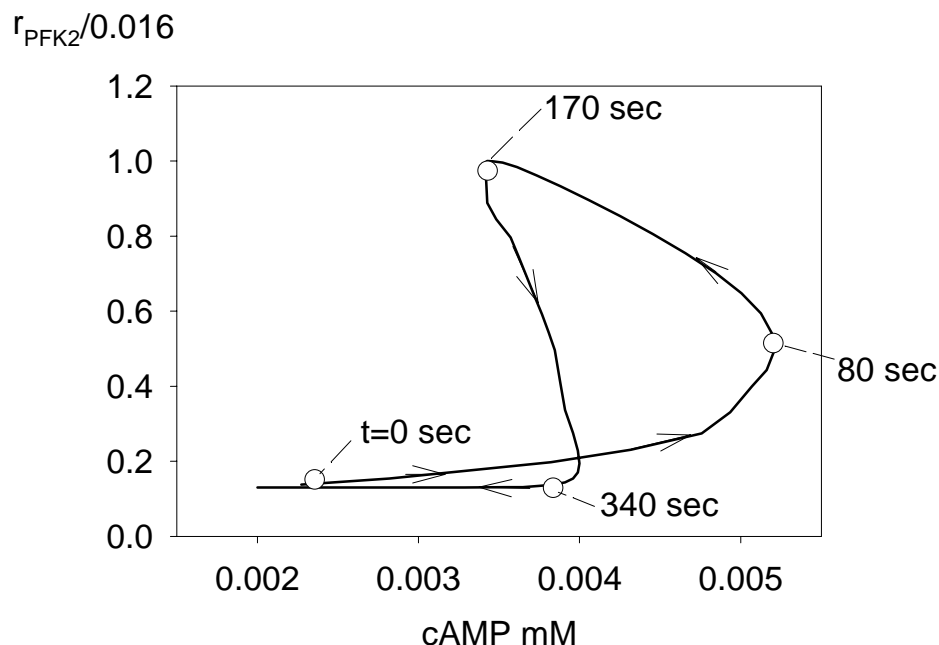


Abbildung 90. Phasendiagramm für die PFK2 Aktivität gegen die cAMP Konzentration im Verlauf eines Glucosepulses.

Zur Beschreibung von Signaltransduktionsvorgängen unterscheidet FERREL (1998) drei verschiedene Typen von Signalübertragung (s. Abbildung 91):

1) Die graduierte Antwort (*engl. graded response*): Erfolgt die Antwort ($E_{Antwort}$) auf ein Stimulus ($E_{Stimulus}$) entsprechend einer Michelis-Menten Kinetik, spricht man von einer "graduierten Antwort" (s. Abbildung 91a). Die Beziehung zwischen Stimulus und Antwortsignal läßt sich mit der folgenden Gleichung beschreiben:

$$E_{Antwort} = \frac{E_{Stimulus}}{E_{Stimulus,50} + E_{Stimulus}} \quad (4.73)$$

$E_{Stimulus,50}$ stellt die Halbsättigungskonstante dar. Dieser Typ der Signalübertragung wurde erstmals von KOSHLAND (1998) untersucht und als "Michaelis Response" bezeichnet.

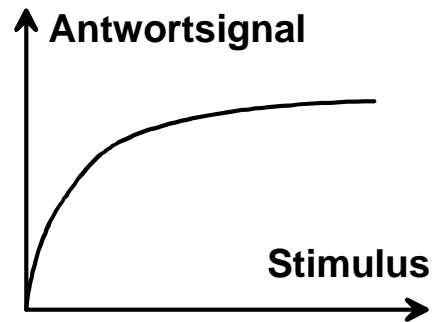
2) Die Schalter-ähnliche Antwort (*engl. switch-like response*): Ultrasensitive Systeme besitzen eine Anregungsschwelle. Nur über diesen Schwellenwert hinaus ist die Signalübertragung signifikant. Es ergibt sich hieraus ein sigmoidales Verhältnis zwischen Stimulus und Antwortsignal (s. Abbildung 91b). Wie bereits KOSHLAND (1998) gezeigt haben, zeichnen sich solche Systeme durch positive Kooperativität aus. Das Übertragungsverhalten des Signals lässt sich anhand einer Hill-Gleichung beschreiben:

$$E_{Antwort} = \frac{E_{Stimulus}^n}{E_{Stimulus,50} + E_{Stimulus}^n} \quad (4.74)$$

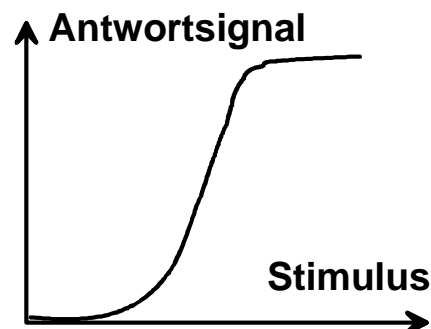
wobei der sogenannte Hill-Koeffizient n ein Maß für die positive Kooperativität im System darstellt.

3) Die bistabile Antwort (*engl. bi-stable response*): Wie bei der schalter-ähnlichen Antwort weist auch die bistabile Antwort hinsichtlich der Signalübertragung positive Kooperativität auf. Allerdings zeichnet sich die bistabile Antwort durch zwei weitere charakteristische Eigenschaften aus: (a) Die bistabile Antwort zieht einen Bereich der Unstetigkeit bei der Übertragung des Signals. Beim Erreichen einer kritischen Schwelle geht das System irreversibel in einen nächsten Zustand über (s. Abbildung 91c). (b) Die bistabile Antwort weist Hystereseeigenschaften auf. Nach Erreichen der kritischen Schwelle springt das System irreversibel an, beim Aufheben des Stimulus kehrt das System zwar in den ursprünglichen Zustand zurück, jedoch über einen anderen Weg, bei der die Antwort auch unterhalb der kritischen Schwelle noch anhält (s. Abbildung 91c).

Überschreitet somit der Stimulus eines bistabilen Schalters die kritische Schwelle wird der Schalter eingeschaltet. Daraufhin nimmt das Antwortsignal unabhängig vom Stimulus ihren Lauf bis zum Erreichen des Ausgangszustands.

(a) Graduierte Antwort**Michaelis-Menten-Typ****(b) Schalter-ähnliche Antwort****Hill-Typ**

- Kooperativität

**(c) Bistabile Antwort****Hysterese-Typ**

- Kooperativität
- Positiver Feed-back

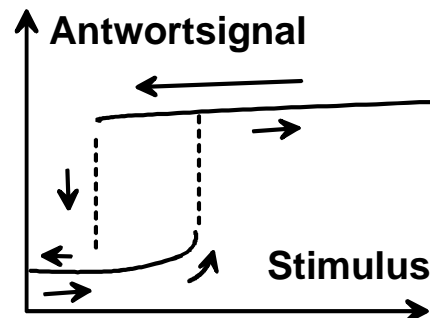


Abbildung 91. Verschiedene Typen der Signalübertragung nach FERREL (1998).

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, daß es sich bei der Signalübertragung von cAMP auf die PFK2 um einen sogenannten bi-stabilen echten Schalter (*engl. bistable true switch*) (FERREL, 1998A,B) handelt. Ein solcher biochemischer Schalter löst beim Erreichen einer kritischen Schwelle des Eingangssignals (cAMP Konzentration) einen definierten Ausgangssignal (PKA bzw. PFK2 Aktivierung) aus, dessen zeitlicher Verlauf unabhängig vom Verlauf des Eingangssignals ist. Voraussetzung für einen solchen Schalter ist die Existenz eines positiven Feed-back-Mechanismus bei der Übertragung (positive Kooperativität) sowie Hysterese-Eigenschaften (FERREL, 1998A,B). Das Vorhandensein eines positiven Feed-back-Mechanismus innerhalb der cAMP/PKA/PFK2 Signaltransduktionskaskade läßt sich am einfachsten anhand der Beobachtung erklären, daß die Aktivität der PFK2 trotz Abnahme der cAMP Konzentration nach den ersten 80 sec weiterhin zunimmt.

Für einen positiven Feed-back-Mechanismus bei der Signalübertragung über PKA können prinzipiell zwei Hypothesen in Betracht gezogen werden (Abbildung 92).

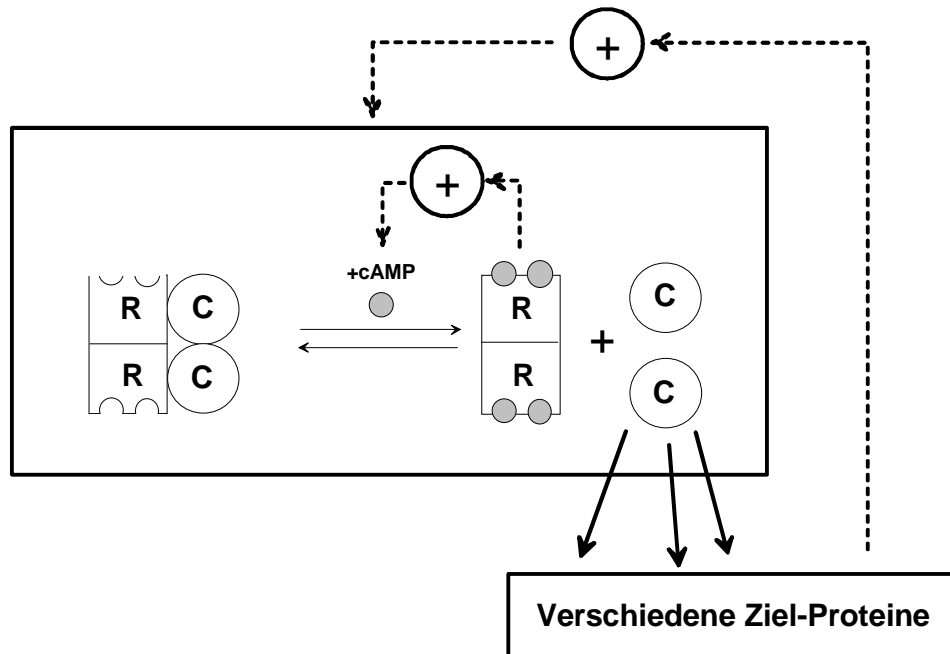


Abbildung 92. Prinzipielle Möglichkeiten für einen positiven Feed-back Mechanismus in der cAMP/PKA/PAK2 Signaltransduktionskaskade (s. auch Abbildung 19).

Die erste Hypothese ergibt sich aus der Überlegung, daß die PKA für die Zelle einen zentralen Signalüberträger darstellt und in der Lage ist eine Vielzahl von Signalproteinen zu aktivieren. Demnach ist prinzipiell die Möglichkeit positiver bzw. negativer Feed-back-Mechanismen über andere Ziel-Proteine (*engl. target proteins*) gegeben.

Eine zweite Hypothese bietet die PKA selbst hinsichtlich seiner eigenen kinetischen Eigenschaften. ROSEN UND ERLICHMAN (1975), HOFMANN ET AL. (1975), ZOLLER ET AL. (1979), POTTER UND TAYLOR (1979) und TAYLOR ET AL. (1990) haben in unabhängigen Untersuchungen gezeigt, daß die PKA in der Zelle sowohl in einer phosphorylierten als auch in einer nicht-phosphorylierten Form vorliegt. Es liegt nahe, daß die phosphorylierte Form die aktivere Form darstellt. Die Phosphorylierung der PKA verläuft über die dissoziierte regulatorische Untereinheit, welche in der Lage ist unter Verbrauch von ATP sich selbst, d.h. autokatalytisch, zu phosphorylieren. Damit kann die PKA unter Umständen die eigene Aktivität durch Autophosphorylierung der dissoziierten regulatorischen Untereinheit erhöhen. Dieser Mechanismus entspricht einem positiven Feed-back-Mechanismus der PKA bezüglich seiner eigenen Aktivität.

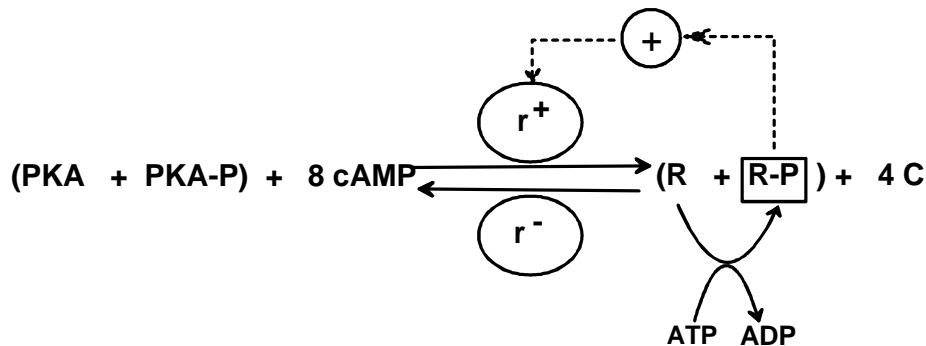


Abbildung 93. Positiver Feed-back Mechanismus bei der Aktivierung der PKA.

Welche Mechanismen tatsächlich zu einem positiven Feed-back bei der Signalübertragung über die cAMP/PFK2/PKA Kaskade führen bleibt derzeit ungeklärt. Die Messung der Aktivität der katalytischen Untereinheit der PKA unter dynamischen Bedingungen könnte unter Umständen einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung dieser Verhältnisse leisten.

4.5.3 Die Degradation des F-2,6-BP

Die genauen reaktionskinetischen Mechanismen der Degradation des F-2,6-BP sind derzeit noch ungeklärt. Auf der Grundlage bestehender Untersuchungen lassen sich grundsätzlich vier verschiedene Mechanismen unterscheiden:

- Degradation über eine hochaffine ($K_m = 0.1-0.3 \mu\text{M}$, *in-vitro*) spezifische Phosphatase (FRANCOIS ET AL., 1988) (KRETSCHMER ET AL., 1987) (KESSLER ET AL., 1991). Das zugehörige Enzym ist das Produkt des Gens *FBP26* (PARAVICINI ET AL., 1992) und spaltet unter Bildung von F6P, inorganisches Phosphat ab.
- Degradation über eine niederaffine ($K_m = 100 \mu\text{M}$, *in-vitro*) spezifische Phosphatase (FRANCOIS ET AL., 1988). Auch das Enzym hierzu spaltet unter Bildung von F6P inorganisches Phosphat ab.
- Degradation durch eine Vielzahl unspezifischer Phosphatasen (FRANCOIS ET AL., 1988). Die beteiligten Phosphatasen werden auch als alkaline Phosphatasen bezeichnet und zeichnen sich durch ihre sehr niedrige Affinität aus ($K_m \gg 50 \mu\text{M}$, *in-vitro*).
- Degradation durch eine spezifische Phosphatase aus ($K_m = 6 \mu\text{M}$, *in-vitro*) zu F-2-P unter Abspaltung vom inorganischen Phosphat (PURWIN ET AL., 1987) (FRANCOIS ET AL., 1988).

Eine detaillierte Untersuchung der einzelnen Degradationsmechanismen unter *in-vivo* Bedingungen ist aufgrund der Vielfalt der Mechanismen und mangelnder Information über die biochemischen Hintergründe derzeit noch nicht möglich. Dennoch läßt sich der Gesamtverlauf der Degradation des F-2,6-BP anhand von Glucosepuls Experimenten *in-vivo* verfolgen.

Zu diesem Zweck wird noch einmal die Bilanz des F-2,6-BP herangezogen:

$$\frac{dC_{F26BP}}{dt} = r_{PFK2} - r_{Deg, F26BP} - \mu C_{F26BP} \quad (4.75)$$

Daraus erhält man unter Einsatz der Approximationsfunktionen $\hat{C}_{F26BP}(t)$ und $\hat{r}_{PFK2}(t)$ für den zeitlichen Verlauf der Degradationsrate:

$$r_{Deg,F26BP}(t) = \hat{r}_{PFK2}(t) - \frac{d\hat{C}_{F26BP}(t)}{dt} - \mu \hat{C}_{F26BP}(t) \quad (4.76)$$

Das Ergebnis dieser Berechnungen ist in der Abbildung 94 mit dem Verlauf der F-2,6-BP Konzentration bzw. PFK2 Aktivität verglichen. Es geht deutlich hervor, daß sich die Rate der Degradation und der Verlauf der PFK2 Aktivität im selben Zeitmaßstab ändern. Eine wichtige Beobachtung ergibt sich aus dem zeitlichen Verlauf des Beitrags der F-2,6-BP Verdünnung durch Zellwachstum, $\mu \hat{C}_{F26BP}$ (Abbildung 94). Nachdem die Degradationsprozesse bei 400 sec bereits ihren stationären Zustand erreicht hat, führt dieser Beitrag zu einer weiteren Senkung der F-2,6-BP Konzentration bishin zum stationären Wert. Diese Beobachtung unterstützt die Bedeutung der Ausdünnung durch Zellwachstum für die Degradation von Signalsubstanzen.

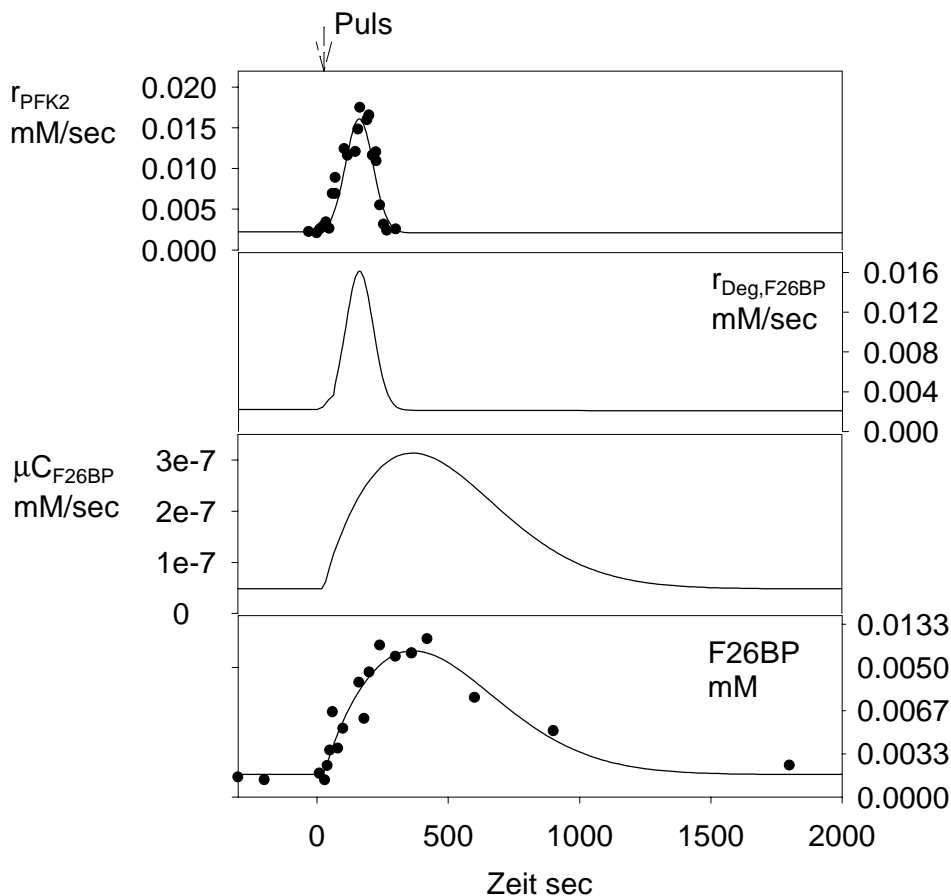


Abbildung 94. Die dynamische Antwort der Degradationsrate von F-2,6-BP.

4.6 Regulation des PFK1/PFK2 Systems: Zusammenfassung der Beobachtungen

Die bereits vorgestellten Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit liefern ein quantitatives Bild über die *in-vivo* reaktionskinetischen Eigenschaften der PFK1 und PFK2 unter dynamischen Bedingungen. Um zu einem ganzheitlichen Bild bezüglich des Zusammenwirkens beider Systeme auf der Ebene der Stoffwechselregulation zu gelangen, werden nachfolgend die wichtigsten Eigenschaften, welche zu einer wechselseitigen Beziehung beider Systeme beitragen noch einmal zusammengefaßt.

4.6.1 *In-vivo* Regulation der PFK1

Die PFK1 unterliegt im Cytosol den homologen und heterologen Protein-Protein-Wechselwirkungen. Durch diese Wechselwirkungen werden kinetische Eigenschaften des Enzyms signifikant beeinflußt. Diese Tatsache konnte sowohl unter *in-situ* als auch unter *in-vivo* Bedingungen beobachtet werden. Mit Ausnahme von F-1,6-BP ist der Einfluß der Effektoren in beiden Fällen deutlich geringer ausgeprägt als *in-vitro*. Darüber hinaus zeigt sich unter *in-situ* bzw. *in-vivo* Bedingungen eine deutliche Stabilisierung des R-Zustands gegenüber den T-Zustand. Hinzu kommt, daß die Kooperativität zwischen den Protomeren der PFK1 an Bedeutung verliert. Diese Beobachtung kann auf eine übergreifende Kooperativität im intrazellulären Proteinverband der Zelle zurückgeführt werden.

Die PFK1 wird *in-vivo* nur vom positiven Effektor F-2,6-BP bzw. dem negativen Effektor MgATP beeinflußt. Hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied zu den *in-vitro* Bedingungen, wo weitere Modulatoren (z.Bsp. AMP, ADP) hinzutreten. F-2,6-BP koppelt das Enzym an die Signaltransduktionsebene während MgATP das Bindeglied zum Energiestatus der Zelle darstellt (s. Abbildung 95).

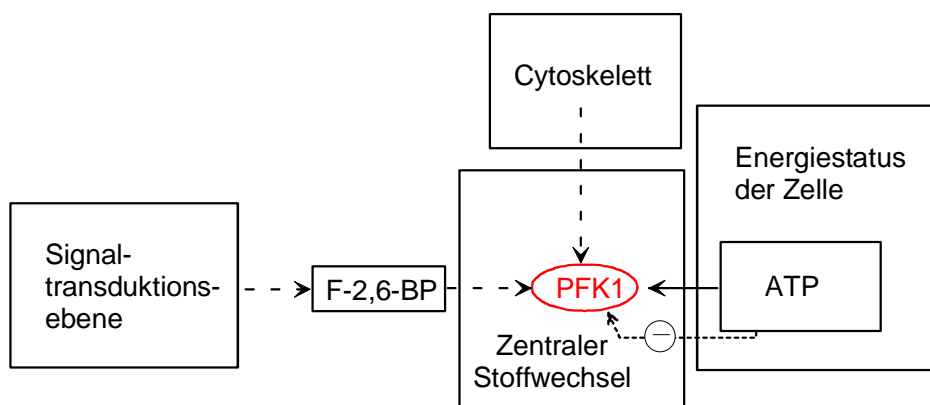


Abbildung 95. Kopplung der PFK1 an die Signaltransduktionsebene und den Energiestatus der Zelle.

4.6.2 *In-vivo* Regulation der PFK2

Die PFK2 ist unter *in-vivo* Bedingungen durch die Substrate F6P und MgATP gesättigt. Damit erreicht die Zelle eine gezielte Entkopplung des glycolytischen Stoffflusses vom

Signaltransduktionsweg des cAMP/PKA/PFK2. Die Zusammenhänge sind in der Abbildung 96 schematisch dargestellt. Die Aktivierung der PFK2 erfolgt ausschließlich über die Phosphorylierung durch PKA. Die PKA wird durch die ansteigende cAMP Konzentration aktiviert. Die Übertragung des cAMP Signals auf die PFK2 weist zwei charakteristische Eigenschaften auf. Zum einen liegt ein positiver Feed-back-Mechanismus bei dieser Übertragung vor, dessen biochemischer Hintergrund derzeit noch ungeklärt ist. Zum zweiten weist die Übertragung des Signals über PKA ausgeprägte Hystereseigenschaften auf. Demnach wird die PKA mit ansteigenden cAMP-Konzentrationen erst beim Erreichen einer kritischen Konzentration aktiviert. Nach der Aktivierung nimmt die Signalübertragung seinen eigenen Lauf unabhängig vom weiteren Verlauf der Konzentration des cAMP. Ist die Kaskade einmal eingeschaltet, ist sie nicht mehr aufzuhalten bis sie ihren Ausgangspunkt erreicht hat. Dies ermöglicht der Zelle eine Autonomie und Entkopplung der PFK2 Aktivität vom Eingangssignal des cAMP. Der Vorteil liegt in der Tatsache, daß eine erneute Aktivierung der Kaskade durch cAMP erst dann möglich ist, wenn die Übertragung des ersten Signalmoduls abgeschlossen ist.

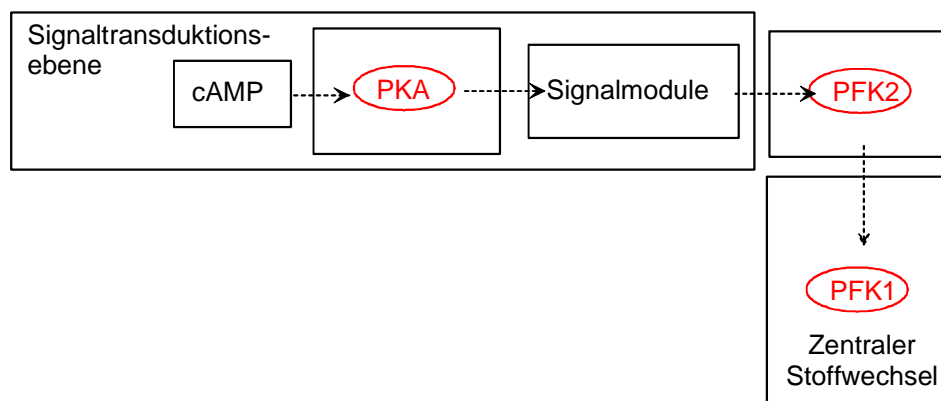


Abbildung 96. Übertragung des cAMP Signals auf die PFK1.

4.6.3 *In-vivo* Regulation des PFK1/PFK2 Systems

In Antwort auf einen externen Glucosepuls steigt die Aktivität der PFK1 in den ersten 30 sec (Phase I, s. Abbildung 76) in Folge eines Anstiegs der Sensitivität bezüglich F-2,6-BP. Verantwortlich hierfür ist jedoch der Anstieg der Konzentration des Substrats F6P bei konstant anhaltender Konzentrationen des F-2,6-BP. Demnach wird die PFK1 direkt nach dem Puls auf der Ebene des Substrats jedoch indirekt durch die Wirkung des Effektors F-2,6-BP reguliert. Dieser Zusammenhang ist in der Abbildung 97 näher dargestellt. Die Signaltransduktionsebene (s. Abbildung 96) nimmt also in diesem Zeitraum keinen Einfluß auf die PFK1 (s. Abbildung 97).

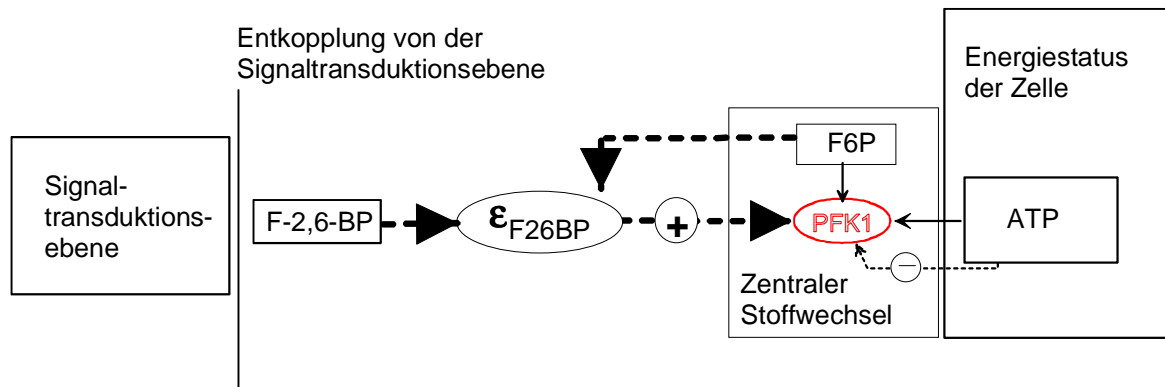


Abbildung 97. Regulation der PFK1 in der Phase I. Die Dicke der Pfeile betont den geleisteten Beitrag zur Regulation.

Nach Ablauf von 30 sec nimmt der Einfluß von F6P signifikant ab (Phase II, s. Abbildung 76), hingegen steigt die Konzentration des F-2,6-BP dramatisch an und vermeidet ein schnelles Sinken der PFK1 Aktivität. Demnach erreicht die PFK1 Aktivität erst bei 500 sec den stationären Zustand wieder. In diesem Zeitraum wird die Aktivität der PFK1 direkt durch den Einfluß des F-2,6-BP und der damit verbundenen Signaltransduktionskaskade reguliert. Im gesamten Zeitraum nach dem Glucosepuls wird der Beitrag seitens MgATP unterdrückt, indem die Konzentration als auch die entsprechende Sensitivität gleichzeitig reduziert wurde. Damit wird für eine Dämpfung des Einflusses der PFK1 Aktivität durch MgATP gesorgt. Die Zusammenhänge sind in der Abbildung 98 näher dargestellt. Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß das Substrat F6P und der Effektor F-2,6-BP den wichtigsten Beitrag zur Regulation der PFK1 Aktivität leisten. Die Rate des Enzyms wird in der ersten Phase überwiegend von F6P und somit dem glycolytischen Fluß beeinflusst. Anschließend an dieser Phase gewinnt die Modulation über die Signaltransduktionskaskade an Bedeutung.

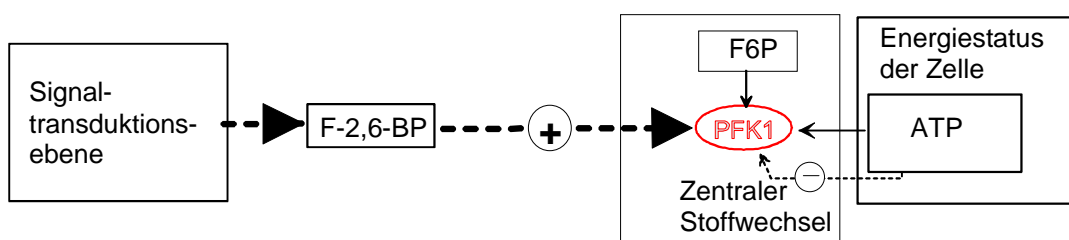


Abbildung 98. Regulation der PFK1 in der Phase II (s. Abbildung 76). Die Dicke der Pfeile betont den geleisteten Beitrag zur Regulation.

Die Signaltransduktionskaskade beeinflusst direkt die Aktivität der PFK2 und damit die Bildung von F-2,6-BP. Die Aktivität der PFK2 ist seinerseits unabhängig und entkoppelt vom glycolytischen Fluß. Sie wird direkt und ausschließlich durch die Kaskade moduliert.

Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß die Aktivität der PFK1 in der zweiten Phase nach dem Glucosepuls ausschließlich durch die Signaltransduktionskaskade über PFK2 bzw. F-2,6-

BP moduliert wird. Die Modulation der PFK1 Aktivität wird in der zweiten Phase weder direkt, über glycolytische Metabolite, noch indirekt, über die Aktivität der PFK2, vom glycolytischen Fluß beeinflusst. Somit besteht innerhalb dieser Phase eine Entkopplung zwischen Regulation der PFK1 Aktivität und dem glycolytischen Fluß. Berücksichtigt man ferner, daß auch eine Dämpfung der Kopplung zwischen der PFK1 Aktivität und des Energiestatus der Zelle beobachtet wird, kann man folgern, daß während dieser Phase die PFK1 streng durch die Wirkung der Signaltransduktionskaskade moduliert wird.

Zusammenfassend läßt sich ein ganzheitliches Bild zur Regulation des PFK1/PFK2 Systems ableiten, welches anhand einer Prinzipskizze in der Abbildung 99 dargestellt ist.

Aus den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit läßt sich exemplarisch auf einen gezielten und höchst organisierten Bauplan der zellulären Regulation schließen, welcher die verschiedenen physiologischen Ebenen, nämlich der Stoffflüsse, des Energiehaushalts, der Signal- bzw. Informationsverarbeitung und der Struktur bzw. Gestalt der Zelle koordiniert verbindet. Zwar befolgt dieser Bauplan prinzipiellen Grundmechanismen auf der Ebene der Enzymregulation, der Signaltransduktion, des Stoffwechsels usw., dennoch wird die Einheit und die Flexibilität des gesamten Systems aufrecht erhalten, um jederzeit auf äußere Einflüsse eine optimale Antwort zu gewährleisten.

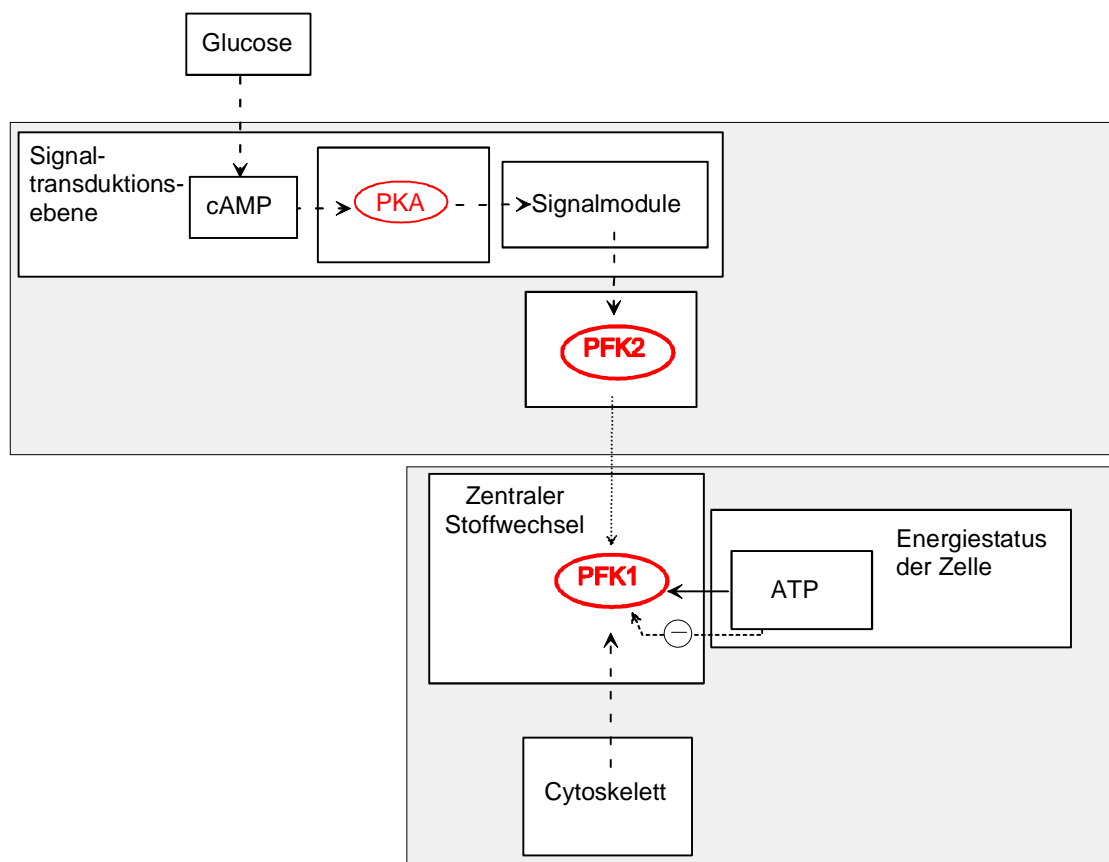


Abbildung 99. Prinzip der Regulation des PFK1/PFK2-Systems.

Anhang 1

Reaktionskinetischer Ansatz für das V-Modell

$$\left\{ \begin{array}{l} \alpha_{ATP,S} = C_{ATP} K_{ATP,S} \\ \alpha_{ATP,I} = C_{ATP} K_{ATP,I} \\ \alpha_{ATP,A} = C_{ATP} K_{ATP,A} \\ \alpha_{ADP,I} = C_{ADP} K_{ADP,I} \\ \alpha_{ADP,A} = C_{ADP} K_{ADP,A} \\ \alpha_{ADP,C} = C_{ADP} K_{ADP,C} \\ \alpha_{AMP,I} = C_{AMP} K_{AMP,I} \\ \alpha_{AMP,A} = C_{AMP} K_{AMP,A} \\ \alpha_{F6P,T} = C_{F6P} K_{F6P,T} \\ \alpha_{F6P,R} = C_{F6P} K_{F6P,R} \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} \alpha_{F2,6BP,I} = C_{F2,6BP} K_{F2,6BP,I} \\ \alpha_{F2,6BP,A} = C_{F2,6BP} K_{F2,6BP,A} \\ \alpha_{F1,6BP,I} = C_{F2,6BP} K_{F1,6BP,I} \\ \alpha_{F2,6BP,A} = C_{F2,6BP} K_{F2,6BP,A} \end{array} \right.$$

$$Z = (1 + \alpha_{ATP,I}) (1 + \alpha_{ADP,I}) (1 + \alpha_{AMP,I}) (1 + \alpha_{F1,6BP,A} + \alpha_{F2,6BP,I})$$

$$N = (1 + \alpha_{ATP,A}) (1 + \alpha_{ADP,A}) (1 + \alpha_{AMP,A}) (1 + \alpha_{F1,6BP,A} + \alpha_{F2,6BP,I})$$

$$Q = \frac{Z}{N}$$

$$K_{F6P,R} = K_{F6P,R,0} Q$$

$$K_{F6P,T} = K_{F6P,T,0} Q$$

$$L = \frac{T}{R} = L_0 \left(\frac{1 + \alpha_{F6P,T}}{1 + \alpha_{F6P,R}} \right)^8$$

$$M_{F6P,R} = \frac{\alpha_{F6P,R}}{1 + \alpha_{F6P,R}}$$

$$M_{F6P,T} = \frac{\alpha_{F6P,T}}{1 + \alpha_{F6P,T}}$$

$$N_{F6P} = M_{F6P,R} R + M_{F6P,T} T$$

$$N_{ATP} = \frac{\alpha_{ATP,S}}{1.0 + \alpha_{ATP,S} + \alpha_{ADP,C}}$$

$$\frac{r_{PFK1}}{r_{PFK1}^{\max}} = N_{F6P} N_{ATP}$$

Anhang 2

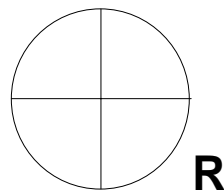
Approximationsfunktionen zur Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der einzelnen Metabolite.

<i>Metabolit</i>	<i>Gleichung</i>
G6P	$\hat{C}_{G6P}(t) = 0.9 + 44.1 \frac{t}{48.0 + t + 0.45 t^2}$
F-1,6-BP	$\hat{C}_{F1,6P}(t) = \begin{cases} 0.28 & t < 0 \\ \frac{4.365 - 5.369 \cdot 10^{-3} t + 2.389 \cdot 10^{-6} t^2}{1 - 1.695 t + 2.251 \cdot 10^{-6} t^2} & t \geq 0 \end{cases}$
F-2,6-BP	$\hat{C}_{F26BP}(t) = \begin{cases} 0.017 & t < 30.0 \\ 0.0017 + 0.0067 \left \frac{t - 366.01}{527.13} + 0.637 \right ^{0.8} \dots & t \geq 30.0 \\ \dots \exp \left(- \left \frac{t - 366.01}{527.13} + 0.637 \right ^{1.8} + 0.444 \right) & \end{cases}$
MgATP	$\hat{C}_{MgATP}(t) = 2.3 - \frac{29.83 t}{29.77 + 13.42 t + 0.05 t^2}$
ADP	$\hat{C}_{ADP}(t) = 0.4 + (6.8 e^{-0.238 t}) - (0.95 e^{-0.098 t}) - (5.78 e^{-0.317 t})$
AMP	$\hat{C}_{AMP}(t) = 0.12 + \frac{4.14 t}{13.62 + 0.065 t + 0.295 t^2}$

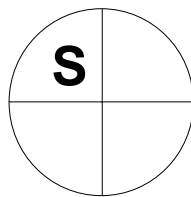
Anhang 3

Im folgenden soll am Beispiel eines allosterischen Enzyms die Herleitung der Dissoziationskonstante bezüglich des Substrats S im Zusammenhang mit dem M-Modell (MONOD ET AL., 1967) näher dargestellt werden.

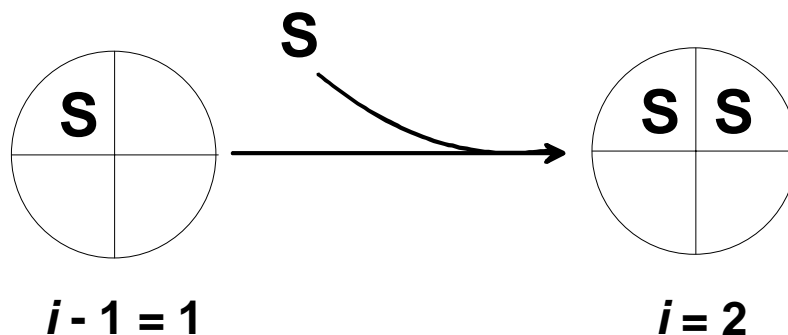
Das betreffende allosterische Enzym R besteht aus vier identischen Protomeren, welche symmetrisch angeordnet sind:



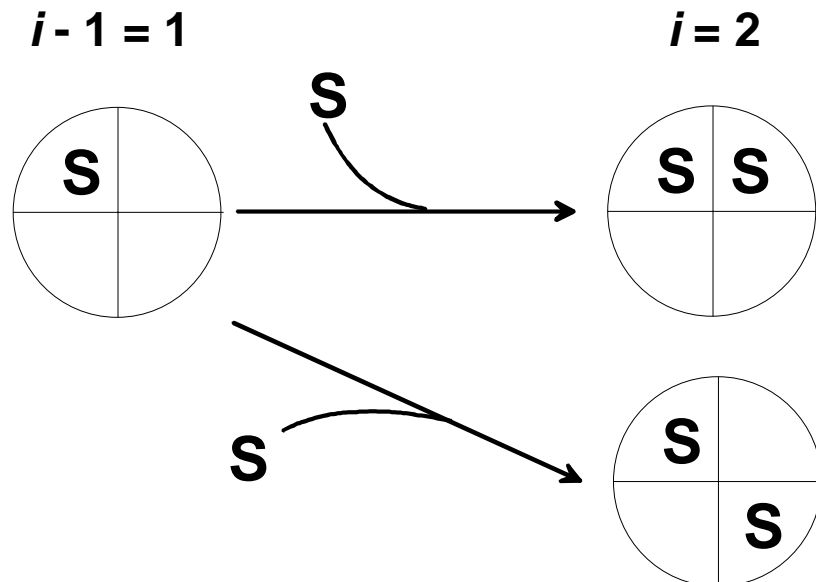
Nehmen wir nun an, daß ein Protomer des Enzyms bereits mit einem Substratmolekül S belegt ist:



Wenn der Index i das Produkt der i -ten Reaktion darstellt, so läßt sich die Reaktion zur Aufnahme eines zweiten Substratmoleküls wie folgt darstellen:



Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß bei diesem Reaktionsschritt zwei Besetzungsmöglichkeiten für das Substrat S gibt:

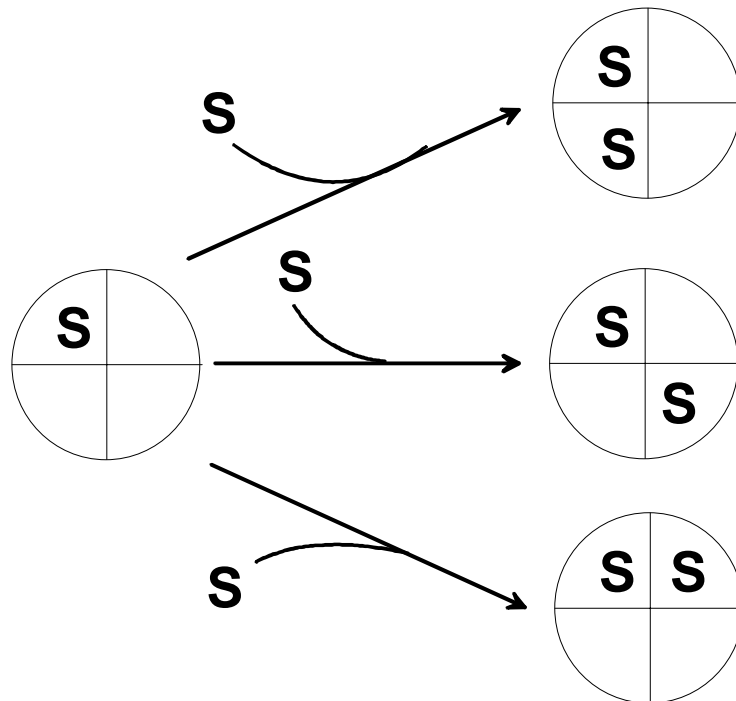


Es können also zwei Reaktionen bzw. zwei unabhängige Ereignisse eintreten, welche zum selben Produkt führen. Diese Eigenschaft geht nur aus der symmetrischen Anordnung der Protomere hervor. Da angenommen wird, daß die Produkte beider Reaktionen sich in ihrer physikalisch/chemischen Eigenschaften nicht voneinander unterscheiden, so läßt sich das gesamte Geschehen mit Hilfe des Booleschen Algebras wie folgt ausdrücken:

$$\langle R_i \rangle \vee \langle R_i \rangle \rightarrow R_i + R_i = 2 R_i$$

wobei $\langle R_i \rangle$ als Ereignis des Auftretens einer der Reaktionen darstellt (\vee bedeutet "oder"). Hieraus läßt sich auf einen Symmetriefaktor $F_i^S = 2$ schließen.

Betrachtet man nun unabhängig von der symmetrischen Anordnung der Protomere die Reaktion der Aufnahme eines zweiten Substratmoleküls, so stehen dem Substratmolekül vor der Reaktion drei mögliche Stellen zur Besetzung frei:



Das gesamte Geschehen kann mit Hilfe des Booleschen Algebras wie folgt ausgedrückt werden:

$$\langle R_{i-1} \rangle \vee \langle R_{i-1} \rangle \vee \langle R_{i-1} \rangle \rightarrow R_{i-1} + R_{i-1} + R_{i-1} = 3 R_{i-1}$$

Hieraus läßt sich auf einen Faktor für unbesetzte Protomere $F_{n,i}^B = 3$ schließen.

Für die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation bei der Teilreaktion i ergibt sich somit:

$$K_{Diss,S,R} = C_S \frac{3 R_{i-1}}{2 R_i}.$$

Literatur

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. (1989) Molecular biology of the cell, 2. Auflage, Garland Publishing, New York.
- AON, M. A., CORTASSA, S., HERVAGAUT, J. F., THOMAS, D. (1989) pH-induced bistable dynamic behaviour in the reaction catalysed by glucose-6-phosphate dehydrogenase and conformational hysteresis of the enzyme. *Biochem. J.* 262: 795-800.
- ARAGÓN, J. J., GÓMEZ, M.-E., GANCEDO, C. (1987) Identification of two forms of 6-phosphofructo-2-kinase in yeast. *FEBS Letters* 26: 121-124.
- ARAGÓN, J. J., SÁNCHEZ, V. (1985) Enzyme concentration affects the allosteric behaviour of yeast phosphofructokinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131: 849-855.
- ATZPODIEN, W., BODE, H. (1969) Purification and regulatory proteins of ATP sensitive phosphofructo-kinase from yeast. *Eur. J. Biochem.* 12: 126-132.
- AVIGAD, G. (1981) Stimulation of yeast phosphofructokinase activity by fructose-2,6-bisphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102 : 985-991.
- BAILEY, J. E. Toward a science of metabolic engineering. (1991) *Science* 252: 1668-1675.
- BALTES, M. (1995) Entwurf eines metabolisch strukturierten Modells zur dynamischen Simulation des Katabolismus von *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, Stuttgart, Germany und VDI Verlag, Düsseldorf, Germany.
- BAÑUELOS, M., GANCEDO, C. (1978) *In situ* study of the glycolytic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 117: 197-201.
- BÄR, J., MARTÍNEZ-COSTA, O. H., ARAGÓN, J. J. (1990) Regulation of phosphofructokinase at physiological concentration of enzyme studied by stopped-flow measurements. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 167: 1214-220.
- BERLIN, G., EUERBÄCK, L. (1984) The dynamics of mast cell secretion studied by vital berberin staining. *Agents and Actions* 14: 314 Birkhäuser Verlag, Basel.
- BOLES, E., GÖHLMANN, H. W. H., ZIMMERMANN, F. K. (1996) Cloning of a second gene encoding 6-phosphofructo-2-kinase in yeast, and characterization of mutant strains without fructose-2,6-bisphosphate. *Mol. microbiol.* 20: 65-76.
- BOLES, E., HEINISCH, J., ZIMMERMANN, F. K. (1993) Different signals control the activation of glycolysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 9: 761-770.
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-284.
- BREITER-HAHN, J., STUBIG, C., HEYMANN, V. (1989) Cell-cycle related changes in F-actin distribution are correlated with glycolytic activity. *Exp. Cell. Res.* 218: 551-560.
- BREUNER, T., BRENNER, J., BRÜMMER, F., HÜLSER, D. F. (1989) Effect of shock waves on suspended and immobilized L1210 cells. *Ultrasound in Medicine and Biology* 15: 229-239.
- BROACH, J. R., DESCHENES, R. J. (1990) The function of RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Cancer Res.* 54: 79-139.
- BROACH, J. R. (1991) RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*: signal transduction in search of a pathway. *Trends Genet.* 7: 28-33.
- Broek, D., Samily, N., Fasano, O., Fujiyama, A., Tamanoi, T., Northup, J., Wigler, M. (1985) Differential activation of yeast adenylate cyclase by wild-type and mutant RAS proteins. *Cell* 41: 763-769.

- BRUINENBERG, P. M., VAN DIJKEN, J. P., SCHEFFERS, W. A. (1983) An enzymic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 965-971.
- CAMONIS, J. H., KALÉKINE, M., GONDRÉ, B., GARREAU, H., BOY-MARCOTTE, E., JACQUET, M. (1986) Characterization, cloning and sequence analysis of the *CDC25* gene which controls the cyclic AMP level of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 5: 375-380.
- CANNON, J. F., TATCHELL, K. (1987) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2653-2663.
- CARLIER, M. F. (1992) Nucleotide hydrolysis regulates the dynamics of actin filaments and microtubules. *Phil. Trans. R. Soc. London. B* 336: 93-97.
- CASPANI, G., TORTORA, P., HANOZET, G. M., GUERRITORE, A. (1985) Glucose-stimulated cAMP increase may be mediated by intracellular acidification in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 186: 75-79.
- CLIFTON, D., FRAENKEL, D. G. (1983) Mutant studies of yeast phosphofructokinase. *Biochem.* 21: 1935-1942.
- COHEN, P., COHEN, P. T. W. (1990) Protein phosphatases come of age. *J. Biol. Chem.* 264: 21435-21438.
- Colombo, S., Ma, P., Cauwenberg, L., Winderickx, J., Crauwels, M., Teunissen, A., Nauwelaers, D., de Winde, J. H., Gorwa, M.-F., Colavizza, D., Thevelein, J. M. (1998) Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* 17: 3326-3341.
- CORTASSA, S., CÁCERES, A., AON, M. A. (1994) Microtubular protein in its polymerized or non-polymerized states differentially modulates *in-vitro* and intracellular fluxes catalyzed by enzymes related to carbon metabolism. *J. Cell. Biochem.* 55: 120-132.
- DALZIEL, K. (1968) A kinetic interpretation of the allosteric model of Monod, Wyman and Changeux. *FEBS Letters* 1: 346-348.
- DAVIES, S. E. C., BRINDLE, K. M. (1992) Effects of overexpression of phosphofructokinase on glycolysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.* 31: 4729-4735.
- DE FEO-JONES, D., SCOLNIK, E. M., KOLLER, R., DHAR, R. (1983) *Ras*-related gene sequence identified and isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 306: 707-709.
- DE NOBEL, J. G., KLIS, F. M., MUNNIK, T., PRIEM, J., VAN DEN ENDE, H. (1990) An assay of relative cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* und *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 6: 483-490.
- DHAR, R., NIETO, A., KOLLER, R., DE FEO-JONES, D., SCOLNISK, E. M. (1984) Nucleotide sequence of two *rasH*-related genes isolated from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* 12: 3611-3618.
- DRAPER, N. R., SMITH, H. (1966) An introduction to non-linear estimation. In: Applied Regression Analysis. pp. 458-517, Wiley, New York.
- DYSON, J. E. D., NOLTMANN, E. A. (1968) The effect of pH and temperature on the kinetic parameters of phosphoglucose isomerase. *J. Biol. Chem.* 243: 1401-1414.
- EDELMAN, A. M., BLUMENTHAL, D. K., KREBS, E. G. (1987) Protein serine/threonine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 567-613.
- EL MAGHRABI, M. R., CLANS, T. H., PILKIS, J., FOX, E., PILKIS, S. J. (1982) Regulation of rat liver Fructose-2,6-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 257: 7603-7607.
- ENTIAN, K.-D., BARNETT, J. A. (1992) Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *TIBS* 17: 506-510.

- ENTIAN, K.-D., SCHÜLLER, H.-J. (1997) Glucose repression (carbon catabolite repression) in yeast. In: Yeast sugar metabolism, biochemistry, genetics, biotechnology, and application. (Hrsg. F. K. Zimmermann und K.-D. Zimmermann) Technomic publishing Co. Inc., Lancaster, Basel.
- ESCHRICH, K., SCHELLENBERGER, W., HOFMANN, E. (1990) A hysteretic cycle in glucose-6-phosphate metabolism observed in a cell-free yeast extract. *Eur. J. Biochem.* 188: 697-703.
- FERREL, J. E. (1998a) How regulated protein translocation can produce switch-like responses. *TIBS* 23: 461-465.
- FERRELL, J. E., MACHLEDER, E. M. (1998b) The biochemical basis of an all-or none cell fate switch in *Xenopus* oocytes. *Science* 280: 895-898.
- FRANÇOIS, J., VAN SCHFTINGEN, E., HERS, H.-G. (1984) The mechanism by which glucose increases fructose-2,6-bisphosphate concentration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 145: 187-193.
- FRANÇOIS, J., VAN SCHAFTINGEN, E., HERS, H.-G. (1988) Characterization of phosphofructokinase 2 and enzymes involved in the degradation of fructose-1,6-bisphosphate in yeast. *Eur. J. Biochem.* 171: 599-608.
- FRENZEL, J., NISSLER, K., SCHELLENBERGER, W., HOFMANN, E. (1984) Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase from pig liver by fructose-6-phosphate. *Biomed. Biochim. Acta* 43: 1113-1118.
- FREYER, R. (1977) Phosphofructokinase aus Hefe: Kinetisches Verhalten verschiedener Enzymformen und Diskussion eines mathematischen Modells. Dissertation, Karl-Marx-Universität Leipzig, Leipzig.
- FREYER, R., ESCHRICH, K., SCHELLENBERGER, W. (1977) Kinetische Modellierung der Hefephosphofructokinase. *Erg. exp. Med.* 24: 77-80.
- FRITSCHKE, W. Mikrobiologie. (1990) Fischer, Jena.
- FURUYA, E., UYEDA, K. (1981) A novel enzyme catalyzes the synthesis of activation factor from ATP and D-Fructose-6-P. *J. Biol. Chem.* 256: 7109-7112.
- GANCEDO, C. (1971) Inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase by glucose in yeast. *J. Bacteriol.* 107: 401-405.
- GANCEDO, C., SALAS, M. L., GINER, A., SOLS, A. (1965) Reciprocal effects of carbon sources on the levels of an AMP-sensitive fructose-1,6-diphosphatase and phosphofructokinase in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20: 15-20.
- GANCEDO, J. M., GANCEDO, C. (1971) Fructose-1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from fermenting and non-fermenting yeasts. *Arch. Microbiol.* 109: 132-138.
- GANCEDO, J. M., MAZÓN, M. J., GANCEDO, C. (1982) Kinetic differences between two interconvertible forms of fructose-1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 218: 478-482.
- GEISSLER, E. (1955) *Naturwiss.* 42: 372-375
- GELFAND, V. I., BERSHADSKY, A. D. (1991) Microtubule dynamics: Mechanism, regulation, and function. *Annu. Rev. Biochem.* 7: 93-116.
- GOLDBERG, D., SEGAL, M., LEVITZKI, A. (1994) Cdc25 is not the signal receiver for glucose induced cAMP response in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett.* 356: 249-254.
- HEARNE, J. W. Sensitivity analysis of parameter combinations. (1985) *Appl. Math. Model.* 9: 66-87.

- HEINISCH, J., RITZEL, R. G., VON BORSTEL, R. C., AGUILERA, A., RODICIO, R., ZIMMERMANN, F. K. (1989) The phosphofructokinase genes of yeast evolved from two duplication events. *Gene* 78: 309-321.
- HERS, H.-G., VAN SCHAFTINGEN, E. (1982) Fructose-2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem. J.* 206: 1-12.
- HIXSON, C. S. AND KREBS, E. G. (1980) Characterization of a cyclic AMP-binding protein from baker's yeast. *J. Biol. Chem.* 255: 2137-2145.
- HOFMANN, E. (1976) The significance of phosphofructokinase to the regulation of carbohydrate metabolism. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 75: 1-68.
- HOFMANN, E., KOPPERSCHLÄGER, G. (1982) Phosphofructokinase from yeast. *Meth. Enzymol.* 90: 49-60.
- HOFMANN, F., BEAVO, J. A., BECHTEL, P. J., KREBS, E. G. (1975) Comparison of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal and bovine heart muscle. *J. Biol. Chem.* 250: 7795-7801.
- HOLZER, H. (1976) Catabolite inactivation in yeast. *TIBS* 1: 178-181.
- HOLZER, H. (1984) Mechanism and function of reversible phosphorylation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast. In: Molecular aspects of cellular regulation. Cohen, P. (Hrsg.) Vol. 3, pp. 143-154.
- HOLZER, H. (1989) Regulatory protein phosphorylation in yeast. *Nova Acta Leopoldina NF* 61(269): 253-267.
- HUBER-WÄLCHLI, V., WIEKEN, A. (1979) Differential extraction of soluble pools from the cytosol and the Vacuoles of Yeast *Candida utilis* using DEAE-Dextran. *Arch. Microbiol.* 120: 141-149.
- HULME, E. C., TIPTON, K. F. (1971) The dependence of phosphofructokinase kinetics upon protein concentration. *FEBS Letters* 12: 197-200.
- INDLEKHOFFER, M. (1989) Computer-Regelung der Substratzufütterung bei der Backhefefertigung, Diplomarbeit, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart.
- KARKHOFF-SCHWEIZER, R., KNOLL, H. R. (1987) Demonstration of tubulin-glycolytic enzyme interactions using a novel electrophoretic approach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146: 827-831.
- KESSLER, R., GÄRTNER, G., SCHELLENBERGER, W., HOFMANN, E. (1991) Fructose-2,6-bisphosphate metabolism in permeabilized yeast cells. *Biomed. Biochim. Acta* 50: 851-860.
- KESSLER, R., NISSLER, K., SCHELLENBERGER, W., HOFMANN, E. (1982) Fructose-2,6-bisphosphate increases the binding affinity of yeast phosphofructokinase to AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 506-510.
- KESSLER, R., NISSLER, K., SCHELLENBERGER, W., HOFMANN, E. (1986) Binding of fructose-1,6-bisphosphate to yeast phosphofructokinase. *Biomed. Biochim. Acta* 45: 1121-1125.
- KESSLER, R., SCHELLENBERGER, W., NISSLER, K., HOFMANN, E. (1988) Binding of fructose-2,6-bisphosphate to yeast phosphofructokinase. *Biomed. Biochim. Acta* 47: 221-225.
- KIRKPATRICK, S., GELATT, C. D., VECCHI, M. P. (1983) Optimization by simulated annealing. *Science*, 220(4598): 671-679.
- KITAJAMA, S., SAKAKIBARA, R., UYEDA, K. (1984) Kinetic studies of fructose-6-phosphate, 2-kinase and fructose 2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 259: 6896-6903.
- KOPPERSCHLÄGER, G., AUGUSTIN, H. W. (1967) Fehlermöglichkeiten bei der Bestimmung von Metabolitgehalten in Hefezellen. *Experientia* 23: 623-624.
- KOPPERSCHLÄGER, G., BIRKENMEIER, G. (1990) Affinity partitioning and extraction of proteins. *Bioseparations* 1: 235-254.

- KOPPERSCHLÄGER, G., FREYER, R., DIEZEL, W., HOFMANN, E. (1968) Some kinetic and molecular properties of yeast phosphofructokinase. *FEBS Letters* 1: 137-141.
- KOSHLAND, D. E. (1998) The era of pathway quantification. *Science* 280: 852-853.
- KRETSCHMER, M., FRENKEL, D. G. (1991) Yeast 6-phosphofructo-2-kinase: sequence and mutant. *Biochemistry* 30: 10663-10672.
- KRETSCHMER, M., SCHELLENBERGER, W., HOFMANN, E. (1987) The appearance of a critical input concentration of fructose-6-phosphate in the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase cycle. *J. theorel. Biol.* 127: 181-186.
- KRETSCHMER, M., TEMPST, P., FRAENKEL, D. G. (1991) Identification and cloning of yeast phosphofructokinase 2. *Eur. J. Biochem.* 197: 367-372.
- KRIEGEL, T., BEHLKE, J., KOPPERSCHLÄGER, G. (1987) Hydrodynamic studies on the quaternary structure of reacting yeast phosphofructokinase. *Biomed. Biochem. Acta* 46: 349-355.
- LAURENT, M., YON, J. M. Yeast phosphofructokinase. (1989) In: Allosteric Enzymes. Hervé, G.D. (Hrsg.) pp. 255-276, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- LEDERER, B., VISSERS, S., VAN SCHAFTINGEN, E., HERS, H.-G. (1981) Fructose-2,6-bisphosphate in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103: 1281-1287.
- LEHNINGER, A. (1979) Biochemie. Verlag Chemie, Weinheim, New York.
- LENZ, A. G., HOLZER, H. (1980) Rapid reversible inactivation of Fructose-1,6-bisphosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose. *FEBS Letters* 109: 271-274.
- LOVELOCK, E. J. (1953) Haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. *Biochem. Biophys. Acta* 10: 414-426.
- LUTHER, M. A., LEE, J. C. (1986) The role of phosphorylation in the interaction of rabbit muscle phosphofructokinase with F-actin. *J. Biol. Chem.* 261: 1753-1759.
- MARQUARDT, D.W. (1963) An algorithm for least squares estimation of parameters. *Journal of the Soc. of Industr. and App. Math.* 11: 431-441.
- MARTINI, G., URSISINI, M. V. (1996) A new lease of life for an old enzyme. *BioEssays* 18: 631-637.
- MATSUMOTO, K., UNO, I., ISHIKAWA, T. (1984) Identification of the structural gene and nonsense alleles for adenylate cyclase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 157: 277-282.
- MATSUMOTO, K., UNO, I., TOH-E, A., ISHIKAWA, T., OSHIMA, Y. (1982a) Cyclic AMP may not be involved in catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence from mutants capable of utilizing it as an adenine source. *J. Bacteriol.* 150: 277-285.
- MATSUMOTO, K., UNO, I., OSHIMA, Y., ISHIKAWA, T. (1982b) Isolation and characterization of yeast mutants deficient in adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 2355-2359.
- MAUCH, K., ARNOLD, S., REUSS, M. (1997) Dynamic sensitivity analysis of metabolic systems. *Chem. Eng. Sci.* 52: 2589-2598.
- MAZÓN, M. J., GANCEDO, J. M., GANCEDO, C. (1982) Phosphorylation and inactivation of yeast fructose-bisphosphatase *in-vivo* by glucose and by proton ionophores. *Eur. J. Biochem.* 127: 605-608.
- MAZUR, P. (1966) Cryobiology. Academic Press, London, New York.
- MBONYI, K., VAN AELST, L., ARGUELLES, J. C., JANS, A. W. H., THEVELEIN, J. M. (1990) Glucose-induced hyperaccumulation of cyclic AMP and defective glucose repression in yeast strains with reduced activity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 10: 4518-4523.

- MBONYI, K., BEULENS, M., DETREMERIE, K., GEERTS, L., THEVELEIN, J. M. (1988) Requirement of one functional *RAS* gene and inability of an oncogenic ras-variant to mediate the glucose-induced cAMP signal in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 3057-3951.
- MICHAL, G. Glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate. (1984) In: Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J. und Graßl, M. (Hrsg.) Vol. VI Metabolites 1, pp. 191-197, Verlag Chemie, Weinheim.
- MOLANO, J., GANCEDO, C. (1974) Specific inactivation of Fructose-1,6-bisphosphate from *Saccharomyces cerevisiae* by Yeast Protease. *Eur. J. Biochem.* 44: 213-217.
- MONOD, J., WYMAN, J. UND CHANGEUX, J.-P. (1965) On the nature of allosteric transition: a plausible model. *J. mol. Biol.* 12: 88-118.
- MUNDER, T., KÜNTZEL, H. (1989) Glucose-induced cAMP signaling in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the CDC25 protein. *FEBS Lett.* 242: 341-345.
- NAVAS, M. A., CERDÁN, S., GANCEDO, J. M. (1993) Futile cycles in *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the gluconeogenic enzymes during growth on glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1290-1294.
- NEI, T. (1976) Freezing injury to erythrocytes. II morphological alterations of cell membranes *Cryobiology* 13: 287-294.
- NEWSHOLME, E. A., START, C. (1973) Regulation in metabolism. Wiley-Interscience, London.
- NIKAWA, J., SASS, P., WIGLER, M. (1987) Cloning and characterization of the low-affinity cyclic AMP phosphodiesterase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7: 3629-3636.
- NISSLER, K., OTTO, A., SCHELLENBERGER, W., HOFMANN, E. (1984) Cooperation of fructose-2,6-bisphosphate and AMP in the activation of yeast phosphofructokinase. *Biomed. Biochim. Acta* 43: 535-540.
- NISSLER, K., HOFMANN, E., STEL'MASCHCHUK, V., ORLOVA, E., KISELEV, N. (1985) An electron microscopy study of the quaternary structure of yeast phosphofructokinase. *Biomed. Biochim. Acta* 44: 251-259.
- NISSLER, K., OTTA, A., SCHELLENBERGER, W., HOFMANN, E. (1983) Similarity of activation of yeast phosphofructokinase by AMP and fructose-2,6-bisphosphate *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 294-300.
- NISSLER, K., SCHELLENBERGER, W., HOFMANN, E. (1976) Substrate binding to yeast phosphofructokinase: Modelling of the MgATP binding. *Stud. Biophys.* 60: 125-130.
- NISSLER, K., SCHELLENBERGER, W., HOFMANN, E. (1977) Binding of MgATP to yeast phosphofructokinase. *Acta biol. med. germ.* 36: 1027-1033.
- NISSLER, K., SCHELLENBERGER, W., OTTO, A., HOFMANN, E. (1985) Interaction of ADP and fructose-2,6-bisphosphate with phosphofructokinase-1 from yeast. *Biomed. Biochim. Acta* 4: 1065-1070.
- OTTO, A., PRZYBYLSKI, NISSLER, K., SCHELLENBERGER, W., HOFMANN, E. (1986) Kinetic effects of fructose-1,6-bisphosphate on yeast phosphofructokinase. *Biomed. Biochim. Acta* 45: 865-875.
- PARAVICINI, G., KRETSCHMER, M. (1992) The yeast *FBP26* gene codes for a fructose-2,6-bisphosphate. *Biochemistry* 31: 7126-7133.
- PARKINSON, A., WILSON, M. Development of a hybrid GRG-SQP algorithm for constrained nonlinear programming. *J. Mech. Trans. and Automation in Design* (1988) 110: 308-315.
- PETERS, J. M. (1994) Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *TIBS* 19: 377-382.

- PLIETZ, P., DAMASCHUN, G., KOPPERSCHLÄGER, G., MÜLLER, J. J. (1978) Small-angle X-ray scattering studies on the quaternary structure of phosphofructokinase from baker's yeast. *FEBS Letters* 91: 230-232.
- POGSON, C. I., RANDLE, P. J. (1966) The control of rat-heart phosphofructokinase by citrate and other regulators. *Biochem. J.* 100: 683-693.
- POLAKIS, E. S., BARTLEY, W. (1966) Changes in the intracellular concentrations of adenosine phosphates and nicotinamide nucleotides during the aerobic growth cycle of yeast on different carbon sources. *Biochem. J.* 99: 521-531.
- POPOVA, S. V. UND SEL'KOV, E. E. (1976) *Mol. biol.* (russ.) 10: 1116-1126
- POTTER, R. L., TAYLOR, S. S. (1979) Regulation between structural domains and function in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase I and II from porcine skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 254: 2413-2418.
- POWERS, S., KATAOKA, T., FASANO, O., GOLDFARB, M., STRATHERM, J., BROACH, J., WIGLER, M. (1984) Genes in *Saccharomyces cerevisiae* encoding proteins with domains homologous to the mammalian ras proteins. *Cell* 36: 607-612.
- Press, W. H., Flannery, B. P., Teukolsky, S. A., and Vetterling, W. T. (1986) Numerical Recipes. Cambridge, Cambridge University Press.
- PRZYBILSKY, F. (1986) Einfluß von anorganischem Phosphat auf die kinetischen Eigenschaften der Phosphofructokinase aus Hefe: Wechselwirkungen mit AMP, Fructose-2,6-BP und Fructose-1,6-Bisphosphate. Dissertation, Karl-Marx-Universität Leipzig, Leipzig.
- PRZYBYLSKI, F., OTTO, A., NISSLER, K., SCHELLENBERGER, W., HOFMANN, E. (1985) Effects of fructose-1,6-bisphosphate on the activation of yeast phosphofructokinase by fructose-2,6-bisphosphate and AMP. *Biochim. Biophys. Acta* 831: 350-352.
- PURWIN, C., NICOLAY, K., SCHEFFERS, W. A., HOLZER, H. (1986) Mechanism of control of adenylate cyclase activity in yeast by fermentable sugars and carbonyl cyanide *m*-chloramphenicol. *J. Biol. Chem.* 261: 8744-8749.
- PURWIN, C., LAUX, M., HOLZER, H. (1987) Fructose-2-phosphate, an intermediate of the dephosphorylation of fructose-2,6-bisphosphate with a purified yeast enzyme. *Eur. J. Biochem.* 164: 27-30.
- REIBSTEIN, D., DEN HOLLANDER, J. A., PILKIS, S. J., SHULMAN, R. G. (1986) Studies on the regulation of yeast phosphofructo-1-kinase: Its role in aerobic and anaerobic glycolysis. *Biochemistry* 25:219-227.
- REICH, J. G., SEL'KOV, E. E. (1981) Energy metabolism of the cell. Academic press, London.
- REUTER, R., ESCHRICH, K., SCHELLENBERGER, W. AND HOFFMANN, E. (1979) Kinetic modelling of yeast phosphofructokinase *Acta biol. et med. germ.* 38: 1067-1079.
- RICHTER, O., BETZ, A., GIERSCH, C. (1975) The response of oscillating glycolysis to perturbations in NADH/NAD system: A comparison between experiments and a computer model. *BioSystems* 7: 137-146.
- RIEGER, M. (1983) Untersuchungen zur Regulation von Glycolyse und Atmung in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, ETH Zürich.
- RIVETT, A. J. (1993) Proteasomes: multicatalytic complexes. *Biochem. J.* 219: 1-10.
- RIZZI, M., BALTES, M., THEOBALD, U., REUSS, M. (1997) *In-vivo* analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II. Mathematical model. *Biotechnol. Bioeng.* 55: 592-608.
- ROBERTS, S. J., SOMERO, G. N. (1987) Binding of phosphofructokinase to filamentous actin. *Biochem.* 26: 3437-3442.

- ROSEN, O. M., ERLICHMAN, J. (1975) Reversible autophosphorylation of a cyclic 3':5'-AMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* 250: 7788-7794.
- ROTMAN, B., PAPERMASTER, B. A. (1966) Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 55: 134-141.
- SAKATA, J., UYEDA, K. (1990) Bovine heart fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: complete amino acid sequence and localization of phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4951-4955.
- SASS, H. D., FIELD, J., NIKAWA, J., TODA, T., WIGLER, M. (1986) Cloning and characterization of high-affinity cAMP phosphodiesterase of *S. cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9303-9307.
- SHELLENBERGER, W., HERVAGAUT, J.-F. (1991) Irreversible transitions in the 6-phosphofruktokinase/fructose-1,6-bisphosphatase cycle. *Eur. J. Biochem.* 195: 109-113.
- SCHERRER, R., LOUDEN, L., GERHARDT, P. (1974) Porosity of the yeast cell wall and membrane. *J. Bacteriol.* 118: 534-540.
- SCHORK, S. M., BEE, G., THUMM, M., WOLF, D. H. (1994) Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*: degradation occurs via the ubiquitin pathway. *FEBS Lett.* 349: 270-274.
- SCHWARZ, O. C. (1996) Optimierung von Extraktionsmethoden zur quantitativen Bestimmung intrazellulärer Metabolite in *Saccharomyces cerevisiae*. Studienarbeit, Institut für Bioverfahrenstechnik Universität Stuttgart, Stuttgart.
- SEGEL, I. H. (1993) Enzyme kinetics. Wiley-Interscience publication, New York.
- SERRANO, R., GANCEDO, J. M., GANCEDO, C. (1973) Assay of yeast enzymes *in situ*. *Eur. J. Biochem.* 34: 479-482.
- SOLS, A., REEVES, R. E., GANCEDO, C. (1974) Regulation of enzymes *in situ*. In: Metabolic interconversion of enzymes (Hrsg. Fischer et al.) pp. 393-399, Springer, Berlin.
- SRERE, P. A. (1967) Enzyme concentration in tissues. *Science* 158: 936-937.
- STEPHANOPOULOS, G., SINSKEY, A. J. (1993) Metabolic engineering-methodologies and future prospects. *TIBTECH* 11: 392-396.
- STEVENS, C. F. (1979) The neuron. *Sci. Am.* 241(3): 55-65
- TAYLOR, S. S., BUECHLER, J. A., YONEMOTO, W. (1990) cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 971-1005.
- TEICHERT, U., MECHER, B., MÜLLER, H., WOLF, D. H. (1989) Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J. Biol. Chem.* 264: 16037-16045.
- THEOBALD, U. (1995) Untersuchungen zur Dynamik des Crabtree-Effekts. Dissertation, Universität Stuttgart, Stuttgart, Germany und VDI Verlag, Düsseldorf, Germany.
- THEOBALD, U., MAILINGER, W., BALTES, M., REUSS, M., RIZZI, M. (1993) *In vivo* analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique. *Anal. Biochem.* 214: 31-37.
- THEOBALD, U., MAILINGER, W., BALTES, M., RIZZI, M., REUSS, M. (1997) *In-vivo* analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Experimental observations. *Biotechnol. Bioeng.* 55: 305-316.
- THEVELEIN, J. M. (1991) Fermentable sugars and intracellular acidification as specific activators of the RAS-adenylate cyclase signaling pathway in yeast: the relationship to nutrient-induced cell cycle control. *Mol. Microbiol.* 5: 1301-1307.
- THEVELEIN, J. M. (1994) Signal transduction in yeast. *Yeast* 10: 1753-1790.

- THEVELEIN, J. M., BEULENS, M., HONSHOVEN, F., HOEBEECK, G., DETREMERIE, K., GRIEWEL, B., DEN HOLLANDER, J. A., JANS, A. W. H. (1987) Regulation of the cAMP level in yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the glucose-induced cAMP signal is not mediated by a transient drop in the intracellular pH. *Gen. Microbiol.* 133: 2197-2205.
- TODA, A., CAMERON, S., SASS, P., ZOLLER, M., WIGLER, M. (1987a) Three different genes in *Saccharomyces cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50: 277-287.
- TODA, A., CAMERON, S., SASS, P., ZOLLER, M., SCOTT, J. D., MCBULLEN, B., HURWITZ, M., KREBS, E. G., WIGLER, M. (1987b) Cloning and characterization of *BCY1*, a locus encoding a regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7: 1371-1377.
- TODA, A., UNO, I., ISHIKAWA, T., POWERS, S., KATAOKA, T., BROEK, D., CAMERON, S., BROACH, J., MATSUMOTO, K., WIGLER, M. (1985) In yeast, Ras proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* 40: 27-36.
- TRIP, M. L., PINON, R., MEISENHOLDER, J., HUNTER, T. (1986) Identification of phosphoproteins correlated with proliferation and cell cycle arrest in *Saccharomyces cerevisiae*: positive and negative regulation by cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5973-5977.
- VAN AELST, L., BOY-MARCOTTE, E., CAMONS, J. H., THEVELEIN, J. M., JACQUET, M. (1990) The C-terminal part of the *CDC25* gene product plays a key role in signal transduction in the glucose-induced modulation of cAMP level in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 193: 675-680.
- VAN AELST, L., JANS, A. W. H., THEVELEIN, J. M. (1991) Involvement of *CDC25* gene product in the signal transduction pathway of the glucose-induced RAS-mediated cAMP signal in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 137: 341-349.
- VAN DER PLAAT, J. B., SOLINGEN, P. (1974) Cyclic-3',5'-adenosine monophosphate stimulates trehalose degradation in baker's yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56: 580-587.
- VAN SCHAFTINGEN, E., DAVIES, D. R., HERS, H. G. (1981) Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose-2,6-bisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2861-2863.
- VAN SCHAFTINGEN, E., LEDERER, B., BARTONS, R., HERS, H.-G. (1982) A kinetic study of pyrophosphate: Fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. *Eur. J. Biochem.* 129: 191-195.
- VASEGHI, S., BAUMEISTER, A., BALTES, M., RIZZI, M., REUSS, M. (1999) *In-vivo* dynamics of the pentose-phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering* 1: 128-140.
- VIÑUELA, E., SALAS, M. L., SOLS, A. (1963) End-product inhibition of yeast phosphofructokinase by ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12: 140-145.
- WEIBEL, K. E., MOR, J. R., FIECHTNER, A. (1971) Rapid sampling of yeast cells and automated assays of adenylate, citrate, pyruvate and glucose-6-phosphate pools. *Anal. Biochem.* 58: 208-216.
- WERNER-WASHBURNE, M., BROWN, D., BRAUN, E. (1991) Bcy1, the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in yeast, is differentially modified in response to the physiological status of the cell. *J. Biol. Chem.* 266: 19704-19709.
- WINGENDER-DRISSEN, R. (1983) Yeast cyclic AMP-dependent protein kinase. *FEBS-Letters* 163: 28-32.
- WOLF, D. H., EKMAN, C. (1979) Studies of a proteinase B mutant of yeast. *Eur. J. Biochem.* 98: 375-384.

-
- YAMASHOJI, S., HESS, B. (1984) Activation of yeast 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase and phosphate. *FEBS Letters* 178: 253-256.
- YAMASHOJI, S., HESS, B. (1984) Yeast 6-phosphofructo-2-kinase. *FEBS Letters* 172: 51-54.
- ZLOTNIK, H., FERNANDEZ, H. P., BOWERS, B., CABIB, E. (1984) *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer, that determines wall porosity. *J. Bacteriol.* 159: 1018-1026.
- ZOLLER, M. J., KERLAVAGE, A. R., TAYLOR, S. S. (1979) Structural comparison of cAMP-dependent protein kinase I and II from porcine skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 254: 2408-2410.