

Theoretische Untersuchungen der mikroskopischen Synchronisation von molekularen Enzymzyklen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Physiker Pedro Stange

geb. am 7.3.1968 in Sebnitz

Gutachter:

Prof. Dr. A.S. Mikhailov (Fritz-Haber-Institut Berlin)

Prof. Dr. S.C. Müller (Universität Magdeburg)

Prof. Dr. H. Gruler (Universität Ulm)

Eingereicht am: 25.6.2000

Verteidigung am: 5.7.2001

Wichtige Symbole und Bezeichnungen

Lateinische Symbole

| | |
|-----------------|---|
| D | Diffusionskonstante für räumliche Diffusion |
| E | Enzym |
| ES | Enzym-Substrat-Komplex |
| F | Fluß der Wahrscheinlichkeitsdichte |
| f | Fluß der Konzentrationsdichte |
| K_e | Phasenpunkt im diskreten Modell, an dem der Enzymzyklus endet |
| K_p | Phasenpunkt im diskreten Modell, an dem die Reaktionsprodukte freigesetzt werden |
| k_p | Phasenpunkt im kontinuierlichen Modell, an dem die Reaktionsprodukte freigesetzt werden |
| k_s | Phasenpunkt, an dem der "random walk" beginnt |
| m | Zahl bzw. Konzentration der freien Produktmoleküle |
| \bar{m} | Fixpunkt der Produktmolekülkonzentration |
| n | Zahl bzw. Konzentration der Enzyme im Grundzustand |
| \bar{n} | Fixpunkt der Enzymkonzentration im Grundzustand |
| $\bar{n}(\phi)$ | Konzentrationsdichte der Enzyme im Phasenzustand ϕ |
| N | Gesamtzahl der Enzyme |
| $P(\Delta\phi)$ | Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung der Phasendifferenzen |
| $P(\phi)$ | Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung der Enzyme entlang der Reaktionskoordinate |
| P | Reaktionsprodukte |
| r_i | binäre Zustandsvariable $r_i = 1$, falls Enzym i ein regulatorisches Produktmolekül gebunden hat, sonst ist $r_i = 0$ |
| s | Zahl bzw. Konzentration der Substratmoleküle |
| S | Substratmoleküle |
| t_{mix} | Zeit für die diffusive Durchmischung der Produktmoleküle |
| $t_{transit}$ | Mittlere Zeitdauer eines Produktmoleküls, eins von N Zielen zu treffen |
| $t_{traffic}$ | Mittlere Zeitdauer eines Produktmoleküls, ein bestimmtes Ziel durch Diffusion zu treffen, falls nur ein Enzym vorhanden ist |
| u_i | binäre Zustandsvariable $u_i = 1$, falls Enzym i ein Substratmolekül gebunden hat, sonst ist $u_i = 0$ |
| v | Geschwindigkeit der Phasenkoordinate |

Griechische Symbole

| | |
|------------------|--|
| β | Bindungsratenkonstante für ein regulatorisches Produktmolekül |
| γ | Zerfallsrate der Reaktionsprodukte |
| η | Intensität des Gausschen weißen Rauschens |
| θ | Ordnungsparameter zur Charakterisierung der Phasensynchronisation |
| ι | Konversionsrate der Reaktionsprodukte in Substratmoleküle |
| κ | Dissoziationsrate der regulatorischen Moleküle |
| λ | Eigenwert |
| μ | Bindungsrate der regulatorischen Produktmoleküle $\mu = m\beta$ |
| ν | Substratbindungsrate |
| ν_0 | Anteil der Substratbindungsrate ohne allosterische Beeinflussung |
| ν_1 | Anteil der Substratbindungsrate durch allosterische Beeinflussung |
| $\bar{\nu}$ | Substratbindungsrate im Fixpunkt (\bar{m}, \bar{n}) |
| ν_{\pm} | Übergangsraten zwischen benachbarten Phasenpunkten im Automatenmodell |
| ρ | Erzeugungsrate der Produktmoleküle, falls die Kopplung zwischen den Enzymen vernachlässigbar klein ist |
| ξ | relative statistische Schwankungsbreite der Turnover-Zeit |
| σ | intramolekulare Diffusion entlang der Reaktionskoordinate ϕ |
| τ | Mittlere Zeitdauer eines vollständigen enzymatischen Zyklus (Turnover-Zeit) |
| τ_1 | Mittlere Zeitdauer bis zur Freisetzung des Reaktionsprodukts |
| $\tilde{\tau}$ | Zeitdauer für irgendeine beliebige Realisierung eines enzymatischen Zyklus |
| $\tilde{\tau}_1$ | Zeitdauer für irgendeine beliebige Realisierung bis zur Freisetzung des Reaktionsprodukts |
| $\Delta\tau$ | Schwankungsbreite der Turnover-Zeit |
| Φ | diskrete Reaktionskoordinate zur Charakterisierung des Phasenpunktes des Enzymzyklus |
| ϕ | kontinuierliche Reaktionskoordinate zur Charakterisierung des Phasenpunktes des Enzymzyklus |
| χ | Stärke der allosterischen Regulation $\chi = \nu_0/\nu_1$ |
| Υ, Ψ | Binäre Zufallsvariablen, die die Werte 0 oder 1 annehmen können |
| ω | Kreisfrequenz der periodischen Änderung der Moleküle im Fall von Spiking |
| ω_k | wie ω , aber mit Spezifizierung der Zahl k der Enzymgruppen |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Einleitung | 5 |
| 1 Synchronisation von Oszillatoren als Selbstorganisationsphänomen | 8 |
| 1.1 Mikroskopische und makroskopische Selbstorganisation | 8 |
| 1.2 Gekoppelte Phasenoszillatoren | 12 |
| 2 Physikalische Eigenschaften von Enzymreaktionen | 16 |
| 2.1 Biopolymere als Katalysatoren | 17 |
| 2.2 Konformationsänderungen und Enzymkinetik | 26 |
| 2.3 Enzymreaktionen in kleinen Raumbereichen | 31 |
| 3 Stochastische Modellierung eines produktaktivierten Enzymsystems | 39 |
| 3.1 Stochastisches Modell mit zeitdiskreter Phasendynamik | 39 |
| 3.2 Gegenseitige Synchronisation der Enzymzyklen | 46 |
| 3.3 Stochastisches Modell mit kontinuierlicher Phasendynamik | 54 |
| 4 Die Meanfield-Näherung des produktaktivierten Enzymsystems | 70 |
| 4.1 Herleitung der Meanfield-Gleichungen aus der Mastergleichung | 70 |
| 4.2 Untersuchung der Meanfield-Gleichungen | 82 |
| 5 Untersuchung eines produktinhibierten Enzymsystems | 92 |
| 5.1 Stochastisches Modell mit kontinuierlicher Phasendynamik | 93 |
| 5.2 Synchrone und asynchrone Enzymaktivität | 97 |
| 5.3 Meanfield-Näherung des produktinhibierten Enzymsystems | 103 |
| 5.4 Modifikationen des Inhibitionsmechanismus | 115 |
| 5.5 Vergleich zwischen den Meanfield-Modellen für das produktinhi- bierte und produktaktivierte Reaktionssystem | 119 |
| 6 Reaktionsketten chemischer Reaktionen und synchronisierte Enzym- zyklen | 124 |
| 6.1 Stochastisches Modell | 125 |
| 6.2 Synchronisation der Enzymzyklen | 129 |

| | |
|--|------------|
| 6.3 Die Untersuchung der Gleichungen der Meanfield-Näherung . . . | 135 |
| Zusammenfassung | 145 |
| A | 149 |
| A.1 Wahrscheinlichkeitsverteilung der Produktmoleküle ohne Kopplung | 149 |
| A.2 Zusammenhang zwischen Modellen mit diskreter und kontinuierlicher Phasenvariable | 153 |
| A.3 Herleitung der Meanfield-Gleichungen für das Modell mit Produktinhibierung | 154 |
| Literaturverzeichnis | 162 |
| Sachregister | 177 |

Einleitung

Living matter is the most interesting subject of investigation for the living matter that is able to investigate.

L.A. Blumenfeld [1]

Eine lebende Zelle ist ein komplexes System, in dem zehntausende chemische Reaktionen gleichzeitig ablaufen. Die Tatsache, daß diese Reaktionen trotz thermischer Fluktuationen und Schwankungen der Umgebungsparameter regelmäßig und voraussagbar sind, weist auf einen hohen Grad an Organisation in diesem System hin. Die Prinzipien, die hinter diesen hochgeordneten Prozessen stecken, sind gegenwärtig jedoch noch nicht klar verstanden. Zwar existieren durch die Fortschritte der Molekularbiologie sehr genaue Kenntnisse über die Struktur der wichtigsten Bausteine der lebenden Zelle – den Proteinen und Nukleinsäuren. Dennoch sind sich Biologen und Biochemiker weitgehend einig, daß selbst zum Verständnis des Funktionierens eines Einzellers das Wissen über diese elementaren Bausteine nicht ausreicht [2, 3]. Die Einsicht in die Wechselwirkungsmechanismen zwischen den Teilen eines biologischen Systems ist mindestens genauso wichtig wie Erkenntnisse über die Teile selbst.

Um diese Einsichten zu erhalten, ist die Anwendung physikalischer Methoden bei der Untersuchung dieser komplexen Systeme sinnvoll. Physikalische Theorien zeichnen sich oft durch die einfache Struktur der ihnen zugrunde liegenden Modelle aus. Diese Modelle als Abstraktionen realer Prozesse bilden einen Kompromiß zwischen den komplizierten Wechselbeziehungen der Realität und dem Versuch, diese zu verstehen, der meist nur für einfache Zusammenhänge gelingen kann. Biologische Systeme zeigen eine solche Vielfalt an Strukturen und Prozessen, daß die Analyse der chemischen und physikalischen Vorgänge, auf denen diese beruhen, vorläufig zur Erklärung nicht ausreicht [4]. Als Ergänzung zum beschreibenden Zugang der Biologie, können diese einfachen Modelle jedoch interessante Erkenntnisse liefern.

Die raum-zeitliche Organisation in lebenden Systemen ist eng mit dem Umstand verknüpft, daß sich diese fernab vom thermodynamischen Gleichgewicht befinden [5]. Strukturbildungsprozesse mit dieser Eigenschaft gibt es bereits in

physikalischen und chemischen Systemen. Beispiele sind der Laser [6, 7], Konvektionsinstabilitäten in Flüssigkeiten [8, 9] oder die Strukturbildungsprozesse der Belousov-Zhabotinsky-Reaktion [10, 11]. Alle diese Beispiele sind Formen dissipativer Selbstorganisation, verursacht durch Kooperativität der Teilsysteme fernab vom thermodynamischen Gleichgewicht. Insbesondere die Thermodynamik irreversibler Prozesse, die Theorie der Phasenübergänge sowie die nichtlineare Dynamik und Synergetik lieferten wertvolle Beiträge zum Verständnis dieser Prozesse [12, 13, 14, 15].

Die Anwendung der in diesen Disziplinen entwickelten Methoden auf biologische Phänomene wie Evolution, Morphogenese und Populationsdynamik brachten wichtige neue Erkenntnisse [16]. Aber auch intrazelluläre Vorgänge wie Kalziumwellen [17, 18] oder Oszillationen im glykolytischen System [19, 20] können als Phänomene dissipativer Selbstorganisation verstanden werden [21]. In [22] wurde nun die Frage diskutiert, ob die Mechanismen der Selbstorganisation, wie sie in makroskopischen Dimensionen beobachtet werden können, in jedem Fall auf mikroskopische Bereiche wie in lebenden Zellen übertragbar sind.

Die räumliche Ausdehnung von Zellkompartimenten, in denen die Stoffwechselprozesse ablaufen, beträgt meist einen Mikrometer oder weniger. Bei diesen Prozessen spielen Enzyme als biochemische Katalysatoren eine entscheidende Rolle. In solchen biochemischen "Mikroreaktoren" ist die Zahl der Enzyme einer Art auf einige hundert bis tausend beschränkt. Die diffusive Durchmischung kann in solch kleinen Raumbereichen um Größenordnungen schneller erfolgen als die Dauer eines einzelnen molekularen Enzymzyklus [23, 24]. Erscheinungsformen makroskopischer Selbstorganisation wie die für Reaktions-Diffusionssysteme typischen raum-zeitlichen Muster [25] können sich unter solchen Bedingungen nicht herausbilden [26]. Jedoch führt diese schnelle diffusive Durchmischung zur Kopplung getrennt ablaufender Reaktionsereignisse. Sie ist nach meiner Meinung eine wichtige Voraussetzung für die Herausbildung von Netzwerken miteinander wechselwirkender Proteine (insbesondere Enzyme), die essentielle Funktionen für die lebende Zelle haben [27, 28].

Neben der Diffusion in diesen Mikroreaktoren spielen die Prozesse, die an den Biomolekülen während ihres Wirkens ablaufen, eine entscheidende Rolle für das Verhalten dieser Netzwerke. So ist beispielsweise die komplexe interne Dynamik von Konformationsänderungen an einzelnen Enzymen während eines Enzymzyklus für deren katalytische Wirkung notwendig [29, 30].

Neue experimentelle Methoden wie die zeitaufgelöste Röntgenspektroskopie von Proteinkristallen oder die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie [31, 32, 33, 34] erlauben die Beobachtung einzelner enzymatischer Zyklen [35, 36]. Darüberhinaus ermöglichen neue experimentelle Verfahren bereits die Beobachtung enzymatischer Reaktionen in biologisch relevanten mikroskopischen Raumbereichen [37, 38]. Diese neuen experimentellen Methoden versprechen für die

nahe Zukunft tiefere Einsichten in die Eigenschaften der Enzymdynamik.

Experimente mit dem lichtempfindlichen Cytochrom-P-450-System zeigten [39, 40, 41], daß die Enzymzyklen einzelner Enzyme extern durch periodische Lichtpulse synchronisiert werden können. Ein anderer Typ externer Synchronisation wurde im Membrantransportsystem des Enzyms Na^+ , K-ATPase durch äußere zeitlich veränderliche elektrische Felder gefunden [42]. Die gemeinsame Schlußfolgerung dieser experimentellen Untersuchungen ist, daß sich als Folge externer Beeinflussung eine synchrone intramolekulare Dynamik zwischen den Molekülen herausbilden kann.

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Klärung der Frage, ob es prinzipiell möglich ist, daß diese Synchronisation molekularer Enzymzyklen auch ohne externe Beeinflussung, sondern nur hervorgerufen durch interne Wechselwirkungen zwischen den Enzymen, stattfindet. In diesem Fall würde es sich bei der mikroskopischen Synchronisation der Enzymzyklen um eine neue Eigenschaft handeln, die so in makroskopischen Reaktionssystemen nicht auftreten kann und eine Form mikroskopischer Selbstorganisation darstellt. Um diese Frage zu beantworten, werden enzymatische Reaktionen unter Einbeziehung der internen Dynamik der Enzyme untersucht. Typisch für alle betrachteten Reaktionen ist die Existenz von Wechselwirkungen zwischen den elementaren Reaktionsereignissen. Hierzu werden drei grundsätzliche Mechanismen betrachtet: Produktaktivierung, Produktinhibierung und parallel ablaufende Reaktionen. Bedingt durch die Winzigkeit der betrachteten Raumbereiche können Fluktuationen in der Zahl der beteiligten Moleküle nicht vernachlässigt werden [43]. Es werden deshalb vor allem stochastische Modelle zur Beschreibung der Reaktionskinetik verwendet.

Im ersten Kapitel dieser Arbeit werden die Eigenschaften mikroskopischer Selbstorganisation, wie sie z.B. auch beim Laser zu finden ist, genauer erläutert. Danach erfolgt in Kapitel 2 die Darstellung der wichtigsten Grundlagen, die zum Verständnis der Enzymkatalyse und chemischer Reaktionen in mikroskopischen Raumbereichen nötig sind. Im Kapitel 3 wird ein einfaches stochastisches Modell einer allosterischen Enzymreaktion mit Produktaktivierung untersucht. Daran schließt sich in Kapitel 4 die Diskussion der Mastergleichung für das im vorhergehenden Kapitel vorgestellte Reaktionssystem an. Im darauffolgenden Kapitel 5 wird ein komplexeres Modell einer produktinhibierten Enzymreaktion eingeführt und hinsichtlich des Vorhandenseins mikroskopischer Synchronisation studiert. Zum Abschluß werden in Kapitel 6 Wechselwirkungen zwischen nichtregulatorischen Enzymen betrachtet. Diese Wechselwirkungen haben ihre Ursache im gleichzeitigen Ablauf mehrerer verschiedener Reaktionen mit gemeinsamen Edukten und Produkten. Es wird wieder zuerst ein stochastisches Modell betrachtet und anschließend die Meanfield-Gleichungen analysiert.

Kapitel 1

Synchronisation von Oszillatoren als Selbstorganisationsphänomen

1.1 Mikroskopische und makroskopische Selbstorganisation

Lebende Zellen besitzen geordnete Strukturen in Raumbereichen mit nur wenigen Mikrometern Ausdehnung (siehe Abschnitt 2.3, S. 31). Die Möglichkeit der Herausbildung dieser Strukturen ergibt sich aus der permanenten äußeren Energiezufuhr, die das System fernab vom thermodynamischen Gleichgewicht hält [5] und die Grundlage für die unterschiedlichen Selbstorganisationsprozesse in lebenden Zellen schafft.

In [22] warfen Hess und Mikhailov die Frage auf, ob die in Zellen beobachteten Selbstorganisationsprozesse einfach eine verkleinerte Kopie makroskopischer Selbstorganisationsphänomene (wie z.B. der raum-zeitlichen Musterbildung in der Belousov-Zhabotinsky-Reaktion [44, 45]) sein können. Die Autoren betonen, daß die Anwendung der physikalischen Gesetze auf Längen- und Zeitskalen, wie sie für intrazelluläre Prozesse typisch sind, zu völlig neuen Eigenschaften führen können, die so in makroskopischen Reaktionsgefäßen nicht existieren.

So führt zum Beispiel die Brownsche Molekularbewegung für die meisten der an den biochemischen Reaktionen im Stoffwechsel beteiligten Moleküle zu mittleren freien Weglängen zwischen zwei Reaktionsereignissen, die im Bereich von Mikrometern liegen (siehe Abschnitt 2.3). Damit ist die diffusionsbedingte mittlere freie Weglänge vergleichbar oder sogar größer als die räumliche Ausdehnung der Zelle oder des Zellkompartiments, in dem die Reaktionen ablaufen. Musterbildung wie in makroskopischen Reaktions-Diffusionssystemen kann es unter diesen Bedingungen nicht geben. Andererseits ermöglicht die starke diffusive Durchmischung einen intensiven, schnellen Austausch von Molekülen und damit auch von

Informationen (z.B. Hormone, Boten-RNS usw.) innerhalb des Reaktionsvolumens. Eine lebende Zelle hat deshalb Ähnlichkeit mit einem Netzwerk, bestehend aus aktiven funktionellen Einheiten, die miteinander durch den schnellen Austausch von Molekülen kommunizieren können. In [22, 24, 26] wurde deshalb vermutet, daß sich unter diesen Bedingungen neue Formen *mikroskopischer Selbstorganisation* herausbilden können, die auf den Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Einheiten der Zelle wie z.B. den Enzymen beruhen.

Die Einführung des Begriffs "mikroskopische Selbstorganisation" legt die Existenz "makroskopischer Selbstorganisation" nahe und ist sicherlich nur dann sinnvoll, wenn klare Kriterien zur Unterscheidung zwischen beiden Formen angegeben werden können. Bevor ich mich in den folgenden Kapiteln dieser Arbeit mit Bedingungen und Beispielen für mikroskopische Selbstorganisationseffekte in lebenden Zellen beschäftige, sollen zuerst an ausgewählten Systemen die Gemeinsamkeiten und Unterschiede beider Formen der Selbstorganisation diskutiert werden.

Die in dieser Arbeit studierte Synchronisation molekularer Enzymzyklen ist ein Phänomen dissipativer Selbstorganisation¹. Durch intensive experimentelle und theoretische Untersuchungen beispielhafter Selbstorganisationseffekte wie sie bei Konvektionsinstabilitäten in hydrodynamischen Systemen [9, 8, 46, 47], der Belousov-Zhabotinsky-Reaktion [10, 11] oder dem Laser-Oszillator [6, 48] auftreten, gelang es, wichtige Gemeinsamkeiten gleichsam das Wesen dieser Effekte aufzudecken. Zur Theorie der Selbstorganisation gibt es umfangreiche Darstellungen, die dieses Gebiet unter verschiedenen Aspekten betrachten [12, 16, 13, 49, 14, 25, 50, 15].

Es gibt einige wichtige Prinzipien, die bei dissipativer Selbstorganisation auftreten. Allen diesen Effekten gemeinsam ist der Entropieexport als eine Grundbedingung für Selbstorganisation. Die Entropieabgabe wird durch die Zuführung hochwertiger Energie und der Abführung niederwertiger Energie (z.B. Wärme) ermöglicht. Die Energie wird im System also meist transformiert. Innerhalb des betrachteten Systems existieren Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Elementen und Rückkopplungsmechanismen. Für Selbstorganisation ist als Grundbedingung ein Mindestabstand vom thermodynamischen Gleichgewicht erforderlich. Meist können Ordnungsparameter gefunden werden, die die Systemdynamik determinieren. Oftmals werden aus einer Vielzahl möglicher Ordnungszustände oder Moden nur einige wenige verstärkt, die dann durch den Ordnungsparameter beschrieben werden. Im Übergangsbereich vom ungeordneten Zustand zum geordneten selbstorganisierten Verhalten, der mit wachsendem Abstand vom thermodynamischen Gleichgewicht auftritt, zeigen diese Systeme Ähnlichkeit mit Gleichgewichtsphasenübergängen.

¹Konservative (z.B. Kristallbildung) und dispersive (Solitonen) Selbstorganisationseffekte werden nicht weiter betrachtet.

Obwohl dissipative Selbstorganisationsprozesse sich fernab vom thermodynamischen Gleichgewicht vollziehen, kann man für einige dieser Systeme annehmen, daß sie sich lokal betrachtet dennoch im thermodynamischen Gleichgewicht befinden. Für Glansdorff und Prigogine war diese Tatsache in [13] ein wichtiger Ausgangspunkt bei der Entwicklung einer Nichtgleichgewichtsthermodynamik. Sie schreiben zu Beginn des Kapitel II §2 ([13], S. 14): *“In general, the evaluation of entropy production and entropy flow can only be performed using the methods of non-equilibrium statistical mechanics or of kinetic theory of gases. Even the problem of defining entropy outside the state of equilibrium is clearly a subject which goes beyond macroscopic thermodynamics. We shall however consider throughout this monograph situations for which a macroscopic evaluation of entropy production and entropy flow still remains possible. This will be the case when there exists within each small mass element of the medium a state of local equilibrium for which the local entropy s is the same function of the local macroscopic variables as at equilibrium state. This assumption of local equilibrium is not in contradiction with the fact that the system as whole is out of equilibrium.”*

Selbstorganisationsprozesse in Systemen, die sich lokal im thermodynamischen Gleichgewicht befinden, werde ich in Zukunft als makroskopische Selbstorganisation bezeichnen. Besitzt ein System diese Eigenschaft, weichen beispielsweise die Verteilungsfunktion der Geschwindigkeit oder die räumlichen Verteilung der Teilchen nicht oder nur sehr wenig von denen im thermodynamischen Gleichgewicht ab. Die thermodynamischen Zustandsgrößen Temperatur, Druck und chemisches Potential haben dann die gleiche Bedeutung wie im thermodynamischen Gleichgewicht. Unter diesen Bedingungen kann jedoch aus den thermodynamischen Eigenschaften in einem kleinen Raumelement nichts über den Gesamtzustand des Systems ausgesagt werden. Denn dieses kann dennoch fernab vom Gleichgewicht liegen.

Neben Systemen, die makroskopische Selbstorganisation zeigen, gibt es auch solche, für die die Näherung des lokalen Gleichgewichts nicht getroffen werden kann. Selbstorganisationsprozesse führen dann auch lokal zu starken Abweichungen vom thermodynamischen Gleichgewicht. Deshalb werde ich in solchen Fällen von “mikroskopischer Selbstorganisation” sprechen. Ein typisches Beispiel mikroskopischer Selbstorganisation findet sich, wie im folgenden gezeigt wird, beim Laser.

Ein Laser besteht bekanntlich aus aktiven Elementen (Ionen, Moleküle), die verschiedene Energieniveaus besetzen können. Zum prinzipiellen Verständnis ist es ausreichend, ein 2-Niveausystem, wie es in Abb. 1.1 dargestellt ist, zu betrachten². Die Zahl der besetzten Zustände a sei n_a , die der Zustände b sei n_b . Im thermodynamischen Gleichgewicht ist die Besetzung der beiden Energieniveaus

²Um Resonanzfluoreszenz zu vermeiden, müssen jedoch in realen Lasern mindestens 3-Energieniveausysteme verwendet werden.

durch die Boltzmannverteilung

$$n_a = n_b \exp(-h\nu/k_B T) \quad (1.1)$$

gegeben. Ein aktives Element kann vom Niveau b durch Absorption eines Photons der Energie $h\nu$ in das energetisch höher gelegene Energieniveau a übergehen und wiederum durch Emission eines Photons in das tiefergelegene Energieniveau a zurückkehren. Dieser Prozeß der Emission kann sowohl spontan ablaufen, als auch durch bereits existierende Photonen mit der Energie $h\nu$ erzwungen werden. In diesem Fall spricht man von induzierter bzw. stimulierter Emission. Die ausgesendete elektromagnetische Welle hat bei stimulierter Emission nahezu die gleiche Richtung, Phase und Frequenz wie die stimulierende Welle [48].

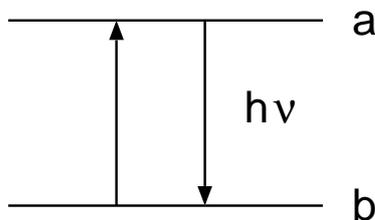


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des 2-Niveau-Lasersystems.

Der Effekt der induzierten Emission kann zu Lichtverstärkung führen, wenn pro Zeiteinheit mehr Photonen durch induzierte Emission emittiert als erneut absorbiert werden. Dieser Fall kann dann eintreten, wenn eine Besetzungsinversion der Besetzungszahlen der beiden Energieniveaus vorhanden ist, d.h. falls

$$n_a > n_b \quad (1.2)$$

gilt³. Wird die äußere Energiezufuhr (Pumpen) ausreichend groß, so vollzieht sich eine qualitative Änderung von vorher ungeordneten stochastischen Übergängen der atomaren Dipole hin zu synchronen Oszillationen. Ohne die weiteren Details, wie den zur Rückkopplung und Modenselektion notwendigen Resonator oder den konkreten Mechanismus der Energiezufuhr zum Erreichen der Besetzungsinversion diskutieren zu wollen, sind diese Betrachtungen bereits ausreichend, um zu erkennen, daß ein Laser auch lokal fernab vom thermodynamischen Gleichgewicht arbeitet.

³Der genaue Wert der minimal notwendigen Inversion der Besetzungsniveaus hängt von der quantenmechanisch berechenbaren Wahrscheinlichkeit für die induzierte Emission, der Rate der spontanen Emission und weiteren technischen Faktoren wie der Resonatorgüte ab. Das Verhältnis n_a/n_b ist in jedem Fall größer als 1.

Aus Gl. (1.1) folgt sofort, daß der Fall $n_a > n_b$ für keine noch so hohe Temperatur erreicht werden kann. Unter Laserbedingungen liegt aber Besetzungsinversion vor und es gilt Ungleichung (1.2). Selbst für ein einzelnes aktives Element ist dann die Aufenthaltswahrscheinlichkeit im energiereicheren Niveau a höher als im Niveau b , wie es im Gegensatz dazu die Boltzmannverteilung voraussagen würde. Gemäß der oben gegebenen Unterscheidung handelt es sich beim Laser deshalb um mikroskopische Selbstorganisation. Als Folge davon hat die elektromagnetische Strahlung eines Laser-Oszillators kohärente Eigenschaften, charakterisiert durch strenge Phasenbeziehungen und Monochromasie, hervorgerufen durch das kooperative Verhalten der aktiven Elemente.

In verschiedenen biochemischen Reaktionen wie der enzymkatalysierten Glykolyse [19, 51, 52] oder der HR-Peroxidasereaktion [53, 54] können sich komplexe raum-zeitliche Strukturen herausbilden (siehe Abb. 1.2). Diese Formen der Selbstorganisation sind typische Beispiele für makroskopische Selbstorganisation.

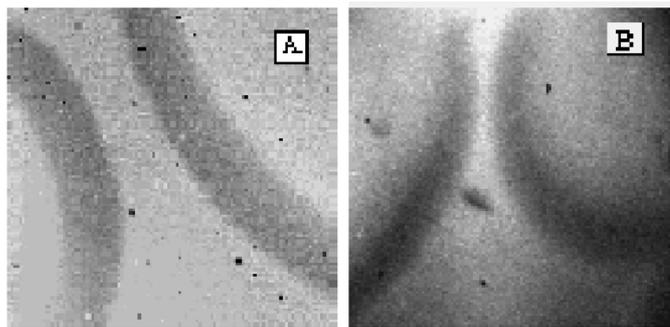


Abb. 1.2: Ausbreitung von spiralförmigen (A) NADH-Wellen und (B) Protonenwellen während der Glykolyse in Hefeextrakt. Aus [52].

In dieser Arbeit werden Beispiele enzymatischer Reaktionen untersucht, die innerhalb sehr kleiner Raumbereiche ablaufen und eine völlig andere Form selbstorganisierten Verhaltens zeigen. Diese Form ist dadurch gekennzeichnet, daß die Enzymzyklen unterschiedlicher Enzyme synchronisieren können. Betrachtet man unter diesen Bedingungen einen Raumausschnitt mit nur wenigen Enzymen, so zeigen diese Enzyme synchronisiertes Verhalten, das durch den nahezu gleichzeitigen Beginn des Enzymzyklus, der gleichzeitigen Freisetzung der Reaktionsprodukte usw. gekennzeichnet ist.

1.2 Gekoppelte Phasenoszillatoren

In den letzten Jahrzehnten hat sich das Verständnis dynamischer Systeme sowohl der klassischen Hamiltonschen Systeme [55, 56] als auch von allgemeineren nie-

derdimensionalen Systemen [57, 58, 50, 59] stark vertieft. Eine wichtige Aufgabe der gegenwärtigen physikalischen Forschung ist die Analyse dynamischer Systeme mit vielen Freiheitsgraden. Diese zeigen oft interessante Eigenschaften raum–zeitlicher Musterbildung [60, 61, 62, 25, 63], hervorgerufen durch kooperatives Verhalten und Wechselwirkungen. Die Untersuchung dieser Systeme ist jedoch, bedingt durch deren Komplexität, sehr schwierig. Eine vielversprechende Herangehensweise zur Lösung dieses Problems ist das Studium von Systemen, die aus gekoppelten Untereinheiten bestehen, die jede für sich genommen eine sehr einfache Dynamik aufweisen und deren Eigenschaften völlig verstanden sind [64]. Typische Beispiele solcher Untersuchungen sind die Analyse von Automaten [65, 66], Neuronalen Netzen und gekoppelten diskreten Abbildungen [67, 68, 69].

Eine in den letzten Jahren besonders intensiv untersuchte Klasse von dynamischen Systemen, die aus Elementen mit einer einfachen Dynamik bestehen, sind Populationen gekoppelter Oszillatoren [70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80]. In dieser Arbeit werden chemische Reaktionen betrachtet, die durch Enzyme katalysiert werden. Deren komplexes zeitliches Verhalten wird durch Elemente angenähert, die eine einfache Dynamik besitzen und sehr stark Phasenoszillatoren ähneln⁴.

Zeitlich periodisches Verhalten ist in der realen Welt weit verbreitet. Systeme, bestehend aus gekoppelten Oszillatoren, weisen deshalb viele Analogien in ihrer Struktur und in ihrem Verhalten zu wirklichen physikalischen, chemischen, biologischen und sozialen Systemen auf, sind aber noch einfach genug, um analytisch oder numerisch untersucht zu werden. Die Eigenschaft der Periodizität der n -dimensionalen Zustandsgröße $\vec{x}(t)$, die die Dynamik eines einzelnen Elements eines solchen Systems beschreibt, erlaubt die Verwendung einer skalaren Phasenvariablen $\phi(\vec{x}(t))$ als Funktion von $\vec{x}(t)$ [86, 85] zur Beschreibung des Zustandes dieses Elements. Von einem mathematischen Standpunkt aus gesehen, kann die periodische Dynamik in einem höherdimensionalen Zustandsraum auf die Beschreibung mit einer eindimensionalen Phasenvariablen reduziert werden. Das Gesamtsystem, bestehend aus N Elementen, besitzt nun insgesamt nur noch N Freiheitsgrade.

Existieren Wechselwirkungen zwischen der zeitlich periodischen Dynamik eines Oszillators und eines sich periodisch ändernden Signals, das z.B. von der Dynamik eines zweiten Oszillators oder einer äußeren Kraft herrühren kann, so kann es zu Synchronisationseffekten kommen. Diese Synchronisation ist durch

⁴Wie in den Kapiteln 3-6 noch genauer diskutiert wird, ist die Dynamik dieser Elemente im Gegensatz zu typischen kontinuierlichen Phasenoszillatoren durch eine zufällige Verweildauer im Grundzustand charakterisiert. Sie können deshalb ähnlich zu Neuronenmodellen [81, 82] unter diesem Gesichtspunkt als anregbare Elemente [83, 84] betrachtet werden. Eine Einführung in die mathematischen Grundlagen von Systemen gekoppelter Oszillatoren findet sich in [85].

festen Phasenbeziehungen zwischen den Oszillatoren definiert und kann auch in Systemen mit mehr als zwei Oszillatoren gefunden werden. Betrachtet man zum Beispiel zwei Oszillatoren mit den Phasen $\phi_1(t)$ und $\phi_2(t)$ ⁵, so gilt im Fall von Synchronisation

$$\Delta\phi = n\phi_1(t) - m\phi_2(t) = \text{konst.}, m, n \in \mathbb{Z}. \quad (1.3)$$

Tatsächlich sind Synchronisationsphänomene gekoppelter Oszillatoren in natürlichen Systemen weit verbreitet [87, 88]. Wichtige Beispiele in physikalischen Systemen sind Synchronisationseffekte mechanischer Oszillatoren und elektronische Schaltungen [89] oder Felder von Josephson-Kontakten [90]. Beispiele für Synchronisationseffekte in biologischen Systemen finden sich in Zellpopulationen [91, 92, 93] oder sind das periodische Leuchten von Glühwürmchen [94]. Diese können durch Modelle, bestehend aus großen Populationen von gekoppelten Phasenoszillatoren beschrieben werden.

In vielen realen Systemen spielen Fluktuationen und zufällige externe Störungen eine große Rolle und modifizieren deren Dynamik. Viele der oben angeführten Beispiele von Synchronisationsphänomenen sind solche, in denen diese Fluktuationen einen wichtigen Einfluß auf das Systemverhalten haben. Starre Phasenbeziehungen zwischen synchronen Oszillatoren können in diesen Systemen durch Rauschen zerstört werden. Die oben getroffene Definition (1.3) von Synchronisation als Existenz fester Phasenbeziehungen zwischen mindestens zwei Oszillatoren oder mindestens einem Oszillator und einem externen Signal ist in Gegenwart von Fluktuationen praktisch nie erfüllt. So bewirkt Rauschen, daß die Phasendynamik von Oszillatoren und damit auch die Phasendifferenz $\Delta\phi$ einer Diffusion unterliegt [95, 96]. Definition (1.3) würde also bedeuten, daß in Systemen mit Fluktuationen keine Synchronisation möglich ist. Im Fall von Systemen mit Fluktuationen ist es daher sinnvoll, nicht die Phasendifferenzen selbst, sondern die Wahrscheinlichkeitsverteilungen $P(\Delta\phi)$ der Phasendifferenzen zu betrachten. Falls zwischen den Phasen der Oszillatoren Synchronisation besteht, so sind bestimmte Phasendifferenzen $\Delta\phi$ gegenüber anderen bevorzugt. Ihr Auftreten besitzt eine höhere Wahrscheinlichkeit. Somit existiert mindestens ein $\Delta\phi$, an dem $P(\Delta\phi)$ maximal wird. Sind die Phasen jedoch völlig unkorreliert, so ist $P(\Delta\phi)$ konstant. Da in dieser Arbeit stochastische Systeme untersucht werden, wird Synchronisation immer in diesem erweiterten Sinn verstanden.

Typische Beispiele für reale stochastische Systeme, in denen Phasensynchronisation auftritt, sind Muskelaktivitäten (gefunden mit magnetoenzephalographischen Untersuchungen) [97], Synchronisationseffekte des menschlichen Kreislaufsystems [98] oder die Funktionsweise der Elektrozepptoren des Polyodon

⁵Die Dynamik des zweiten Oszillators mit der Phase ϕ_2 kann auch als äußeres Signal interpretiert werden.

Spathula (Löffelstör – engl.: Paddle-fish) [99]. Oftmals führt Rauschen in Systemen mit gekoppelten Phasenoszillatoren zu einer Schwächung der Synchronisation und letztlich zu deren Unterdrückung.

Die weitergehende Untersuchung stochastischer dynamischer Systeme offenbarte, daß Rauschen nicht immer Synchronisationsphänomene unterdrückt. Oftmals kann für bestimmte intermediäre Bereiche der Rauschintensität eine Synchronisationsverstärkung beobachtet werden. Typische Beispiele für derartige rauschinduzierte Synchronisation gibt es in bistabilen Systemen [100, 101, 102, 103] und in anregbaren Medien [104, 105, 106]. Ähnliche Effekte sind kürzlich auch in Systemen mit Phasenoszillatoren gefunden worden [107, 108, 83, 109, 110].

Große Unterschiede in den Modellen gekoppelter Phasenoszillatoren bestehen in der Art und Wirkung der Kopplung. In den Modellen der Kapitel 3–6 ist diese Kopplung zum Teil verzögert. Derartige Delay-Zeiten können je nach dem betrachteten System gekoppelter Oszillatoren sowohl Synchronisation verursachen [111, 112] als auch unterdrücken [113, 114]. In den in Kapiteln 3-6 untersuchten Modellen spielen solche Delay-Zeiten ebenfalls eine große Rolle. Die dabei gefundenen Synchronisationsphänomene der Enzymzustände können je nach betrachteter Art der Kopplung durch Variation der Delay-Zeiten sowohl ausgelöst als auch unterdrückt werden.

Kapitel 2

Physikalische Eigenschaften von Enzymreaktionen

In diesem Kapitel wird ein Überblick über die wichtigsten Eigenschaften von Enzymen und enzymatischen Reaktionen gegeben. Zuerst erfolgt in Abschnitt 2.1 eine kurze Darstellung über das Vorkommen, die Funktion und die physikalischen Merkmale von katalytisch wirkenden Biopolymeren. Es werden darüber hinaus wichtige Vorstellungen zur Erklärung des katalytischen Prozesses diskutiert. Da für die folgenden Untersuchungen regulatorische Enzyme von besonderem Interesse sind, werden die verschiedenen Regulationsmechanismen, die bei der Enzymkatalyse auftreten können, kurz vorgestellt.

Im darauffolgenden Abschnitt 2.2 werden zwei wichtige Experimente beschrieben und diskutiert, in denen die internen Eigenschaften des molekularen Enzymzyklus untersucht wurden. Beiden Experimenten ist gemeinsam, daß es durch externe Beeinflussung gelingt, die Enzymzyklen der individuellen Enzyme in makroskopischen Reaktionssystemen zu synchronisieren. Diese externe Synchronisation ermöglicht Erkenntnisse über Konformationsänderungen und statistische Eigenschaften des katalytischen Prozesses. Die Kinetik dieser speziellen Reaktionssysteme, in denen mehr als 10^{10} Enzyme synchron operieren, kann mit den Modellen der klassischen Enzymkinetik nicht beschrieben werden.

Eine wichtige Besonderheit enzymatischer Reaktionen in lebenden Zellen sind die mikroskopischen Volumina, die zum Teil kleiner als $10^{-15}l$ sind. Daraus ergeben sich tiefgreifende Konsequenzen hinsichtlich der charakteristischen diffusionsabhängigen Durchmischungs- und Transportzeiten der an den Reaktionen beteiligten Moleküle. Im letzten Abschnitt 2.3 dieses Kapitels werden diese Zeiten für solche biochemischen Mikroreaktoren abgeschätzt und deren Einfluß auf die chemische Kinetik diskutiert. Es stellt sich heraus, daß unter den Bedingungen abgeschlossener Reaktionsvolumina mit der Längenausdehnung eines Mikrome-

ters oder weniger, ein enzymatisches Reaktionssystem andere Relationen der die Kinetik bestimmenden charakteristischen Zeiten aufweisen kann als in makroskopischen Reaktionssystemen. Besitzt ein Reaktionssystem derartige Eigenschaften soll es als molekulares Netzwerk bezeichnet werden.

2.1 Biopolymere als Katalysatoren

Struktur und physikalische Eigenschaften von Enzymen

Enzyme sind biologische Katalysatoren, die durch die Bindung der molekularen Ausgangsstoffe die Wahrscheinlichkeit für das Zustandekommen eines Reaktionsereignisses drastisch erhöhen können. Sie kommen in der lebenden Zelle in Konzentrationen zwischen 10^{-8} mol/l bis 10^{-4} mol/l vor [115].

In der physikalischen Chemie wird zur Klassifizierung oft zwischen homogener und heterogener Katalyse unterschieden. Bei der homogenen Katalyse befinden sich Substrat und Katalysator im gleichen Aggregatzustand, bei der heterogenen Katalyse hingegen in verschiedenen Aggregatzuständen meist mit festem Katalysator. Der Versuch, die Enzymkatalyse eindeutig einem dieser beiden Grundtypen zuzuordnen, ist schwierig. Einerseits sind bei Enzymreaktionen sowohl Substrat als auch Enzym in Wasser gelöst und befinden sich in derselben Phase. Andererseits besitzen alle Enzyme die Eigenschaft der Substratsättigung, die für die heterogene Katalyse typisch ist [116]. Man spricht deshalb manchmal bei Enzymreaktionen auch von mikroheterogener Katalyse [117].

Zur Zeit sind etwa 2000 verschiedene Enzyme bekannt. Der weitaus größte Teil sind Proteine, es gibt aber auch Enzyme, die aus RNA bestehen (Ribozyme). Neben den "klassischen" Enzymen, deren Funktion ausschließlich in der Katalyse chemischer Reaktionen in der lebenden Zelle besteht, sind in jüngerer Zeit Proteine mit enzymatischen Eigenschaften gefunden worden, die bis dahin mit anderen Funktionen in Zusammenhang gebracht wurden. Dazu zählen Antikörper des Immunsystems mit katalytischen Eigenschaften [118, 119] und Zytokine – Makromoleküle zur interzellulären Signalübertragung – die ebenfalls chemische Reaktionen katalysieren können [120].

Neben der strukturellen und funktionellen Vielfalt der Enzyme können auch hinsichtlich der Größe und des Molekulargewichts erhebliche Unterschiede bestehen. Beispielsweise hat die Ribonuklease eine relative Molekülmassenzahl¹ von 13000 während die Ribulose 1,5-bisphosphat carboxylase eine von etwa 500000 besitzt. Oft ist es so, daß Enzyme aus katalytisch aktiven identischen Unterein-

¹Dimensionslose Zahl, die angibt, wieviel mal größer die Ruhemasse des betreffenden Moleküls als 1/12 der Ruhemasse von Kohlenstoff C-12 ist. Bei Proteinen ist dieser Wert - wie auch andere physikalische Eigenschaften - vom Herkunftsorganismus abhängig.

heiten bestehen. Auch Multienzymkomplexe aus mindestens zwei verschiedenen Enzymen können gebildet werden, die aufeinanderfolgende chemische Reaktionen katalysieren können und durch die kurzen räumlichen Entfernungen der aktiven Zentren die mittlere Zeit zwischen zwei Reaktionsereignissen verkürzen.

Noch größere Unterschiede bestehen hinsichtlich der Wechselzahl (Turnover-Zahl). Diese gibt die maximale Zahl der Substratmoleküle an, die von einem Enzymmolekül pro Zeiteinheit in Produktmoleküle umgewandelt werden können. Das Reziproke dieser Größe ergibt die Zeit, die im Mittel für ein einzelnes Reaktionsereignis benötigt wird. Diese Zeit wird Turnover-Zeit genannt. In Tabelle 2.1 sind für verschiedene Enzyme die Wechselzahl und typische relative Molekülmassenzahlen dargestellt [121, 122, 115]. Die Turnover-Zahlen und Molekülmassen in Tabelle 2.1 sind als Richtwerte zu verstehen. Es kann Unterschiede innerhalb eines Organismus geben, die durch Mutationen bedingt sind. Noch größer sind die Schwankungen zwischen Enzymen aus verschiedenen Organismen. Die Wechselzahl variiert über einen Bereich von sechs Zehnerpotenzen.

Tabelle 2.1: Wechselzahl und relative Molekülmassenzahl für verschiedene Enzyme

| Enzym | Wechselzahl in s^{-1} | Molekülmassenzahl |
|------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| Carboanhydrase | 600000 | $2.8 \cdot 10^4 - 3 \cdot 10^4$ |
| Acetylcholinesterase | 25000 | $26 \cdot 10^4 - 33 \cdot 10^4$ |
| Penicillinase | 2000 | $1.24 \cdot 10^4 - 4.9 \cdot 10^4$ |
| Lactat-Dehydrogenase | 1000 | $1 \cdot 10^5 - 1.5 \cdot 10^5$ |
| α -Chymotrypsin | 100 | $2.5 \cdot 10^4$ |
| Phosphofruktokinase | 100 | $14 \cdot 10^4$ |
| Tryptophan-Synthetase | 2 | $19.5 \cdot 10^4$ |
| Lysozym | 0.5 | $1.4 \cdot 10^4 - 1.8 \cdot 10^4$ |

Die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit bei enzymatisch katalysierten Reaktionen im Vergleich zu nicht-katalysierten Reaktionen liegt wenigstens bei einem Faktor von 10^6 , kann aber auch bis zu 10^{20} mal höher sein als im Fall der unkatalysierten Reaktion [117, 115]. Diese Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit wird, im Gegensatz zu verschiedenen technisch genutzten nichtenzymatischen Katalysatoren, die meist deutlich höhere Temperaturen benötigen, bereits kurz oberhalb der Zimmertemperatur erreicht. Das Temperaturoptimum der meisten enzymatisch katalysierten Reaktionen liegt etwa bei 50°C (mit Ausnahme von Enzymen aus thermophilen Organismen). Oberhalb dieser Temperatur kommt es zur Denaturierung der Proteine.

Wie alle Katalysatoren beschleunigen Enzyme die Einstellung des chemischen Gleichgewichts durch gleichzeitige Beschleunigung der Hin- und Rückreaktion,

verschieben dieses aber nicht. Neben der Temperatur haben verschiedene aktivierende oder inhibierende Moleküle, die Ionenkonzentrationen verschiedener Salze und der pH-Wert der Lösung entscheidenden Einfluß auf die enzymatische Aktivität [115].

Meistens beschränken sich die katalytischen Fähigkeiten eines bestimmten Enzyms auf die Katalyse einer einzigen chemischen Reaktion. Diese hohe Spezifität und der hohe Beschleunigungsfaktor unterscheiden Enzyme deutlich von anderen technisch genutzten Katalysatoren [117, 115]. Für die Modellierung enzymatischer Reaktionen können deshalb enzymatisch beschleunigte Nebenreaktionen, die möglicherweise durch ein Enzym katalysiert werden könnten, meist vernachlässigt werden.

Verschiedenen Forschergruppen ist es gelungen, Enzyme synthetisch nachzubilden [123, 124]. Dazu werden beispielsweise Komplexverbindungen in Lipidmembranen eingebaut, die dort ihre katalytischen Fähigkeiten entfalten können.

Der katalytische Prozeß

Da die Enzyme unverändert aus dem katalytischen Prozeß zurückkehren, ist die direkte Beobachtung der Vorgänge während der Katalyse schwierig. Allerdings kann die Wirkung der Enzyme in Form der neu entstandenen Reaktionsprodukte aus den vorher vorhandenen Ausgangsstoffen direkt nachgewiesen werden. Zwei interessante Experimente, die Erkenntnisse über die internen Vorgänge während des enzymatischen Prozesses liefern, werden in Abschnitt 2.2 diskutiert.

Es gibt verschiedene Modelle und Theorien zur Erklärung der Kinetik der Enzymkatalyse [125]. Im Folgenden soll die Theorie des Übergangszustands [126] ("transition state theory") kurz vorgestellt werden. Bei dieser Theorie wird aus der Enzympopulation im Grundzustand² und den Enzymen im instabilsten und entlang der Reaktionskoordinate energetisch am höchsten gelegenen Übergangszustand (Abb. 2.1) die Enzymkinetik bestimmt.

Um zu verstehen, wie es Enzymen gelingt, den Ablauf chemischer Reaktionen zu beschleunigen, soll zuerst kurz auf den Verlauf der unkatalysierten Reaktion eingegangen werden. Betrachtet man die Reaktion $S \rightarrow P$ der Umwandlung eines Substratmoleküls in ein Produktmolekül, so erkennt man (Abb. 2.1), daß zuerst ein freies Substratmolekül vorliegt, das im Verlauf einen energetisch höher gelegenen Übergangszustand einnimmt.

Nachdem das Energiemaximum überschritten wurde, befindet sich am Ende der Reaktion das Produktmolekül energetisch in einem niedrigeren Zustand als das System im Übergangszustand. Der Energieunterschied zwischen der Freien Enthalpie des Ausgangszustandes und dem Zustand maximaler Freier Enthal-

²Zustand, in dem ein Enzym noch kein Substratmolekül gebunden hat, dazu aber in der Lage wäre.

pie des Übergangszustandes wird als Freie Aktivierungsenergie ΔG_0^\ddagger bezeichnet. Enzyme, wie Katalysatoren im allgemeinen, können diese Aktivierungsenthalpie reduzieren und dadurch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der chemischen Reaktion drastisch erhöhen. Der Verlauf der Reaktionsenthalpie bei der enzymatisch katalysierten Reaktion ist schematisch durch die gestrichelte Linie in Abb. 2.1 dargestellt.

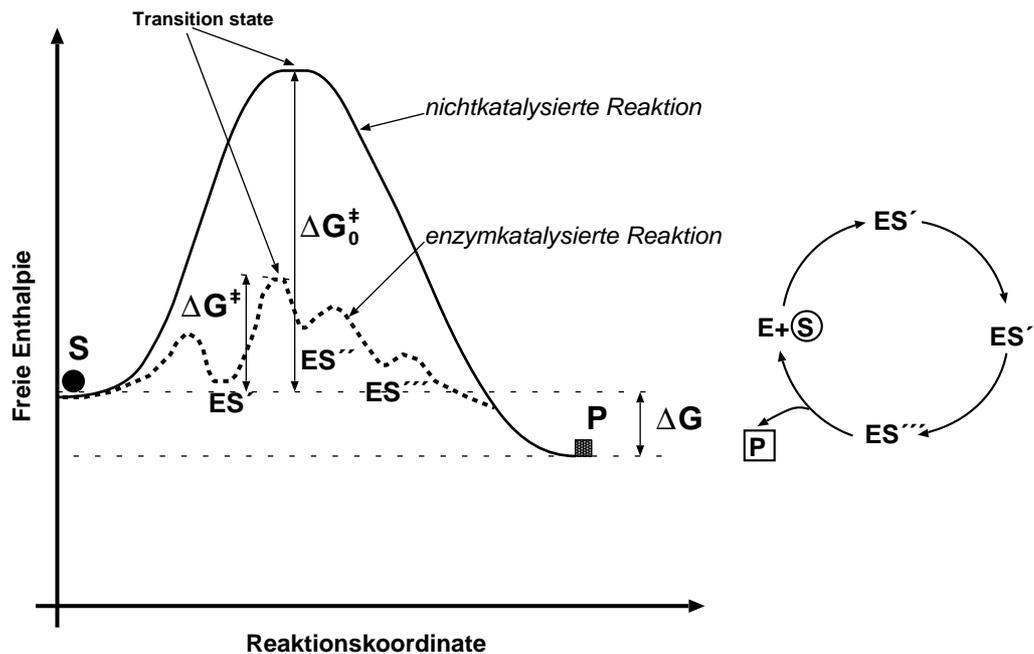


Abb. 2.1: Reaktionsdiagramm der Freien Enthalpie für eine nichtkatalysierte (durchgezogene Linie) und eine enzymkatalysierte Reaktion (gestrichelte Linie). Je tiefer der Einschnitt im Energieprofil der enzymatisch katalysierten Reaktion, desto stabiler ist das betreffende Zwischenprodukt. Rechts ist der katalytische Zyklus schematisch dargestellt [127]. Durch die Wirkung des Enzyms wird die Freie Aktivierungsenergie ΔG_0^\ddagger auf ΔG^\ddagger verringert.

Beim katalytischen Prozeß können verschiedene Teilschritte unterschieden werden. Zuerst bildet sich ein Enzym-Substrat-Komplex ES durch die Bindung des Substratmoleküls S an das Enzym. Danach können sich aktivierte Zwischenzustände (in der Abb. 2.1 durch ES' , ES'' und ES''' dargestellt) bilden. Im Verlauf der Reaktion kommt es zur Entstehung und Dissoziation des Reaktionsprodukts und der Rückkehr des Enzyms in den Ausgangszustand, der in Zukunft auch Grundzustand des Enzyms genannt wird. Der gesamte katalytische Prozeß eines einzelnen molekularen Enzymzyklus ist als Kreisprozeß interpretierbar, aus dem das Enzym unverändert hervorgeht.

Obwohl die bisherige Beschreibung der Wirkungsweise eines Enzyms unter

Annahme metastabiler Zustände sehr anschaulich ist, muß ihr Modellcharakter betont werden. Die Theorie des Übergangszustands liefert eine Erklärung für die katalytische Wirkung der Enzyme und gestattet auch die Abschätzung von Reaktionsraten, läßt aber Fragen hinsichtlich der Eigenschaften des katalytischen Zyklus offen. Eine wichtige Erweiterung der Theorie der Enzymkatalyse erfolgt durch die Einbeziehung der experimentell beobachteten Konformationsänderungen des Enzyms während des molekularen Enzymzyklus. Diese Konformationsänderungen der Proteinstruktur scheinen für die Funktionsweise des Enzyms essentiell zu sein.

Ein Enzym ist ein heteropolymeres Makromolekül, das im Verlauf der enzymatischen Katalyse Konformationsänderungen erfährt. Deren vollständige Dynamik ist durch ein gekoppeltes System von Bewegungsgleichungen für die einzelnen Monomere, aus denen sich das Enzym zusammensetzt, gegeben. Eine direkte numerische Integration dieser Bewegungsgleichungen wäre so rechenzeitaufwendig, daß diese gegenwärtig nicht einmal für den Bruchteil eines enzymatischen Turnover möglich ist. Um trotzdem die Dynamik eines Enzyms während des enzymatischen Turnover zu erfassen, sind deshalb Näherungen erforderlich. Konformationsänderungen und Relaxationsprozesse von Proteinen wurden sowohl für Proteinfaltungsprozesse [128, 129, 130, 131, 30] als auch für die während der biologischen Funktion auftretenden Strukturveränderungen eingehend untersucht [132, 133]. Oft können diese Vorgänge als dynamischer Prozeß entlang einer internen Reaktionskoordinate angenähert werden [134, 135, 136, 137]. Wendet man dieses Konzept auf die Konformationsänderungen während der Enzymkatalyse an, so kann man einen einzelnen Enzymzyklus als Bewegung entlang einer kontinuierlichen Phasenkoordinate beschreiben.

Vergleicht man diese Erkenntnisse mit der schematischen Darstellung in Abb. 2.1, so finden sich dort nur wenige metastabile Zwischenzustände, die durch Energiebarrieren getrennt sind. In diesem Fall besteht der enzymatische Zyklus aus nacheinanderfolgenden diskreten Zuständen, zwischen denen mit einer von der Höhe der jeweiligen Energiebarriere abhängigen Wahrscheinlichkeitsrate Übergänge stattfinden. Bezieht man hingegen die während der Katalyse ablaufenden Konformationsänderungen mit ein, so ähnelt der dynamische Prozeß des enzymatischen Zyklus eher einem Diffusions-Drift-Prozeß in einem hochdimensionalen Zustandsraum, der wie im Fall der Proteinfaltung durch einen Diffusions-Drift-Prozeß entlang einer eindimensionalen Reaktionskoordinate angenähert wird [138, 134, 139, 136].

Eng verwandt mit der Betrachtung des enzymatischen Turnover-Zyklus als Diffusions-Drift-Prozeß entlang einer Reaktionskoordinate ist das Relaxationskonzept enzymatischer Reaktionen [140, 141, 29, 142]. Es geht von der Annahme aus, daß der katalytische Zyklus durch Relaxationen des Proteins aus dem Nichtgleichgewichtszustand, in dem es durch die Bindung des Substratmoleküls

gekommen ist, in den Gleichgewichtszustand angetrieben wird. Diese Situation ist in Abb. 2.2 graphisch dargestellt.

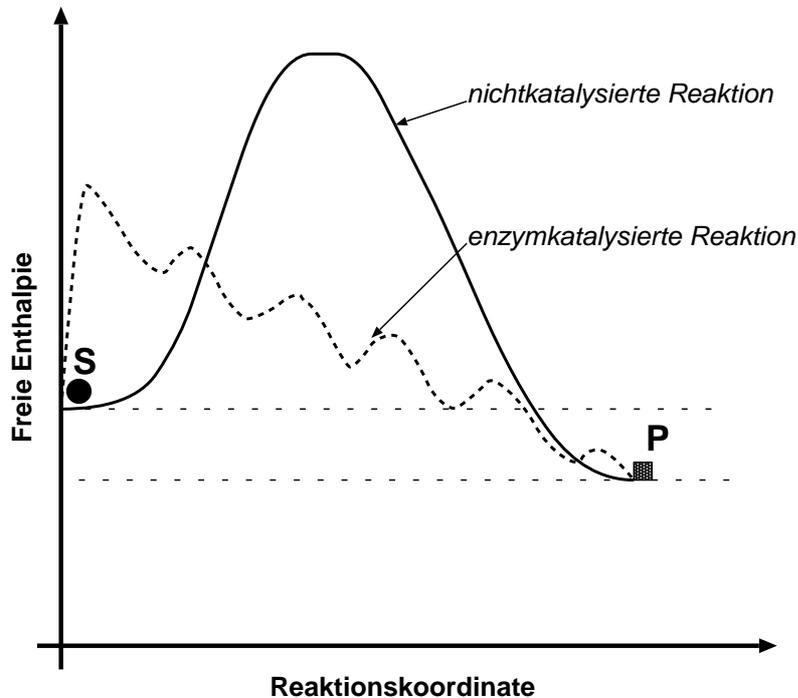


Abb. 2.2: Energieprofil als Funktion der Reaktionskoordinate, die zu einer der möglichen Trajektorien der enzymkatalysierten Reaktion $S \rightarrow P$ gehört (nach [29]).

Regulatorische Enzyme

Eine wichtige Eigenschaft vieler Enzyme ist die Abhängigkeit ihrer enzymatischen Aktivität von anderen Molekülen. Es gibt sowohl aktivierend als auch inhibierend wirkende Stoffe (Aktivatoren bzw. Inhibitoren). Im Fall der Inhibierung unterscheidet man zwischen der reversiblen und irreversiblen Hemmung. Auf die irreversible Hemmung, die meist durch kovalente Bindung des Inhibitors an eine wichtige funktionelle Gruppe zustande kommt, soll hier nicht weiter eingegangen werden. Der Inhibitor wirkt in diesem Fall praktisch als Gift.

Meist wird zwischen Hemmung der Enzymaktivität und der eigentlichen Enzymregulation, die sowohl inhibitorisch als auch aktivierend sein kann, unterschieden [117, 127]. Es werden vier Hemmungsmechanismen unterschieden: kompetitive und nicht-kompetitive Hemmung, unkompetitive Hemmung sowie allosterische Hemmung³.

³Der Begriff "Allosterie" soll die räumlich von der Substratbindungsstelle getrennte Bindung

Bei der kompetitiven Hemmung kann das Inhibitor-molekül *I* an derselben Bindungsstelle wie das Substratmolekül binden und steht damit in direkter Konkurrenz zu diesem. Bei der nicht-kompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor in der Nähe der Substratbindungsstelle. Das Substratmolekül kann zwar noch an das Enzym binden, die weitere katalytische Umsetzung des Substrats in das Produktmolekül ist jedoch gestört. Bei der unkompetitiven Hemmung bindet ein bereits vorhandener *ES*-Komplex das Inhibitor-molekül. Es entsteht also ein *ESI* Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex, der nicht weiter reagiert.

Die allosterische Hemmung ist wie auch die allosterische Aktivierung ein typischer Regulationsmechanismus in metabolischen Ketten. Allosterische Enzyme, von denen es etwa hundert gibt [145], besitzen die Eigenschaft, in mehreren stabilen Konformationen existieren zu können. Mit jeder Konformation sind charakteristische chemische Eigenschaften verbunden wie z.B. eine bestimmte Enzymaktivität. Es ist möglich, daß ein Protein von einem stabilen Konformationszustand in einen anderen stabilen Konformationszustand übergeht. Damit sind auch Veränderungen der chemischen Eigenschaften verknüpft. Ausgelöst werden solche Übergänge meist durch nicht-kovalente Bindung eines regulatorischen Moleküls an das Protein, weit entfernt von der Bindungsstelle der Substratmoleküle.

Neben der allosterischen Regulation der Enzymaktivität wird die Aktivität mancher Enzyme auch durch kovalente Modifikation ihrer Strukturen erreicht. Diese Modifikationen der Enzymstruktur werden durch andere Enzyme katalysiert. Vor allem die Übertragung von Phosphat- (Phosphorylierung) und Adenylgruppen (Adenylierung) sind dabei von besonderer Bedeutung [127, 146].

In dieser Arbeit spielt die Kinetik regulatorischer Enzyme eine große Rolle. Wegen ihrer weiten Verbreitung und großen Bedeutung bei der Regulation von Stoffwechselfvorgängen werde ich mich dabei auf allosterische Aktivierung und Inhibierung beschränken. Deshalb werden im Folgenden noch die beiden wichtigsten Modelle der allosterischen Regulation genauer vorgestellt.

Zwei einfache Modelle zur Erklärung des Mechanismus der allosterischen Kooperativität

Allosterische Enzyme besitzen mindestens zwei räumlich getrennte Bindungsstellen, eine für das Substratmolekül und die andere für einen Effektor. Das Enzym kann sich in zwei Konformationszuständen, dem aktiven R-Zustand (R=relaxed) und dem inaktiven T-Zustand (T=tensed) befinden. Das Substrat kann leichter an die R-Form als an die T-Form binden. Hat ein aktivierend wirkender Effektor an das Enzym gebunden, so wird die R-Form stabilisiert. Bindet ein inhibierend wirkender Effektor an das Enzym, so wird hingegen die T-Form stabilisiert. Ist

des Effektors hervorheben und wurde nach Aussage von J.-P. Changeux [143] im Zusammenhang mit der Veröffentlichung [144] eingeführt.

dieser Effektor ebenfalls das Substratmolekül, spricht man von homotroper Regulation. Handelt es sich bei dem Effektor um das Molekül einer anderen Art, liegt heterotrope Regulation vor.



Abb. 2.3: Zwei verschiedene Konformationen der Phosphofruktokinase. Links befindet sich das Enzym im aktivierten (R-Zustand) [147] rechts im inhibierten (T-Zustand) Zustand [148].

Das klassische Beispiel eines homotrop allosterischen Proteins ist das Hämoglobin, bei dem die Anlagerung von Sauerstoff die Fähigkeit zu weiterer Sauerstoffbindung erhöht. Beispiel eines heterotropen allosterischen Enzyms ist die Phosphofruktokinase. Es steuert durch seine regulatorischen Eigenschaften Teile des Kohlenhydratstoffwechsels. Dabei besteht für dieses Enzym sowohl die Möglichkeit der Inhibierung (durch Anlagerung von Adenosintriphosphat an spezielle Bindungsstellen dieses Enzyms) als auch die Möglichkeit der Aufhebung dieser Inhibierung (durch Adenosinmonophosphat). Das Verhältnis von ATP/AMP bestimmt so die Enzymaktivität. In Abb. 2.3 (links) ist als Beispiel für die verschiedenen Konformationen eines allosterischen Enzyms die aktive R-Form und in Abb. 2.3 (rechts) die inaktive T-Form der Phosphofruktokinase abgebildet.

Das erste Modell zur Erklärung des allosterischen Mechanismus stammt von J. Monod, J. Wyman und J.-P. Changeux [144]. Dieses Modell geht davon aus, daß das Enzym mindestens zwei identische Untereinheiten besitzt, an die jeweils ein Substratmolekül bzw. regulatorisches Molekül binden kann. Die Besonderheit dieses Modells besteht darin, daß Konformationsänderungen und damit Übergänge zwischen R- und T-Zustand und umgekehrt gleichzeitig erfolgen. Aus diesem Grund wird dieses Modell auch Symmetriemodell oder "Alles-oder-

Nichts-Modell" bezeichnet. Diese Situation ist für die homotrope Regulation in

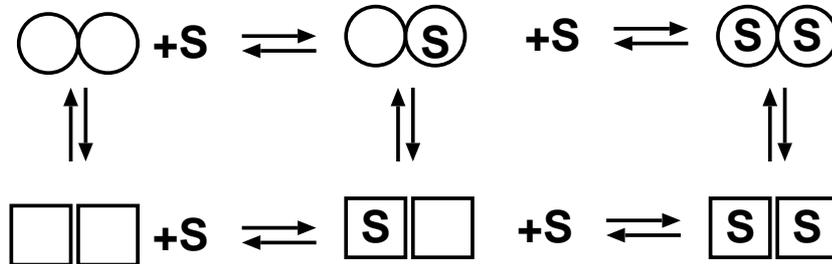


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Symmetriemodells für homotrope Regulation. Kreise symbolisieren Untereinheiten im R-Zustand, Quadrate im T-Zustand. Übergänge vom R- in den T-Zustand und umgekehrt können nur beide Untereinheiten gleichzeitig vollführen. Die Übergangsrate hängt von der Zahl der gebundenen Substratmoleküle ab. Da zwei Untereinheiten vorhanden sind, gibt für den Fall eines einzigen gebundenen Substratmoleküls zwei mögliche Konfigurationen. Es ist aber nur eine graphisch dargestellt.

Abb. 2.4 schematisch dargestellt.

Ein zweites wichtiges Modell zur Beschreibung der Allosterie ist das sogenannte sequentielle Modell. Es wurde von Koshland, Nemethy und Filmer in [149] vorgeschlagen. Beim sequentiellen Modell zur Erklärung allosterischer Kooperativität sind Untereinheiten mit freien Bindungsstellen stets im T-Zustand zu finden. Die Bindung eines Effektors an eine Untereinheit führt zu einem Übergang dieser Untereinheit, aber auch nur dieser Untereinheit, in den R-Zustand (siehe Abb. 2.5). Zusätzlich können Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten des Proteins existieren. Durch diese Wechselwirkungen können Konformationsänderungen einer Untereinheit die Substratbindungsaffinität einer anderen Untereinheit beeinflussen.



Abb. 2.5: Schematische Darstellung des sequentiellen Modells für homotrope Regulation. Bezeichnungen entsprechen denen in Abb. 2.4. Im Gegensatz zum Symmetriemodell können die Untereinheiten in verschiedenen Konformationen vorliegen. Wie in Abb. 2.4 wurde bei einem einzigen gebundenen Substratmolekül nur eine der beiden möglichen Konfigurationen abgebildet.

Beide Modelle bilden, wie Eigen in [150] betont, jeweils den Grenzfall eines allgemeineren Modells. In diesem allgemeinen Modell gibt es auch Übergänge zwischen R- und T-Zuständen von Untereinheiten, die weder, wie beim sequentiellen Modell durch Effektorbindung verursacht werden, noch wie bei Symmetriemodell alle Subunits gleichzeitig betreffen müssen [125]. Bei Enzymreaktionen

findet sich sehr oft heterotrope Allosterie. Bei dieser Form wird der Zustand der enzymatischen Untereinheiten durch Bindung von Effektoren beeinflusst die keine Substratmoleküle sind.

2.2 Konformationsänderungen und Enzymkinetik

Die klassische Michaelis-Menten Kinetik und erweiterte Modelle, die das enzymatische Reaktionssystem durch eine bestimmte Anzahl diskreter Zustände charakterisieren, zwischen denen, definiert durch Ratenkonstanten, Übergänge erfolgen, sind zur Beschreibung vieler Enzymreaktionen sehr erfolgreich. Allerdings handelt es sich um Modelle, deren wesentlichste Approximation in der Postulierung der Existenz solcher diskreter Zustände besteht. Inzwischen ist allgemein akzeptiert [151, 115], daß der überwiegende Teil der Enzyme im Verlauf eines enzymatischen Turnover charakteristische Konformationsänderungen der Proteinstruktur durchläuft. Diese Konformationsänderungen benötigen charakteristische Zeiten und können als Diffusions-Drift-Prozeß angenähert werden [136]. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse zwei verschiedener Experimente vorgestellt, die die Bedeutung dieser Konformationsänderungen für die enzymatische Katalyse zeigen und im Widerspruch zur klassischen Enzymkinetik stehen. Typisch für beide Experimente ist, daß sich das System nicht im thermodynamischen Gleichgewicht befindet.

Untersuchung des enzymatischen Zyklus der Malatdehydrogenase

In diesem Abschnitt werden experimentelle Ergebnisse der Untersuchung des enzymatischen Turnover der Malatdehydrogenase mit Hilfe einer "Stopped-Flow-Apparatur" vorgestellt. Bei dieser Methode werden Substratmoleküle, Coenzyme und Enzyme innerhalb kurzer Zeit gemischt, so daß die Reaktion erst nach einem klar definierten Zeitpunkt ablaufen kann. Kurz nach der Durchmischung befindet sich das Reaktionssystem fernab vom chemischen Gleichgewicht, da praktisch noch keine Reaktionsprodukte vorhanden sind. Diese relaxationskinetische Untersuchungsmethode [152] wird sehr häufig zum Studium enzymatischer Vorgänge insbesondere zur Identifizierung intermediärer Prozesse verwendet.

P. Pleshanov und L.A. Blumenfeld führten "Stopped-Flow Messungen" mit der Malatdehydrogenase (MDH) durch [153, 154], die die Reaktion



katalysiert. Die Turnover-Zeit der Hinreaktion betrug unter den gewählten Bedingungen 10.9ms und die der Rückreaktion 2.6ms . Enzyme, Coenzyme und

Substrate wurden, wie eingangs beschrieben, innerhalb kurzer Zeit gemischt (Totzeit der Apparatur 1.2 – 1.5ms) und damit die Reaktion initialisiert. Die Konformationsänderungen der aktiven Enzyme im Verlauf des Turnover-Zyklus wurden durch Messung der mittleren Lebensdauer $\bar{\tau}_f$ der intrinsischen Tryptophan Fluoreszenz bestimmt⁴.

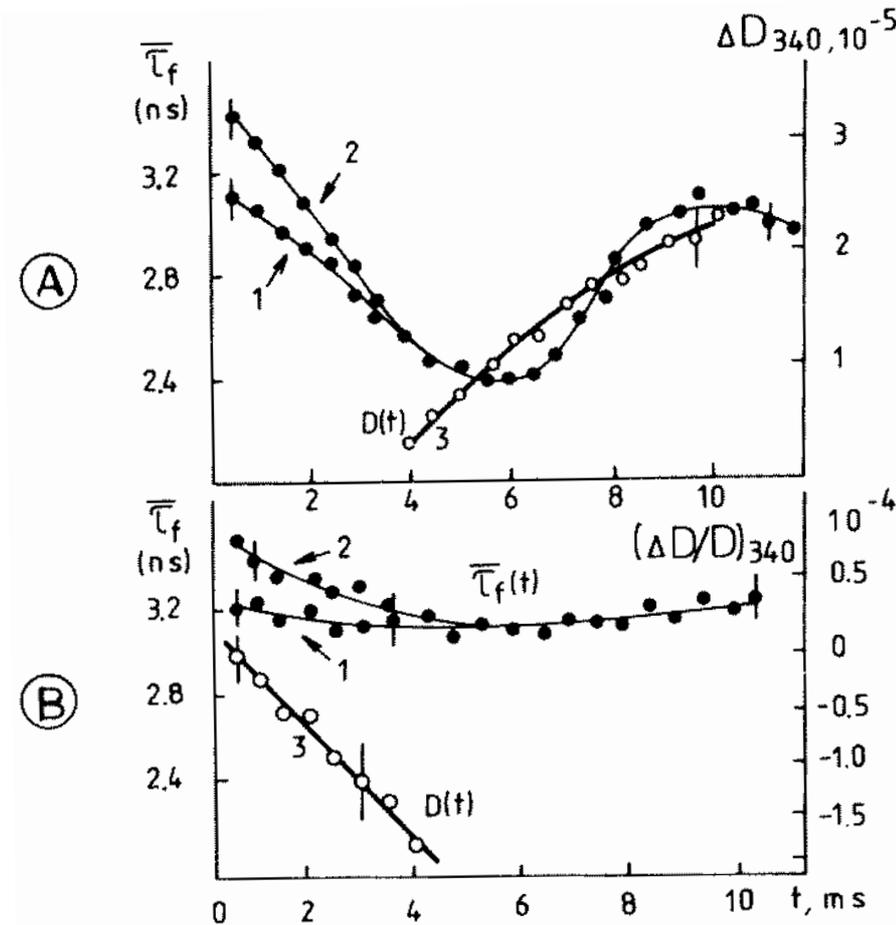


Abb. 2.6: "The time-courses for tryptophane fluorescence parameters $\bar{\tau}_f$ and NAD⁺ reduction (A) or NADH oxidation (B) reactions catalyzed by malatedehydrogenase" Abbildung und Bildunterschrift aus [29] S. 107

Im Abstand von 0.5ms ab Reaktionsinitialisierung wurde das Enzymsystem periodisch angeregt (Laserpulse: $\lambda = 297nm$ $\tau_{pulse} \approx 2ps$) und $\bar{\tau}_f$ gemessen.

⁴Tryptophan ist eine Aminosäure, die in Abhängigkeit ihrer Umgebung eine charakteristische Fluoreszenzlebensdauer von optischen Anregungszuständen besitzt. Bei der Malatdehydrogenase befindet sich diese Aminosäure in der Nähe der Substratbindungsstelle.

Parallel wurde durch Absorptionsmessungen die Konzentration des Coenzym NADH bestimmt⁵.

Die Meßergebnisse sind in Abb. 2.6 dargestellt. Abb 2.6a zeigt die mittlere Fluoreszenzlebensdauer und die Absorptionsintensität von NADH im Verlauf der Hinreaktion von L-Malat zu Oxalacetat. Es ist deutlich erkennbar, daß der strukturabhängige Parameter $\bar{\tau}_f$ zu Beginn des Turnover-Zyklus abnimmt, um bei etwa 6ms ein Minimum zu erreichen. Danach steigt dieser Wert wieder an, um nach 10 – 11ms etwa den Ausgangswert kurz nach der Initialisierung der Reaktion anzunehmen. Anschließend fällt $\bar{\tau}_f$ erneut. Im Gegensatz dazu zeigt der Verlauf von $\bar{\tau}_f$ bei der Rückreaktion von Oxalacetat zu L-Malat, der in Abb 2.6b dargestellt ist, keine so starke Abnahme von $\bar{\tau}_f$. L.A. Blumenfeld und P. Pleshanov schließen daraus, daß die Konformationsänderungen des Enzyms im Verlauf der Hinreaktion von denen der Rückreaktion verschieden sind. Neben dieser wichtigen Erkenntnis sieht man in Abb 2.6a, daß die durch die schnelle Mischung von Substrat und Enzym initialisierten Turnover-Zyklen nahezu synchron ablaufen.

Im Zusammenhang mit den in [153, 154] präsentierten Ergebnissen dieser "Stopped-Flow Untersuchungen" wurden durch V.B. Polyakov, N.N. Kharlashina und E.M. Galimov in [155] Computersimulationen einer Mehrstufenenzymreaktion veröffentlicht, die die Möglichkeit verschieden verlaufender Fluoreszenzlebensdauerkurven für die Hin- und Rückreaktion bei ansonsten gleichen Reaktionsschritten zeigen sollten. In [156] wiesen L.A. Blumenfeld und P. Pleshanov allerdings auf mehrere schwerwiegende Fehler in [155] hin, die diese Arbeit wieder in Frage stellen.

Externe Synchronisation des Cytochrom P-450 Enzymsystems

In [157] fanden H. Gruler und D. Müller-Enoch eine lichtinduzierte Aktivierbarkeit des Cytochrom P-450 Monooxygenase Systems. Während folgender experimenteller Untersuchungen [40, 39] gelang es den Autoren unter Ausnutzung der Lichtsensitivität dieses Enzymsystems, die Enzymzyklen verschiedener Enzyme zu synchronisieren. Dazu wurde im Reaktionsgefäß die Konzentration der Reaktionsprodukte kontinuierlich bestimmt. Ohne sonstige Beeinflussung steigt die Konzentration der Reaktionsprodukte stetig an. Wird das Reaktionsgefäß hingegen periodisch für die Dauer von 0.1s beleuchtet, steigt, wie in Abb. 2.7 dargestellt ist, die Konzentration der Reaktionsprodukte stufenförmig an.

Die Autoren schließen daraus, daß die Enzyme im unbeleuchteten Zustand unkorreliert Enzymzyklen ausführen, während durch die periodische äußere Anregung diese Zyklen synchronisieren und dadurch die Reaktionsprodukte nur zu

⁵Die beiden an der Reaktion beteiligten Coenzyme NAD^+ und NADH weisen unterschiedliche Absorptionsspektren auf. NADH absorbiert bei $\lambda = 340\text{nm}$ sehr stark.

bestimmten Zeiten freigesetzt werden. Auch nachdem die periodische Beleuchtung gestoppt wird, operieren die Enzyme weiter in Phase, was im stufenförmigen Anstieg der Reaktionsprodukte erkennbar ist. Die Stärke der Synchronisation hängt entscheidend von der gewählten Periode der Beleuchtungsintervalle ab. Sie erreicht ein Maximum, wenn diese Periode etwas kürzer als die Turnover-Zeit von $\tau = 1.54s$ gewählt wird. Unter optimalen Bedingungen sind die Phasenzustände von über 80% aller Enzyme synchronisiert.

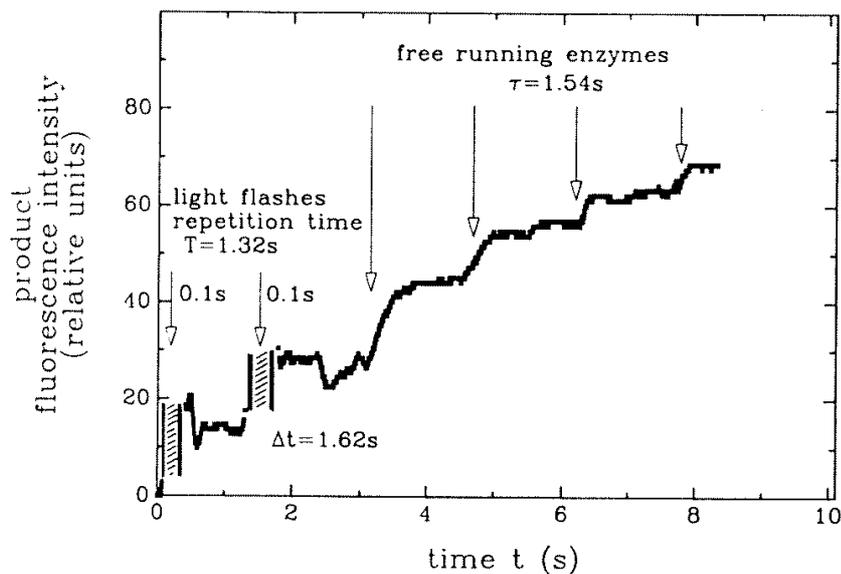


Abb. 2.7: "Effect of periodically (1.32s) applied short light pulses (0.1s, 390 – 460nm, 0.27J/nmolP-450) on product formation for 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity produced by a reconstituted P-450 II B1: NADPH-P-450 reductase complex. The product concentration (7-hydroxycoumarin) in the test tube increases in a step like manner before and after the last light flash. The arrows (above 2s) represent the location of the step-like product formation in the case of coherent working enzyme complexes" Abbildung und Bildunterschrift aus [39].

Die experimentelle Synchronisation von Enzymzuständen ermöglicht die Beobachtung der Eigenschaften des Enzymzyklus. So wurde herausgefunden, daß die synchronisierten Enzymzyklen auch ohne äußere Beeinflussung diesen Zustand für mehrere enzymatische Turnover beibehalten. In Abb. 2.7 ist die stufenförmige Freisetzung der Reaktionsprodukte noch nach 4 Zyklen deutlich erkennbar. Das läßt den wichtigen Schluß zu, daß die Schwankungsbreite der Turnover-Zeit kleiner als 20% ist.

Diese Eigenschaften können mit den klassischen Vorstellungen der Enzymkinetik, nicht erklärt werden. In [41] untersuchten deshalb M. Schienbein und M. Gruler ein kinetisches Modell, das den enzymatischen Prozeß durch einen

Diffusions-Drift-Prozeß annähert.

Weitere Untersuchungen zur Dynamik und Konformationsänderung von Proteinen

Enzyme sind, wie bereits diskutiert wurde, Heteropolymere. Ihre katalytischen Eigenschaften hängen direkt mit den Konformationsänderungen während des enzymatischen Zyklus zusammen [30]. Gegenwärtige theoretische Untersuchungen [158, 134, 159, 160, 136, 161] solcher dynamischer Prozesse in Heteropolymeren zeigen, daß Konformationsänderungen kinetische Vorgänge sind, die Millisekunden oder länger dauern können.

Allerdings sind wesentliche Aspekte der Dynamik von Proteinen im Verlauf ihres "Funktionierens" noch unklar. Während bei einfachen chemischen Mechanismen eindeutig festgelegte Reaktionswege mit einigen wenigen Zuständen diese gut annähern, ist es noch nicht geklärt, ob solche eindeutigen Reaktionswege für Proteine existieren. Für eine vollständige Beschreibung müßte die Freie Enthalpie der Zustände des Proteins als Funktion der Koordinaten seiner (mehreren tausend) Atome untersucht werden. Es stellt sich nun die Frage, ob die Trajektorien, die den Verlauf der Konformationsänderungen in diesem hochdimensionalen Raum beschreiben, bei Wiederholung des Prozesses, eng beieinander liegen oder stark voneinander abweichen.

Diese Fragestellung wurde erstmals von Levinthal diskutiert [162], der betonte, daß bereits eine Polypeptid-Kette mit nur 100 Aminosäuren prinzipiell in 10^{30} verschiedenen Konformationen vorliegen kann. Unter diesen Bedingungen ist es zunächst schwer vorstellbar, daß ein Protein einen bestimmten Konformationszustand in wenigen Millisekunden finden kann und das jeweils in nahezu derselben Weise. In diesem Zusammenhang war auch die Erkenntnis wichtig, daß Proteine und Spinglas-Systeme eine wichtige Gemeinsamkeit, nämlich die Existenz einer großen Zahl von Zuständen, aufweisen, die sich energetisch nur geringfügig unterscheiden [158, 163, 160].

Allerdings ergab die Untersuchung natürlicher Proteinsequenzen oder speziell ausgewählter Sequenzen, daß für diese nur ein Zustand dominierend ist. Dieser liegt energetisch deutlich tiefer als die anderen Zustände [159]. Dadurch wird die aus Röntgenstrukturuntersuchungen schon länger bekannte Tatsache erklärbar, daß Proteine oft in einer Konformation vorliegen. Die Eigenschaft von natürlichen oder speziell selektierten Heteropolymeren wird auch als "principle of minimal frustration" [164] bezeichnet. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wird beispielsweise das Energieprofil, das bei der Proteinfaltung eine Rolle spielt, als Trichter angenommen [165].

2.3 Enzymreaktionen in kleinen Raumbereichen

Lebende Zellen werden in drei Gruppen die Prokaryonten, Archaea und die Eukaryonten eingeteilt. Beispiele für Prokaryonten sind einzellige Mikroorganismen wie Eubakterien oder Blaualgen. Sie sind evolutionsgeschichtlich älter als Eukaryonten. Prokaryonten und Archaea besitzen im Gegensatz zu Eukaryonten keine ausgeprägten Substrukturen und sind meist sehr kleine Zellen (ein bis einige Mikrometer Ausdehnung).

Eukaryonten hingegen sind mit einem 100 bis 10000fachen Volumen [166] deutlich größer als Prokaryonten und besitzen komplexe Substrukturen wie Zellkern, Lysosomen oder Mitochondrien. Diese relativ abgeschlossenen Zellkompartimente besitzen wiederum eine Ausdehnung, die meist im Bereich eines Mikrometers liegt. Sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten laufen die Stoffwechselforgänge also in Mikroreaktoren mit einem Volumen von wenigen Femtolitern ab. Es wird in diesem Abschnitt gezeigt werden, daß die "Winzigkeit" dieser Raumbereiche zu einer starken diffusiven Durchmischung führt. Diese kann die Ausbildung räumlicher Muster, wie sie beispielsweise in Reaktions-Diffusions-Systemen auftreten können [25, 63], verhindern [22, 24].

Zur Beschreibung der chemischen Kinetik in abgeschlossenen Raumbereichen spielen zwei charakteristische diffusionsabhängige Zeiten, die Durchmischungszeit und die Transit-Zeit, eine große Rolle. Die Durchmischungszeit t_{mix} ist die Zeitdauer, die vergeht, bis ein Molekül, nachdem es zuvor an einem bestimmten Ort freigesetzt wurde, mit etwa gleicher Wahrscheinlichkeit überall im Raumbereich des Mikroreaktors vorgefunden werden kann. Die Transit-Zeit $t_{transit}$ ist die mittlere Zeit, die ein Molekül benötigt, um eines von N "Zielmolekülen"⁶ zu treffen.

Die Relationen dieser charakteristischen Zeiten und deren mögliche Auswirkungen auf die Reaktionskinetik sollen in diesem Abschnitt diskutiert werden. Zu diesem Zweck werden zuerst die diffusive Durchmischungszeit und anschließend die Transit-Zeit eines Moleküls berechnet, dessen Diffusionskonstante in der Größenordnung typischer Reaktanden im Metabolismus von Organismen liegt. Die Ergebnisse werden mit der Dauer molekularer Enzymzyklen verglichen und die Konsequenzen der Zeitrelationen auf die Enzymkinetik diskutiert.

⁶Diese Zielmoleküle können auch molekulare Bindungsstellen an der Oberfläche eines Enzyms sein.

Charakteristische Zeiten

Durchmischungszeit

Unter der Bedingung, daß die Reaktion in einem abgeschlossenen Raumbereich stattfindet, sollen im Folgenden die typischen diffusionsbedingten Zeiten abgeschätzt werden. Details der Zellstruktur werden vernachlässigt. Es wird ein kugelförmiges mit Flüssigkeit gefülltes "Gefäß" betrachtet. Zuerst wird die diffusive Durchmischungszeit t_{mix} berechnet. Um t_{mix} zu erhalten, wird ein Molekül im Inneren einer abgeschlossenen Kugel mit dem Radius R betrachtet, das der Brownschen Molekularbewegung unterliegt. Wird dieses Teilchen zur Zeit $t = 0$ im Mittelpunkt der Kugel vorgefunden, so ist die mittlere Zeit, die vergehen muß, um das Molekül mit nahezu gleicher Wahrscheinlichkeit an irgendeiner Stelle im Raumbereich vorzufinden, gerade die Durchmischungszeit t_{mix} .

Die Brownsche Bewegung des Moleküls wird durch die Fokker-Planck-Gleichung

$$\frac{\partial p(\vec{x}, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 p(\vec{x}, t)}{\partial \vec{x}^2} \quad (2.2)$$

für die Wahrscheinlichkeitsdichte $p(\vec{x}, t)$ beschrieben. Für die Anfangsbedingung

$$p(\vec{x}, 0) = \delta(\vec{x})$$

lautet die Lösung (im 3-dimensionalen)

$$p(\vec{x}, t) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{\frac{3}{2}}} \exp\left(-\frac{\vec{x}^2}{4Dt}\right). \quad (2.3)$$

Ist L der Radius der Kugel, so ist nach der Zeit $t = L^2/D$ die Wahrscheinlichkeit

$$p(L, t) = e^{-\frac{1}{4}} p(0, t).$$

Da $e^{-\frac{1}{4}} \approx 0,779$ ist, kann für Zeiten $t > L^2/D$ in grober Näherung eine Gleichverteilung angenommen werden. Diese charakteristische Zeit soll im folgenden als Durchmischungszeit t_{mix} bezeichnet werden.

$$t_{mix} = \frac{L^2}{D} \quad (2.4)$$

Wird beispielsweise als Diffusionskonstante für die Flüssigkeit innerhalb der Kugel $D = 5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ angenommen⁷, so ergibt das bei einem Kugelradius von $L = 10^{-4} \text{ cm}$ eine Durchmischungszeit $t_{mix} = 2 \cdot 10^{-3} \text{ s}$. Das bedeutet, daß nach dieser Zeit das Teilchen bereits mit nahezu gleicher Wahrscheinlichkeit an jedem Ort innerhalb des Kugelvolumens vorgefunden werden kann.

⁷Es wurde die Diffusionskonstante von Glukose in Wasser bei 303K verwendet (siehe [115]).

Die Lösung wurde unter Vernachlässigung der Reflexionen des Moleküls an der Wand des Reaktionsgefäßes gewonnen. Die Berücksichtigung der Reflexionen würde im Vergleich zur Betrachtung ohne Wand zu einer leichten Erhöhung der Wahrscheinlichkeitsdichte für den Aufenthalt eines Produktmoleküls in der Umgebung der Wand führen und damit die Unterschiede in der Verteilung von $p(\vec{x}, t)$ zwischen Zentrum und Rand des Reaktionsvolumens weiter verringern.

Transit-Zeit

Nachdem die Durchmischungzeit eines Moleküls berechnet wurde, soll nun die Frage beantwortet werden, wieviel Zeit ein solches Molekül, das der Brownschen Molekularbewegung unterliegt, braucht, um ein anderes Molekül oder beispielsweise eine Bindungsstelle eines Enzyms zu treffen. Zuerst wird der Fall betrachtet, daß innerhalb des Reaktionsvolumens nur ein Molekül und ein Enzym vorhanden ist. Gesucht ist die Traffic-Zeit $t_{traffic}$, die im Mittel von dem Molekül benötigt wird, um das Enzym zu treffen. Daraus ergibt sich direkt die Zeit, die das Produktmolekül braucht, um irgendeines von N vorhandenen Enzymen zu treffen, durch $t_{transit} = t_{traffic}/N$.

Es muß an dieser Stelle betont werden, daß die Bindung eines Moleküls an eine Bindungsstelle des Enzyms tatsächlich komplizierter sein kann und sowohl elektrostatische Wechselwirkungen als auch 2-dimensionale Diffusion des Moleküls an der Oberfläche des Enzyms entlang zur Bindungsstelle beinhalten kann [167, 152]. Es werden hier diese möglichen Komplikationen vernachlässigt. Es wird davon ausgegangen, daß das Molekül der Brownschen Molekularbewegung unterliegt und dabei irgendwann die enzymatische Bindungsstelle berührt. Nachdem es diese Stelle berührt hat, wird es anschließend gebunden.

In [168] wurde im Zusammenhang mit der Zeitabschätzung bei Koagulationsprozessen ein sehr ähnliches Problem von Smoluchovski untersucht [22].

Als Reaktionsvolumen wird wieder eine Kugel mit dem Radius L betrachtet. In dieser Kugel befindet sich ein Produktmolekül und ein Enzym. Es wird eine "imaginäre" Sphäre eingeführt, die im Mittelpunkt des Reaktionsvolumens mit dem Radius L liegt. Der Radius R dieser "imaginären" Sphäre ist gleich der Summe der Radien von Enzym und Produktmolekül $R = R_E + R_P$. Falls das Produktmolekül diese Sphäre trifft, wird es adsorbiert. Die Wahrscheinlichkeit $q(t)$, daß ein Produktmolekül ein Enzym trifft, ist $q(t) = 1 - p_0(t)$. Dabei ist $p_0(t)$ die Wahrscheinlichkeit, daß keine Berührung erfolgt.

Die Wahrscheinlichkeit p_0 ist durch das Integral über die Kugel vom Radius L für die Wahrscheinlichkeitsdichte $p(\vec{x}, t)$ der Lösung der Fokker-Planck-Gleichung gegeben. Durch die an der "imaginären" Sphäre mit dem Radius R erfolgenden Adsorptionsmöglichkeiten verringert sich der Wert dieses Integrals mit der Zeit. Die Wahrscheinlichkeit für einen Adsorptionsprozeß an dieser Sphäre

im Intervall $(t, t + dt)$ ist $j(t)dt$, wobei

$$j(t) = dq/dt$$

die Wahrscheinlichkeit der Berührung des Produktmoleküls mit der adsorbierenden Sphäre je Einheitszeit darstellt.

Enzyme haben typischerweise eine bis zu 1000 mal größere Masse und ein entsprechend größeres Volumen als die an der Reaktion beteiligten Substrat- und Produktmoleküle und können daher als nahezu unbeweglich angenommen werden. Die Diffusionskonstante der Enzyme ist etwa zwei Zehnerpotenzen kleiner als die der Produktmoleküle [115]. Es wird daher nur die Diffusion der Produktmoleküle mit der Diffusionskonstanten D und der Radius der enzymatischen Bindungsstelle $R \approx R_E$, bei Vernachlässigung des Radius der Produktmoleküle, betrachtet. Der Radius der adsorbierenden Sphäre entspricht also dem Enzymradius.

Der Radius R beträgt etwa 1-5 Nanometer und ist damit zwei Größenordnungen kleiner als der Radius L des Reaktionsvolumens der im Bereich von einigen hundert Nanometern liegt. Zur weiteren Vereinfachung der Rechnung soll als Anfangsbedingung ein Abstand in der Größenordnung von L zwischen Produktmolekül und Enzym angenommen werden. Falls $t_{mix} < t_{traffic}$ gilt teilt sich die zeitliche Entwicklung der Wahrscheinlichkeitsdichte $p(\vec{x}, t)$ in zwei Stufen.

In der ersten Stufe dominiert die diffusive Durchmischung, die durch die Durchmischungszeit t_{mix} charakterisiert ist, den Prozeß. Für $t \approx t_{mix}$ liegt nahezu eine Gleichverteilung unabhängig von der Wahl der Anfangsbedingungen im Reaktionsvolumen vor. Danach wird der Prozeß der Adsorption an der Sphäre für die Veränderung von $p(\vec{x}, t)$ bestimmend.

Der Wahrscheinlichkeitsfluß $j(t)$ kann nun aus der Lösung der Fokker-Planck-Gleichung unter Berücksichtigung der Randbedingung $p(\vec{x} = R) = 0$ auf der adsorbierenden Sphäre, die sich im Mittelpunkt des Reaktionsvolumens befinden soll, berechnet werden.

Diese Aufgabe wurde von Smoluchovski [168] gelöst. Sei innerhalb des Reaktionsvolumens $R < r \leq L$ das Produktmolekül mit gleicher Wahrscheinlichkeit $p_{start} = 1/V$ ($V = 4\pi/3(L^3 - R^3) \approx 4\pi/3L^3$) zum Zeitpunkt $t_{start} = 0$ zu finden, dann hängt $p(\vec{x}, t)$ infolge der Radialsymmetrie nur von r ab. Mit der Verwendung von Kugelkoordinaten nimmt daher die Fokker-Planck-Gleichung die Form

$$\frac{\partial p(r, t)}{\partial t} = \frac{D}{r} \frac{\partial (rp(r, t))}{\partial r^2} \quad (2.5)$$

an. Die Lösung dieser Gleichung unter Berücksichtigung der Randbedingung $p(r = R) = 0$ lautet

$$p(r, t) = p_{start} \left(1 - \frac{R}{r} + \frac{2R}{r\sqrt{\pi}} \int_0^{\frac{r-R}{2\sqrt{Dt}}} e^{-z^2} dz \right). \quad (2.6)$$

Der Wahrscheinlichkeitsfluß $j(t)$, der die Adsorptionswahrscheinlichkeit je Einheitszeit im Zeitintervall $(t, t + dt)$ charakterisiert, kann aus dem Produkt des Flächeninhalts der Oberfläche der adsorbierenden Sphäre und dem Gradienten der Wahrscheinlichkeitsdichte $p(r, t)$ der Lösung (2.6) an der Oberfläche der Sphäre, multipliziert mit der Diffusionskonstante D , berechnet werden. Es ergibt sich

$$j(t) = 4\pi R^2 D \left. \frac{\partial p}{\partial r} \right|_{r=R} = 4\pi R D p_{start} \left(1 + \frac{R}{\sqrt{\pi D t}} \right). \quad (2.7)$$

Für große Zeiten⁸ $t \gg R^2/(\pi D)$ kann der Term $R/\sqrt{\pi D t}$ vernachlässigt werden. Unter Berücksichtigung von

$$p_{start} = \frac{1}{V} = \frac{3}{4\pi L^3}$$

ergibt sich damit

$$j(t) = \frac{3RD}{L^3}.$$

Das Inverse dieser Gleichung ergibt die mittlere Zeit $t_{traffic}$ für ein erstes Zusammentreffen von Molekül und Enzym

$$t_{traffic} \approx \frac{L^3}{3DR} \approx \frac{L^3}{DR}. \quad (2.8)$$

Da $t_{traffic}$ die Zeit charakterisiert, die im Mittel ein Molekül benötigt, um ein ganz speziell markiertes Enzym zu treffen, ist in einem Reaktionsvolumen mit N Enzymen derselben Sorte die mittlere Zeit, bis ein Molekül irgendein beliebiges Enzym trifft, gegeben durch

$$t_{transit} = \frac{t_{traffic}}{N} = \frac{L^3}{NDR}. \quad (2.9)$$

Zur Herleitung der Transit-Zeit wurde angenommen, daß jede Kollision des der Diffusion unterliegenden Moleküls mit der Sphäre, die die Oberfläche des Enzyms repräsentieren soll, berücksichtigt wird. Tatsächlich nimmt die molekulare Bindungsstelle des Enzyms, die ein Substratmolekül oder ein regulatorisches Molekül binden kann, nur einen kleinen Teil der Enzymoberfläche ein. Zur Abschätzung der Transit-Zeit wird deshalb anstelle des Enzymradius für die obigen Berechnungen der Radius der enzymatischen Bindungsstelle $R = R_b$ verwendet.

⁸Für $R = 0.5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}$ und $D = 5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ gilt t als groß falls $t \gg 2 \cdot 10^{-8} \text{ s}$. Da z.B. typische Werte von $t_{mix} \approx 10^{-3} \text{ s}$ fünf Größenordnungen länger sind, ist diese Bedingung immer erfüllt.

Die Herausbildung molekularer Netzwerke

In Kapitel 1.1 wurden ausführlich die Gründe dafür diskutiert, daß es sinnvoll sein kann, zwischen mikroskopischer und makroskopischer Selbstorganisation zu unterscheiden. Unter Verwendung der in den letzten Unterabschnitten hergeleiteten charakteristischen Zeiten t_{mix} und $t_{transit}$ werden nun die Verhältnisse innerhalb von Mikroreaktoren diskutiert [169]. Unter noch näher zu bestimmenden Bedingungen kann es bei enzymatischen Reaktionen zu mikroskopischer Selbstorganisation kommen, die auf der Herausbildung molekularer Netzwerke basiert.

Jetzt wird ein Molekül betrachtet, daß die Eigenschaft besitzt, durch Bindung an die regulatorische Bindungsstelle eines Enzyms, dessen Substratbindungsfähigkeit zu ändern. Bei diesem Molekül soll es sich um ein Zwischenprodukt innerhalb einer Kette von Reaktionen handeln. So könnte es beispielsweise das Reaktionsprodukt einer durch Enzyme katalysierten Reaktion sein. Dieses Reaktionsprodukt sei nun zusammen mit den N Enzymen in einem kleinen kugelförmigen Raumbereich, der mit Flüssigkeit gefüllt ist, eingeschlossen. Die Zeit, die das regulatorische Produktmolekül braucht, um seine Anfangsbedingung zu "vergessen" und mit nahezu gleicher Wahrscheinlichkeit irgendwo in dieser Kugel vorgefunden zu werden, ist die Durchmischungszeit t_{mix} (Gl. 2.4). Die Zeit, die das regulatorische Produktmolekül benötigt, um an eines der N Enzyme zu binden, ist die Transit-Zeit $t_{transit}$ (Gl. 2.9).

Aus Gleichung 2.4 folgt sofort die Korrelationslänge

$$L_{korr} = \sqrt{Dt_{transit}}. \quad (2.10)$$

Diese Länge gibt die mittlere Distanz an, die das regulatorische Molekül zurücklegt, bevor es an das Enzym bindet. Die charakteristische Länge kann mit der linearen Ausdehnung L des Mikroreaktors, in dem die Reaktion abläuft, verglichen werden. Es ergeben sich zwei grundsätzlich verschiedene Konstellationen. Falls $L \gg L_{korr}$ gilt, so bindet das regulatorische Produktmolekül an ein Enzym, das in der Nähe des Entstehungspunktes des regulatorischen Moleküls liegt. Da dieses Molekül Informationen über Reaktionsereignisse trägt⁹, jedoch bereits in der Nähe des Entstehungsorts wieder gebunden wird, sind die Wechselwirkungen in diesem Reaktionssystem typischerweise kurzreichweitig.

Die Situation ist hingegen völlig verschieden, falls $L < L_{korr}$ erfüllt ist. Das Enzym welches das regulatorische Produktmolekül bindet, kann praktisch überall innerhalb des Mikroreaktors vorgefunden werden. Das bedeutet, daß das regulatorische Molekül in der Lage ist, unabhängig von der räumlichen Position des Enzyms, mit nahezu gleicher Wahrscheinlichkeit an irgendeines der N Enzyme

⁹Aus dessen Existenz folgt, daß ein Enzym kurz vorher das Produktmolekül freigesetzt hat und sich in einem adäquaten Enzymzustand befindet.

zu binden. Diese Bedingung kann auch durch die charakteristischen Zeiten des Diffusionsproblems ausgedrückt werden, d.h. es gilt

$$t_{\text{transit}} > t_{\text{mix}}. \quad (2.11)$$

Falls die Transit-Zeit größer als die Durchmischungszeit ist, kann das erste Enzym, das durch das regulatorische Produktmolekül berührt wird, mit etwa gleicher Wahrscheinlichkeit irgendwo im Reaktionsvolumen vorgefunden werden.

Wegen Gl. (2.9) ist die Transit-Zeit umgekehrt proportional zur Gesamtzahl N der Enzyme. Daher kann die Bedingung 2.11 nur für ausreichend kleine Enzymzahlen erfüllt werden. Setzt man $t_{\text{mix}} = t_{\text{transit}}$, ergibt sich für die kritische Enzymzahl

$$N_{kr} = \frac{L}{R}. \quad (2.12)$$

Diese ist nur von der linearen Ausdehnung des Reaktionsvolumens L und dem Radius R der Bindungsstelle an der Enzymoberfläche abhängig. Ist die Enzymzahl kleiner als N_{kr} , so erstrecken sich die Wechselwirkungen durch die allosterischen Effekte der Reaktionsprodukte über das gesamte Reaktionsvolumen. Wählt man $R = 1 - 10\text{nm}$ als charakteristische Ausdehnung der enzymatischen Bindungsstelle und $L = 1\mu\text{m}$ als Größe des Mikroreaktors, so ergibt $N_{kr} = 100 - 1000$ Enzyme.

Die charakteristischen Zeiten t_{mix} und t_{transit} können mit der Dauer τ eines einzelnen katalytischen Zyklus verglichen werden. Diese Zeit ist bis auf wenige Ausnahmen (siehe z.B. Experiment in Abschnitt 2.2) nicht direkt zugänglich. Jedoch kann sie aus der Wechselzahl (Turnover-Rate) abgeschätzt werden. Daraus ergibt sich ein typischer Wert von $\tau = 10 - 100\text{ms}$ für viele Enzyme (siehe Tabelle 2.1, S. 18). Ein Vergleich zwischen τ und t_{mix} zeigt, daß in Submikrometervolumina mit einigen hundert Enzymen die Zeit τ viel größer sein kann sowohl als die Durchmischungszeit t_{mix} als auch die Transit-Zeit t_{transit} . Es ergibt sich die Relation

$$t_{\text{turn}} \gg t_{\text{transit}} > t_{\text{mix}}. \quad (2.13)$$

Das ist ein bemerkenswertes Resultat. In einem makroskopischen System sind alle charakteristischen kinetischen Zeiten einer chemischen Reaktion viel länger als die mittlere Zeit für ein einzelnes molekulares Reaktionsereignis. Daher sind diese praktisch instantane Ereignisse. Das bildet die Basis der traditionellen kinetischen Theorie. Man sieht jedoch, daß in sehr kleinen Raumbereichen für Enzymreaktionen der entgegengesetzte Grenzfall gelten kann, so daß die Zeit der internen molekularen Dynamik der Enzyme länger ist als die kinetischen Zeiten der Reaktion. In diesem Fall muß die theoretische Beschreibung der chemischen Reaktion grundsätzlich modifiziert werden.

Das betrachtete System kann als Population aktiver Makromoleküle verstanden werden, die wie molekulare Maschinen arbeiten [29]. Jeder molekulare Zy-

klus eines Enzyms endet in der Umwandlung eines Substratmoleküls in ein Produktmolekül. Der Zyklus stellt eine Reihe von Konformationsänderungen dar, die als kontinuierliche Bewegung entlang einer internen Reaktionskoordinate verstanden werden können. Im Fall allosterischer Enzyme können die Enzymzyklen durch die Bindung regulatorischer Moleküle beeinflusst werden. Diese Bindung kann in Abhängigkeit vom jeweiligen Enzym sowohl zu einer Erhöhung als auch zu einer Verringerung der Substratbindungsrate und damit der Enzymaktivität führen.

Wenn die regulatorischen Moleküle durch die Enzyme selbst produziert werden, führt das zu Wechselwirkungen zwischen den Enzymzyklen verschiedener Enzyme. Falls die Bedingung 2.13 gilt, sind die charakteristischen Transportzeiten der regulatorischen Produktmoleküle zwischen den verschiedenen Enzymen im Vergleich zur Dauer des Enzymzyklus kurz. Falls die Transit-Zeit größer als die Durchmischungszeit ist, kann ein regulatorisches Produktmolekül, daß durch ein bestimmtes Enzym freigesetzt wurde, mit nahezu gleicher Wahrscheinlichkeit den katalytischen Zyklus irgendeines der anderen N Enzyme beeinflussen. Ein solches Reaktionssystem, bestehend aus katalytischen Makromolekülen, zwischen denen Wechselwirkungen existieren, wurde in [24] deshalb molekulares Netzwerk genannt. Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen solcher molekularer Netzwerke auf die Enzymkinetik zu verstehen.

Kapitel 3

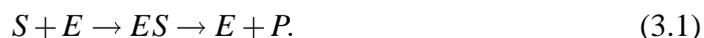
Stochastische Modellierung eines produktaktivierten Enzymsystems

Im Abschnitt 2.2 wurden Experimente vorgestellt, in denen Enzyme durch anfängliche externe Stimulierung mit Licht zu synchroner katalytischer Aktivität angeregt wurden. In den folgenden drei Kapiteln wird untersucht, ob und unter welchen Bedingungen eine interne Synchronisation von Enzymzyklen d.h. ohne externe Beeinflussung möglich ist. Die Funktion, die die externe Anregung in den Experimenten hatte, wird durch die Einbeziehung von Kopplungsmechanismen zwischen den Zuständen unterschiedlicher Enzyme ersetzt. Die wesentlichsten Regulationsmechanismen bei Enzymreaktionen in wässriger Lösung sind bereits in Kapitel 2 diskutiert worden. Ich betrachte in diesem Kapitel den Fall der allosterischen Produktaktivierung. Dazu wird ein einfaches Modell einer produktaktivierten enzymatischen Ein-Substrat-Reaktion entwickelt, bei der die intramolekularen Prozesse während des enzymatischen Zyklus mit berücksichtigt werden.

Zuerst wird für die Modellierung dieser Enzymreaktion ein anschauliches zeit- und zustandsdiskretes Automatenmodell verwendet [170]. Damit werden die grundlegenden Verhaltensweisen des Reaktionssystems veranschaulicht. Für weitere quantitative Untersuchungen wird das diskrete Modell durch ein kontinuierliches Modell ersetzt und dessen Verhalten studiert.

3.1 Stochastisches Modell mit zeitdiskreter Phasendynamik

Die Untersuchungen beginnen mit der Betrachtung einer einfachen Enzymreaktion



Bei dieser Ein-Substrat-Reaktion bindet ein Substratmolekül an ein Enzym und bildet einen Enzym-Substrat-Komplex (im folgenden *ES*-Komplex genannt). Dieser *ES*-Komplex zerfällt anschließend weiter in das freie Enzym und ein Produktmolekül. Unter Annahme dieses einfachen Reaktionsmechanismus gelang es, wesentliche Eigenschaften der Enzymkinetik theoretisch zu verstehen [171, 172, 173, 174]. Dazu wurden die Ratengleichungen für das Reaktionsschema 3.1 aufgestellt und untersucht. Diese Methode der Verwendung von Ratengleichungen setzt sehr große Teilchenzahlen sowohl für die Enzyme als auch für die Edukte und Produkte voraus, da Fluktuationen in der Zahl der an der Reaktion partizipierenden Teilchen vernachlässigt werden. In diesem Fall ermöglichen die kinetischen Ratengleichungen eine Beschreibung des makroskopischen Systems ohne auf die einzelnen mikroskopischen Prozesse einzugehen.

Die Anzahl vieler physiologisch wichtiger Enzyme einer Sorte innerhalb der lebenden Zelle liegt zwischen $10^1 - 10^4$ [115]. Fluktuationen um den Mittelwert der Zahl der freien Enzyme und *ES*-Komplexe können deshalb nicht mehr vernachlässigt werden. Falls die Kinetik eines enzymatischen Reaktionssystems unter diesen Bedingungen untersucht werden soll, müssen deshalb mikroskopische Modelle und stochastische Methoden verwendet werden. Es wird angenommen, daß die räumliche Ausdehnung des Mikroreaktors wesentlich kleiner sei als die charakteristische Diffusionslänge (Korrelationslänge) der Produktmoleküle, die sich aus Gl. (2.10), S. 36 ergibt. Unter dieser Bedingung ist das System homogen durchmischt.

Nun werden die verschiedenen Prozesse betrachtet, die während eines enzymatischen Zyklus ablaufen.

1. Kollision des frei beweglichen Substratmoleküls mit dem Enzym.
2. Mögliche Bindung des Substratmoleküls an die Bindungsstelle des Enzyms, falls der Zusammenstoß in der Nähe der enzymatischen Bindungsstelle des Enzyms erfolgt.
3. Mögliche Dissoziation des Substratmoleküls während des Bindungsvorganges.
4. Durch die Bindung des Substratmoleküls ausgelöste Prozesse wie z.B. Konformationsänderung der räumlichen Enzymstruktur.
5. Bildung des Reaktionsproduktes.
6. Dissoziation des Reaktionsproduktes.
7. Relaxationsprozesse des Enzyms, Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes, in dem das Enzym erneut ein Substratmolekül binden kann.

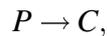
Die ersten beiden Prozesse werden zu einem Ereignis zusammenfaßt. Es gibt dann eine bestimmte Wahrscheinlichkeit $v\Delta t$, daß ein Enzym pro Zeitintervall Δt ein Substratmolekül binden kann. Diese Wahrscheinlichkeit $v\Delta t$ hängt von der Wahrscheinlichkeit w_{coll} der Kollision eines Substratmoleküls mit dem Enzym in der Nähe der Bindungsstelle pro Zeiteinheit Δt ab. Ich nehme in diesem Kapitel an, daß die Zahl der Substratmoleküle konstant ist. Diese Zahl beeinflußt w_{coll} und damit $v\Delta t$, wird jedoch ansonsten nicht weiter betrachtet. Nach einer erfolgten Kollision gibt es eine bestimmte Wahrscheinlichkeit w_{bind} dafür, daß sich ein *ES*-Komplex bildet. Die Bindungswahrscheinlichkeit $v\Delta t$ ist somit $v\Delta t = w_{coll} \cdot w_{bind}$.

Von entscheidender Bedeutung zum Verständnis aller Reaktionsmodelle in dieser Arbeit sind die in Punkt 4 genannten Prozesse, die durch die *ES*-Komplexbildung induzierten Konformationsänderungen der Proteinstruktur des Enzyms. Klassische Modelle der Enzymkinetik gehen davon aus, daß der *ES*-Komplex mit einer bestimmten Rate in ein Produkt und ein Enzym zerfällt. Wie in Abschnitt 2.2 anhand experimenteller Ergebnisse gezeigt wurde, spielen stetige Konformationsänderungen bei einigen Enzymreaktionen eine erhebliche Rolle zum Verständnis ihrer Kinetik. Die Konformationsänderungen überführen die Enzymstruktur im Verlauf der Katalyse von einer strukturellen Konfiguration in eine andere. Es ist klar, daß dieser Vorgang, physikalisch betrachtet, kein Sprung sein kann, der mit einer bestimmten Übergangsrate erfolgt. Es handelt sich vielmehr um einen dynamischen Prozeß der "Re-Arrangierung" der räumlichen Positionen der Atome (und den von diesen gebildeten Aminosäuren) zueinander. Er kann, wie in Abschnitt 2.2 diskutiert wurde, näherungsweise als Diffusions-Drift-Prozeß in einem Potential entlang einer Reaktionskoordinate beschrieben werden.

In Abb. 2.2, S. 22 wurde ein Beispiel für den Verlauf eines solchen Potentials dargestellt [29]. Sind die lokalen Minima der Potentialfunktion entlang der Reaktionskoordinate sehr tief, so wird nach Erreichen dieses Minimums das Enzym sehr lange in diesem Zustand bleiben. Die Lebensdauer dieses metastabilen Zwischenzustandes kann dann deutlich länger sein als die mittlere Zeit zum Erreichen des nächsten energetischen Minimums. Unter diesen Bedingungen kann der katalytische Zyklus als eine Sequenz von Zuständen verstanden werden, zwischen denen mit einer bestimmten Rate Übergänge erfolgen. Diese Situation entspricht faktisch der klassischen Betrachtungsweise. Ist die Zahl der diskreten Zustände allerdings sehr hoch, so kann dieser Sprungprozeß durch eine Diffusionsgleichung angenähert werden (siehe Abschnitt 3.3). Sind die Energiebarrieren zwischen den lokalen Minima des Potentials der freien Energie hingegen so niedrig, daß die mittlere Wartezeit des Enzyms im dazugehörigen Zustand kleiner oder vergleichbar mit der Zeit ist, um von einem dieser Zustände in den nächsten zu gelangen, so kann dieser Prozeß ebenfalls als Diffusion beschrieben werden.

Um die Zustandsänderungen des Enzyms nach erfolgter Bildung des *ES*-Komplexes zu modellieren, wird zuerst ein Modell mit diskreten Phasenpunkten

verwendet, zwischen denen Übergänge möglich sind. Die Prozesse der Bildung (Punkt 5) und Freisetzung (Punkt 6) des Reaktionsproduktes werden soweit vereinfacht, daß nach Erreichen des Phasenpunktes K_p ein Produktmolekül freigesetzt wird und sich dadurch die Zahl der freien Reaktionsprodukte um 1 erhöht. Da in der lebenden Zelle nach einem enzymatisch katalysierten Reaktionsschritt meist weitere folgen, die die Produkte der vorherigen Reaktion wieder als Ausgangsstoffe verwenden, wird darüberhinaus folgende Reaktion



angenommen. Die Produkte werden mit der Wahrscheinlichkeitsrate γ in Moleküle C umgewandelt, die keinen weiteren Einfluß auf unser Reaktionssystem haben.

Zusätzlich wird in diesem Kapitel der Fall betrachtet, daß die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes (ES) durch die Reaktionsprodukte allosterisch aktiviert wird. In dem hier vorgestellten einfachen Modell wird diese Aktivierung durch die direkte Abhängigkeit der Bindungswahrscheinlichkeitsrate $v(m)$ der Substratmoleküle von der Zahl der freien Reaktionsprodukte realisiert. Diese Abstraktion ist dann richtig, wenn die Bindung des regulatorischen Produktmoleküls und damit die Aktivierung des Enzyms sofort zur Bildung eines ES -Komplexes führt und das Reaktionsprodukt schnell wieder vom Enzym dissoziiert. Dadurch kann ein Produktmolekül in kurzer Zeit mehrere Enzyme aktivieren.

Ein Enzym wird in diesem Modell als Automat modelliert, der verschiedene Zustände besitzt, zwischen denen Übergänge mit bestimmten Wahrscheinlichkeiten erfolgen (siehe Abb. 3.1). Das mathematische Konzept von Automaten [175] wurde durch von Neumann eingeführt. Es hat sich vor allem bei der näherungsweise Beschreibung von biologischen Vorgängen, für die die zugrundeliegenden physikalischen Prozesse nicht bekannt oder zu kompliziert sind, als sehr effizient erwiesen. Solche Modelle wurden beispielsweise von N. Wiener und A. Rosenbluth [176] zur Beschreibung der Musterbildung in anregbaren Medien, bestehend aus Netzwerken mit neuronartigen Elementen, verwendet [177, 25].

Zur Modellierung der Reaktion (3.1) in einem kleinen Raumbereich, der nur einige hundert Enzyme enthält, wird jedes Enzym als Automat dargestellt. Entsprechend kann das Verhalten von molekularen Netzwerken durch die kollektive Dynamik in einer Population von Automaten beschrieben werden, die durch die Freisetzung und den Empfang von Botenmolekülen miteinander "kommunizieren".

Es wird ein kleines Zeitintervall Δt eingeführt und das System zu diskreten Zeiten $t_j = j\Delta t$ mit $j = 0, 1, 2, 3, \dots$ betrachtet. Zu einem bestimmten Zeitpunkt können die N Enzyme in unterschiedlichen Phasenzuständen vorgefunden werden. Ich bezeichne diese diskreten Phasenzustände des Enzyms i zum Zeitpunkt j durch $\Phi_i(j)$. Angenommen $v_+\Delta t$ ($v_-\Delta t$) ist die Wahrscheinlichkeit, daß vom

Zeitpunkt j zum nächsten Zeitpunkt $j + 1$ die Phasenvariable Φ_i um 1 erhöht (verringert) wird, dann ist $1 - v_+\Delta t - v_-\Delta t$ die Wahrscheinlichkeit, daß $\Phi_i(j)$ unverändert bleibt. Im allgemeinen können die Wahrscheinlichkeiten $v_+\Delta t$ und $v_-\Delta t$ phasenabhängig sein.

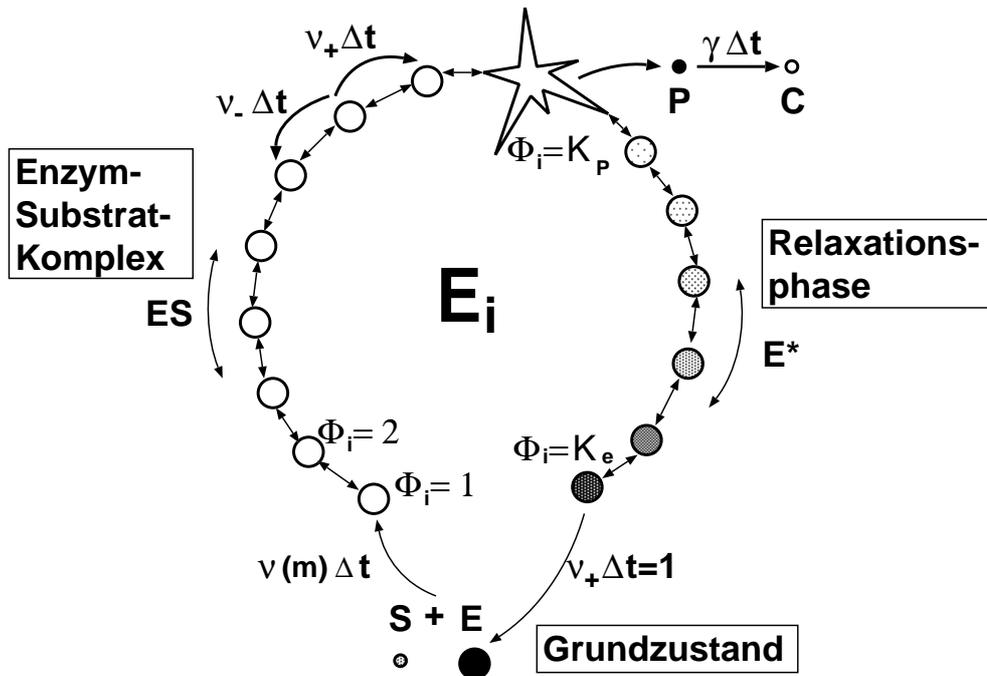


Abb. 3.1: Modell des molekularen Enzymzyklus von Enzym i . Zwischen den diskreten Phasenzuständen $\Phi_i = 1, \Phi_i = 2, \dots, K_e$ können Übergänge zum nachfolgenden Zustand mit der Wahrscheinlichkeit $v_+\Delta t$ und zum zurückliegenden Zustand mit der Wahrscheinlichkeit $v_-\Delta t$ erfolgen. Der Enzymzyklus beginnt am Phasenpunkt $\Phi_i = 1$ mit der Wahrscheinlichkeit $v(m)\Delta t$ durch Bindung eines Substratmoleküls durch das Enzym im Grundzustand. Am Phasenpunkt $\Phi_i = K_p$ wird ein Produktmolekül freigesetzt, das dann mit der Wahrscheinlichkeit $\gamma\Delta t$ in ein Molekül vom Typ C umgewandelt wird. Erreicht das Enzym den Phasenpunkt K_e , kehrt es zum nächsten Zeitschritt in den Grundzustand zurück.

Die Dynamik der Phasenzustände aller $i = 1, 2, \dots, N$ Enzyme wird dann innerhalb des Enzymzyklus durch

$$\Phi_i(j+1) = \begin{cases} \Phi_i(j) + 1, & \text{mit Ws. } v_+(\Phi)\Delta t, \text{ falls } 0 < \Phi_i(j) < K_e \\ \Phi_i(j) - 1, & \text{mit Ws. } v_-(\Phi)\Delta t, \text{ falls } 0 < \Phi_i(j) < K_e \\ \Phi_i(j), & \text{mit Ws. } 1 - v_+(\Phi)\Delta t - v_-(\Phi)\Delta t, \text{ falls } 0 < \Phi_i(j) < K_e \\ 0, & \text{falls } \Phi_i(j) = K_e \end{cases} \quad (3.2)$$

beschrieben. Die Bindung eines Substratmoleküls an das Enzym und der dadurch

ausgelöste Enzymzyklus erfolgt mit der Wahrscheinlichkeit $v\Delta t$ und ist ein rein stochastischer Prozeß.

In diesem Abschnitt beschränkt sich die Analyse auf den einfachen Fall, daß die Bindung eines regulatorischen Moleküls nur im Grundzustand des freien Enzyms möglich ist d.h. im Phasenzustand $\Phi = 0$. Die Dissoziationsrate sei so hoch, daß die charakteristische mittlere Bindungszeit kürzer ist als das Diskretisierungsintervall Δt . Dadurch erfolgt die Bindung und Dissoziation der regulatorischen Moleküle innerhalb des diskreten Zeitschritts Δt , was die Untersuchungen stark vereinfacht. Unter diesen Bedingungen hat jedes der Produktmoleküle im Reaktionsvolumen dieselbe Wahrscheinlichkeit $v_1\Delta t$, ein Enzym in der Umgebung seiner regulatorischen Bindungsstelle zu treffen. Da davon ausgegangen wird, daß die Konzentration der Substratmoleküle sehr hoch ist, führt jedes Zusammenreffen eines regulatorischen Produktmoleküls mit der entsprechenden Bindungsstelle des Enzyms zur gleichzeitigen Initiierung der Bindung eines Substratmoleküls. Daher kann ein einzelnes Produktmolekül den katalytischen Zyklus eines bestimmten Enzyms mit der Wahrscheinlichkeit $v_1\Delta t$ auslösen.

Nimmt man weiter an, daß eine kleine Wahrscheinlichkeit $v_0\Delta t$ zur spontanen Substratbindung existiert, so ist in Anwesenheit von m Produktmolekülen die Wahrscheinlichkeit dafür, daß ein Enzym innerhalb des Zeitintervalls Δt den enzymatischen Prozeß durch Bindung eines Substratmoleküls beginnt

$$v\Delta t = 1 - (1 - v_0\Delta t)(1 - v_1\Delta t)^m. \quad (3.3)$$

Falls die Wahrscheinlichkeiten $v_0\Delta t$ und $v_1\Delta t$ klein sind, was durch die Wahl ausreichend kleiner Δt immer erreicht werden kann, ergibt sich aus Gleichung (3.3) als Ergebnis einer Taylorentwicklung, die nach der ersten Ordnung abgebrochen wird

$$v\Delta t \approx v_0\Delta t + mv_1\Delta t. \quad (3.4)$$

Für die numerischen Simulationen dieses Modells wird aber die Bindungswahrscheinlichkeit (3.3) verwendet.

Für $\Phi_i = 0$ gilt

$$\Phi_i(j+1) = \begin{cases} 1, & \text{mit Ws. } v\Delta t, \text{ falls } \Phi_i(j) = 0 \\ 0, & \text{mit Ws. } 1 - v\Delta t, \text{ falls } \Phi_i(j) = 0. \end{cases} \quad (3.5)$$

Die gesamte Phasendynamik der Enzympopulation wird dann durch Gl. (3.2)-(3.5) beschrieben. Im Automatenmodell, beschrieben durch Gl. (3.2)-(3.5), wird das Produktmolekül durch ein beliebiges Enzym i am Phasenpunkt $\Phi_i = K_p$ freigesetzt. Wie später erkennbar wird, bestimmt dieser Punkt, falls das System synchronisiert ist, die Zahl synchroner Enzymgruppen. Entsprechend des Reaktionsschemas (3.1) werden die Reaktionsprodukte mit der Rate γ weiter abgebaut. Die

Wahrscheinlichkeit, daß ein bestimmtes Produktmolekül innerhalb eines kurzen Zeitintervalls Δt abgebaut wird, ist $\gamma\Delta t$.

Die Gesamtzahl $m(j+1)$ der Produktmoleküle im Reaktionsvolumen zum nächsten Zeitpunkt $j+1$ ist daher gleich

$$m(j+1) = m(j) + \sum_{i=1}^N \Delta(\Phi_i(j) - K_p) - \sum_{k=1}^{m(j)} \psi_k. \quad (3.6)$$

Die binäre Zufallsvariable ψ_k kann die Werte 1 und 0 mit der Wahrscheinlichkeit $\gamma\Delta t$ und $1 - \gamma\Delta t$ annehmen. Die Funktion $\Delta(x) = 0$ falls $x \neq 0$ und $\Delta(x) = 1$ für $x = 0$. Der zweite Term auf der rechten Seite von Gl. (3.6) beschreibt die Freisetzung eines Produktmoleküls, wenn das Enzym i den Phasenpunkt $\Phi_i = K_p$ erreicht hat. Der letzte Term dieser Gleichung bestimmt den Abbau eines jeden der freien Produktmoleküle mit der Wahrscheinlichkeit $\gamma\Delta t$. Da nach Reaktionsschema (3.1) die Enzyme durch die Reaktionsprodukte allosterisch aktiviert werden, ist die Wahrscheinlichkeit $v\Delta t$ in Gl. (3.5), die die Bindungswahrscheinlichkeit eines Substratmoleküls angibt, davon abhängig, ob zum Zeitpunkt j das Enzym ein Produkt an der regulatorischen Bindungsstelle gebunden hat oder nicht. Dieses Molekül erreicht ein gegebenes Enzym mittels diffusiver Bewegung durch das Reaktionsvolumen, freigesetzt von einem anderen Enzym. Falls die Bedingung (2.13) für die Existenz eines molekularen Netzwerkes erfüllt ist, ist die Anfangsbedingung des freigesetzten Produktmoleküls unwichtig. Jedes der Produktmoleküle im Reaktionsvolumen hat die gleiche Wahrscheinlichkeit, irgendeines der Enzyme in der Nähe der regulatorischen Bindungsstelle zu treffen. Daher ist diese Wahrscheinlichkeit $v\Delta t$ nur durch die Gesamtzahl aller freien Reaktionsprodukte bestimmt und nicht durch deren räumliche Verteilung.

Es ist wichtig zu betonen, daß der Enzymzyklus nicht mit der Freisetzung des Produktmoleküls beendet ist (siehe Kapitel 2.2). Zum Zeitpunkt der Freisetzung des Produktmoleküls befindet sich das Enzym in einer Konformation, die sich i.a. vom freien Grundzustand unterscheidet. Daher schließt sich noch ein Relaxationsprozeß zur Rückkehr in diese Ausgangskonformation an. Erst danach kann das Enzym wieder ein neues Substratmolekül binden. Das bedeutet, daß jeder molekulare Enzymzyklus aus drei Teilen besteht. Während des ersten hat das Enzym ein Substrat gebunden – ein Enzym-Substrat-Komplex gebildet – und wandelt das Substrat in ein Produkt um. Dieser Prozeß endet mit der Produktfreisetzung. Daran schließen sich im zweiten Teil Relaxationsprozesse an, die das Enzym wieder in den Grundzustand zurückführen. Die Verweildauer des Enzyms im Grundzustand, in dem es kein Substratmolekül gebunden hat, aber dazu bereits wieder fähig ist, kann als dritter Teil des Enzymzyklus aufgefaßt werden. Falls die Konzentration des Substrats sehr hoch ist, kann dieser Teil sehr kurz sein (siehe Kap. 2).

3.2 Gegenseitige Synchronisation der Enzymzyklen

Als Anfangsbedingungen in den folgenden Simulationen ist die Besetzung der Enzymzustände eine gleichverteilte Zufallsverteilung. Die Abbaurrate der Produktmoleküle wurde so groß gewählt, daß die mittlere freie Lebensdauer γ^{-1} der Produktmoleküle immer kürzer als die mittlere Turnover-Zeit τ ist. Die Anzahl der Phasenzustände ist im untersuchten Modell $K_e = 100$. Das kleinste Zeitintervall Δt zwischen zwei Zeitschritten ist

$$\Delta t = \frac{\tau}{K_e} = 0.01\tau.$$

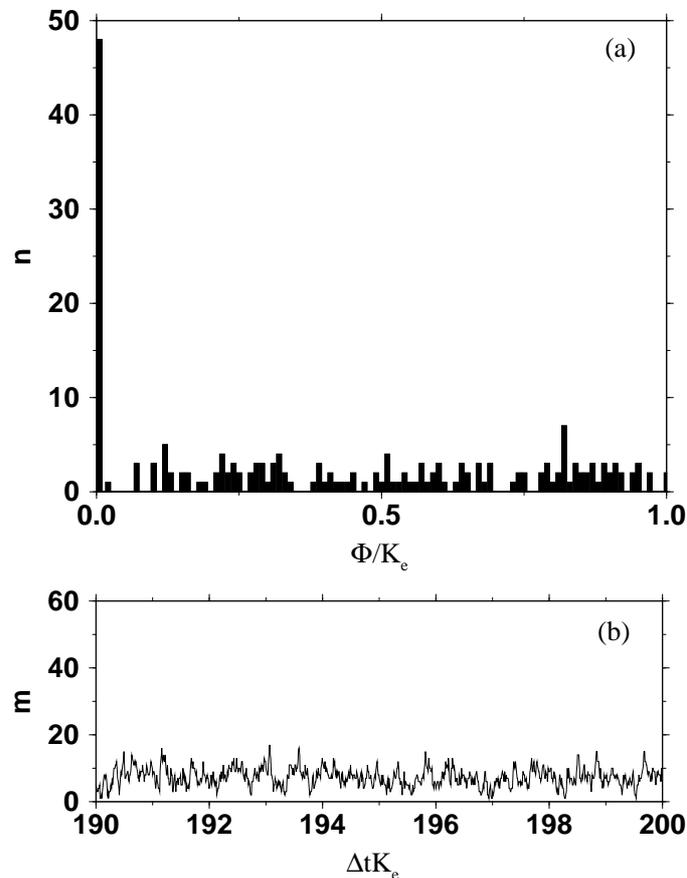


Abb. 3.2: (a) Enzymverteilung entlang der Reaktionskoordinate und (b) Zeitabhängigkeit der Zahl der Produktmoleküle im asynchronen Modus für $N = 200$ Enzyme. Die Reaktionsparameter sind $v_0\Delta t = 0.01$, $v_1\Delta t = 0.002$, $v_+\Delta t = 1$, $v_-\Delta t = 0$, $K_p = 50$, $K_e = 100$ und $\gamma\Delta t = 0.2$.

Abb. 3.2 zeigt das kinetische Verhalten von Reaktion (3.1) mit $N = 200$ Enzymen, wenn die allosterische Regulation, charakterisiert durch den Parameter v_1 ,

schwach ist. Abb. 3.2a stellt das Histogramm der Verteilung der Enzyme entlang der Phasenvariablen Φ dar. Die Enzymzyklen der einzelnen Enzyme sind für diese Parameter unkorreliert. Da die allosterische Aktivierung hier sehr schwach ist, erfolgt die Substratbindung meist spontan. Die mittlere Wartezeit der freien Enzyme bis zur Substratbindung ist relativ lang. Daher verweilt ein relativ hoher Anteil ($N_0 \approx 50$) von Enzymen im Grundzustand $\Phi = 0$. Der restliche Teil der Enzyme ist entlang der Reaktionskoordinate nahezu gleichverteilt. In diesem Fall weist, wie in Abb. 3.2b erkennbar ist, auch die zeitabhängige Zahl der freien Produktmoleküle Zufallsfluktuationen um einen Mittelwert auf.

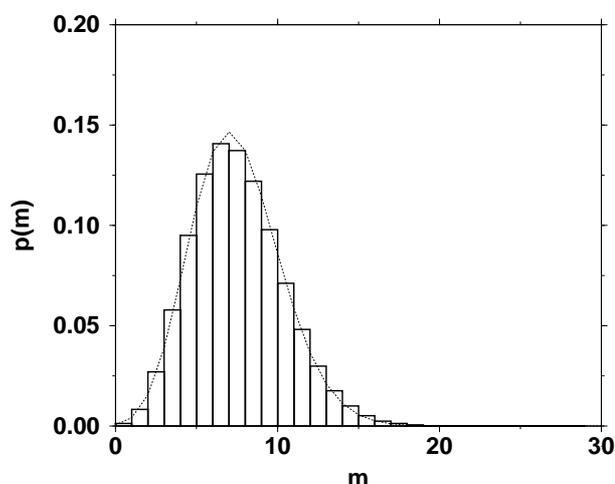


Abb. 3.3: Häufigkeitsverteilung der Produktmoleküle im asynchronen Reaktionsmodus. Die Balken stellen die Häufigkeitsverteilung der Produktmoleküle aus der Simulation dar. Die gepunktete Linie zeigt die theoretisch zu erwartende Poissonverteilung (3.7) mit $\rho\Delta t = 1.5$ und $\gamma\Delta t = 0.2$. Parameter wie in Abb. 3.2.

Für kleine Werte von v_1 ist die Kopplung zwischen den Enzymzuständen sehr klein. Wie aus Abb. 3.2 hervorgeht, sind unter diesen Bedingungen die Enzyme bezüglich ihrer Phase nahezu gleichverteilt. Die mittlere Zahl der Enzyme die sich innerhalb des Zyklus befinden, beträgt für diese Simulation 150. Pro Zeitschritt werden deshalb durchschnittlich $\rho\Delta t = 1.5$ Produktmoleküle erzeugt. Falls man annimmt, daß ρ konstant ist, kann man leicht die Bilanzgleichung für die Wahrscheinlichkeitsverteilung $q(m)$, aufstellen und lösen (siehe Anhang A.1, S. 149). Deren Lösung lautet im stationären Fall

$$q(m) = (\rho/\gamma)^m \frac{1}{m!} \exp\left(-\frac{\rho}{\gamma}\right). \quad (3.7)$$

Diese Gleichung gibt die Wahrscheinlichkeit an, m freie Produktmoleküle im Reaktionssystem vorzufinden. Es handelt sich um eine Poissonverteilung.

Die Häufigkeitsverteilung der Zahl der Produktmoleküle, die aus den Simulationen berechnet wurde, ist in Abb. 3.3a abgebildet. Sie schwankt um den Mittelwert $\langle m \rangle \approx 7$. Diese Verteilung wurde aus einer Zeitserie mit $j = 4 \cdot 10^6$ Zeitschritten und denselben Parametern wie in Abb. 3.2 berechnet.

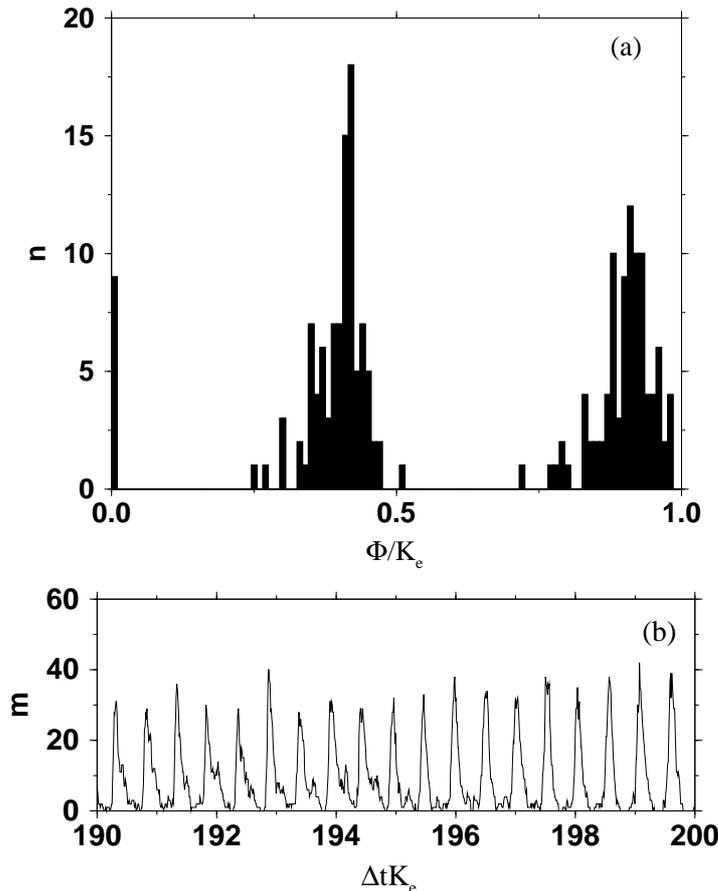


Abb. 3.4: (a) Enzymverteilung entlang der Reaktionskoordinate und (b) Zeitabhängigkeit der Zahl der Produktmoleküle für den synchronen Reaktionsmodus mit zwei Enzymgruppen für $N = 200$ Enzyme. Die Reaktionsparameter sind $v_0 \Delta t = 0.01$, $v_1 \Delta t = 0.01$, $v_+ \Delta t = 1$, $v_- \Delta t = 0$, $K_p = 50$, $K_e = 100$ und $\gamma \Delta t = 0.2$.

Das kinetische Verhalten der Reaktion (3.1) ändert sich jedoch völlig (Abb. 3.4), wenn der Parameter v_1 , der die Intensität der allosterischen Aktivierung beschreibt, erhöht wird. Das Histogramm Abb. 3.4a zeigt, daß nun die Enzyme in zwei synchron operierende Gruppen geteilt sind, deren Turnover-Zyklus um eine halbe Periode verschoben ist. Die Zahl der Enzyme im Grundzustand $\Phi = 0$ ist nun viel kleiner als ($N_0 < 10$) in Abb. 3.2a. Gleichzeitig weist die Zahl der Produktmoleküle im Reaktionsvolumen in Abb. 3.4b periodisches Spiking mit etwa

der halben Periode der Turnover-Zeit auf. Die mittlere Lebensdauer der Produktmoleküle, charakterisiert durch die Abbauwahrscheinlichkeit $\gamma\Delta t$, ist kürzer als die mittlere Turnover-Zeit τ . Deshalb sind nahezu alle Produktmoleküle bereits in Moleküle vom Typ C umgewandelt, bevor der nächste Spike durch die synchrone Produktfreisetzung der Enzyme entsteht.

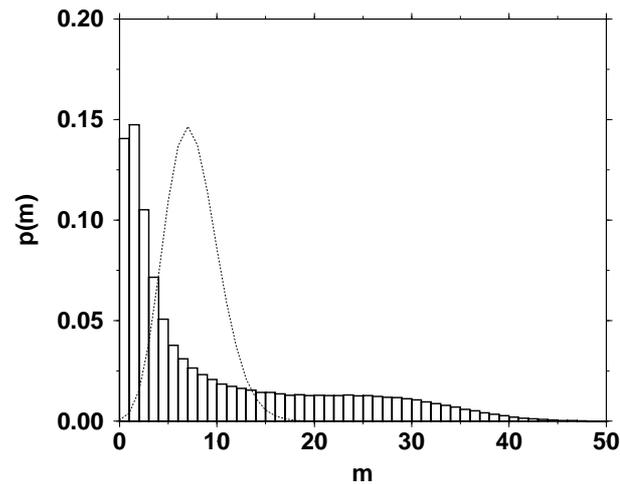


Abb. 3.5: Häufigkeitsverteilung der Produktmoleküle im synchronen Reaktionsmodus. Die Balken stellen die Verteilung der Produktmoleküle aus der Simulation dar. Die gepunktete Linie zeigt die Poissonverteilung im asynchronen Modus aus Abb. 3.3. Parameter wie in Abb. 3.4.

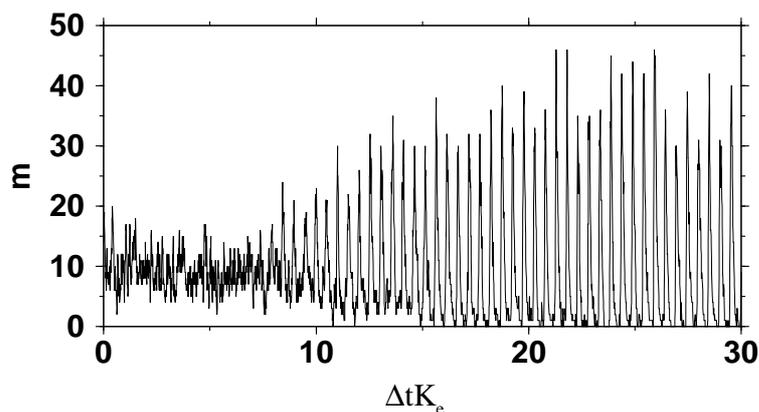


Abb. 3.6: Zeitlicher Verlauf der Zahl der Produktmoleküle im Fall von zwei enzymatischen Gruppen. Als Anfangsbedingung zum Zeitpunkt $t = 0$ liegt eine statistische Gleichverteilung der Enzymzustände entlang des Phasenzklus vor. Parameter wie in Abb. 3.4.

In Abb. 3.5 ist wieder die Häufigkeitsverteilung der Zahl der Produktmoleküle für dieselben Parameter wie in Abb. 3.4 gezeigt. Diesmal liegen jedoch Spiking-

bedingungen vor, so daß eine starke Abweichung der Häufigkeitsverteilung der Produktmoleküle von der Poissonverteilung vorhanden ist. Insbesondere ist die Zahl der Zustände mit großen Produktkonzentrationen viel häufiger als im Fall ohne Spiking. Die Verteilung wurde wieder aus einer Zeitserie mit $j = 4 \cdot 10^6$ Zeitschritten und denselben Parametern wie in Abb. 3.4 berechnet. Da die Bindung des Substrats, der Produkte und die Übergänge zwischen den einzelnen Enzymzuständen stochastische Prozesse sind, ist die Form der Spikes nicht identisch und unterliegt statistischen Schwankungen. Die maximale Produktkonzentration an der Spitze eines Spikes in Abb. 3.4b ist viel höher als die mittlere Produktkonzentration in Abb. 3.2b, falls keine Synchronisation der Enzymzustände vorliegt.

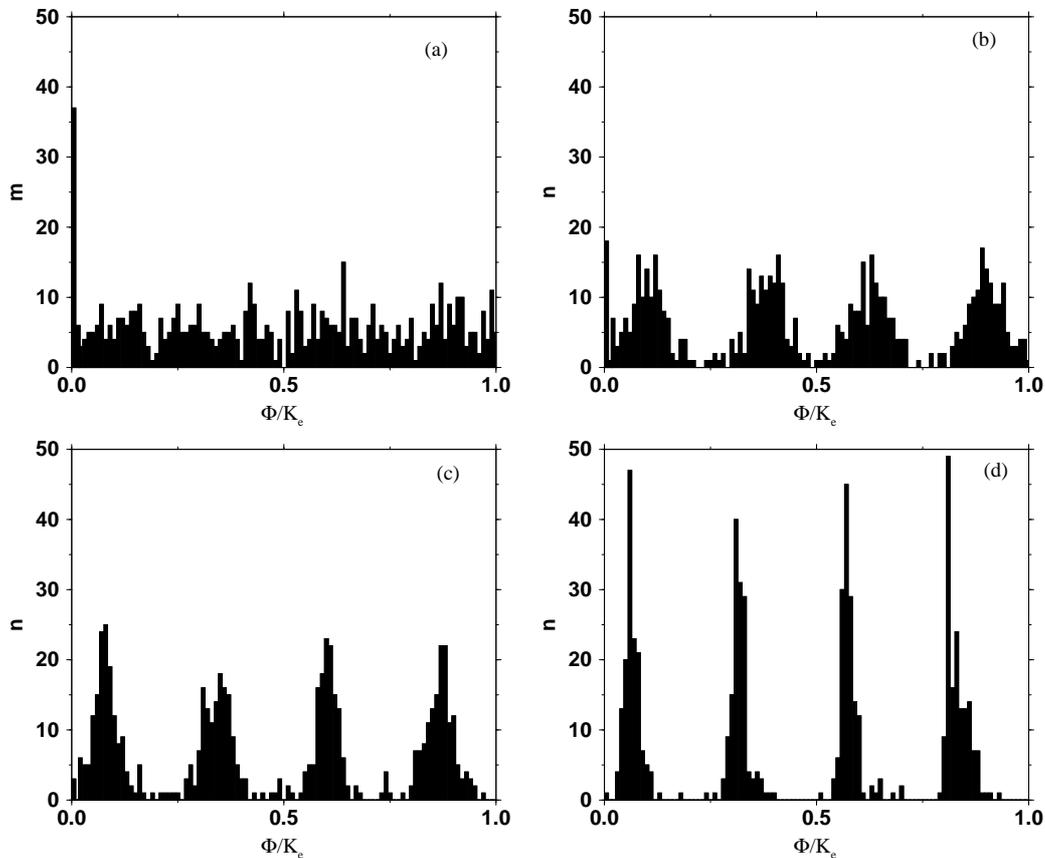


Abb. 3.7: Enzymverteilung entlang der Reaktionskoordinate im asynchronen (a) und synchronen (b,c,d) Zustand mit vier enzymatischen Gruppen in einer Population mit $N = 600$ Enzymen für verschiedene Intensitäten der allosterischen Aktivierung (a) $v_1\Delta t = 0.002$, (b) $v_1\Delta t = 0.004$, (c) $v_1\Delta t = 0.006$, und (d) $v_1\Delta t = 0.2$. Die anderen Reaktionsparameter sind $v_0\Delta t = 0.01$, $v_+\Delta t = 1$, $v_-\Delta t = 0$, $K_p = 80$, $K_e = 100$, $\gamma = 0.2$.

In Abb. 3.6 ist der transiente Prozeß der Herausbildung synchronen Verhal-

tens gezeigt. Zum Zeitpunkt $j = 0$ waren alle Enzyme über alle Phasenzustände gleichverteilt.

Die Synchronisationseigenschaften des betrachteten molekularen Netzwerks hängen stark von den Details des Turnover-Zyklus ab. Variiert man beispielsweise den Punkt $\Phi = K_p$, an dem die Reaktionsprodukte freigesetzt werden, kann Spiking mit verschiedenen Frequenzen beobachtet werden. Die Simulationsergebnisse in Abb. 3.4 mit zwei enzymatischen Gruppen wurden mit $K_p = 50$ erhalten. Das Produktmolekül wurde also etwa in der Mitte des Enzymzyklus freigesetzt.

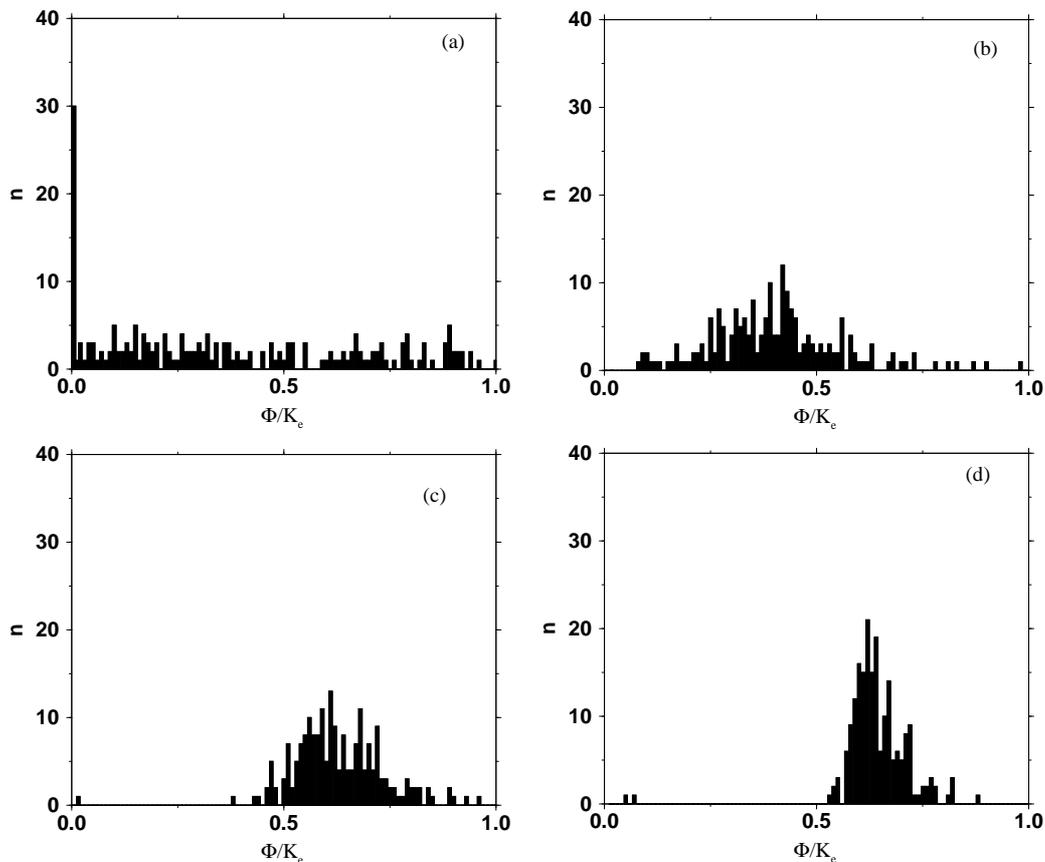


Abb. 3.8: Enzymverteilung entlang der Reaktionskoordinate im asynchronen (a) und synchronen (b,c,d) Modus mit einer enzymatischen Gruppe in einer Population von $N = 200$ Enzymen für verschiedene Intensitäten der allosterischen Aktivierung (a) $v_1\Delta t = 0.001$, (b) $v_1\Delta t = 0.002$, (c) $v_1\Delta t = 0.003$ und (d) $v_1\Delta t = 0.1$. Die anderen Reaktionsparameter sind $v_0\Delta t = 0.01$, $v_+\Delta t = 1$, $v_-\Delta t = 0$, $K_p = 10$, $K_e = 100$, $\gamma\Delta t = 0.2$.

Abb. 3.7 zeigt für verschiedene Werte der allosterischen Aktivierung für $K_p = 80$ und $N = 600$ die Verteilung der Enzyme entlang der Reaktionskoordinate. Unterhalb der Synchronisationsschwelle (Abb. 3.7a) weist die Verteilung

der Enzymzustände unkorrelierte Zufallsschwankungen auf. Stärkere Korrelationen zwischen den Phasenzuständen einzelner Enzyme bilden sich heraus, wenn die Intensität der allosterischen Regulierung erhöht wird. Diesmal entstehen 4 Enzymgruppen. Höhere Werte von $v_1\Delta t$ verstärken diesen Effekt (Abb. 3.7c, d), ersichtlich in der abnehmenden Breite der Enzymgruppen.

Die Lebensdauer der Produktmoleküle ist in unseren Simulationen, wie bereits erwähnt, immer kürzer als die durchschnittliche Dauer eines einzelnen Enzymzyklus. Daher sind alle Reaktionsprodukte, die von einer enzymatischen Gruppe freigesetzt wurden, bereits weitgehend verschwunden, bevor die Enzyme dieser Gruppe ihren Zyklus beendet haben und wieder aktivierbar sind. Die Zyklen einer gegebenen Enzymgruppe werden durch die freigesetzten Produkte anderer Enzymgruppen "getriggert".

Als Folge dieses Arguments könnte man erwarten, daß Synchronisation mit einer einzigen enzymatischen Gruppe nur für große K_p möglich ist, wenn die Relaxationsdauer des Enzymzyklus und damit die Zeit bis zum Erreichen des Grundzustands kürzer ist als die Lebensdauer der Reaktionsprodukte. Unter diesen Bedingungen existiert tatsächlich Synchronisation mit einer einzigen Enzymgruppe. Allerdings findet sich diese Form der Synchronisation mit einer Gruppe auch, wenn K_p klein ist (Abb. 3.8). Die Reaktionsprodukte werden in diesem Fall bereits kurz nach Beginn des Enzymzyklus freigesetzt, so daß die Lebensdauer der freien Reaktionsprodukte viel kleiner ist als die Relaxationszeit der Enzyme bis zur Rückkehr in den Grundzustand. In diesem Fall ist der Synchronisationsmechanismus etwas verschieden von den bisherigen. Wenn der vorseilende Teil der Enzymgruppe den Phasenpunkt K_p erreicht, erhöht sich die Zahl der freien Reaktionsprodukte, die wiederum die restlichen Enzyme im Grundzustand aktivieren. Dadurch wird also ein "lawinenartiger" Prozeß ausgelöst.

Zum Abschluß dieses Abschnitts wird an einem Beispiel der Einfluß der Übergangsraten v_+ und v_- zwischen diskreten Phasenzuständen untersucht. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurden bei den bisherigen numerischen Beispielen $v_+\Delta t = 1$ und $v_-\Delta t = 0$ gewählt. Unter diesen Bedingungen gibt es keine Fluktuationen in der Turnover-Zeit, und alle Enzyme beenden exakt nach $\tau = \Delta t K_p$ den enzymatischen Zyklus. Nun wird $v_+\Delta t < 1$ und $v_-\Delta t = 0.5 \cdot (1 - v_+\Delta t)$ gesetzt. In Abb. 3.9 ist die Zeitabhängigkeit der Zahl der Produktmoleküle für verschiedene Werte von $v_+\Delta t$ abgebildet.

Zuerst wurde in Abb. 3.9a die Wahrscheinlichkeit $v_+\Delta t = 0.5$ gewählt. Damit ergibt sich $v_-\Delta t = 0.25$. Für diese beiden Übergangsraten ist noch kein qualitativer Unterschied zu den vorherigen Beispielen aus Abb. 3.4b und 3.6 erkennbar. Der einzige wichtige Unterschied besteht in der Verlängerung der Periode zwischen den Spikes der Produktmoleküle. Diese Verlängerung ist nicht nur darauf zurückzuführen, daß in Abb. 3.4b und 3.6 zwei Enzymgruppen existieren (im Gegensatz zu Abb. 3.9, wo nur eine Gruppe vorhanden ist), sondern in der erheblich

angestiegenen mittleren Turnover-Zeit¹. Wird die Übergangsrate v_+ weiter verringert, so schwächt sich die Spiking-Amplitude ab und unkorrelierte statistischen Fluktuationen dominieren das Verhalten des Reaktionssystems (Abb. 3.9b und c).

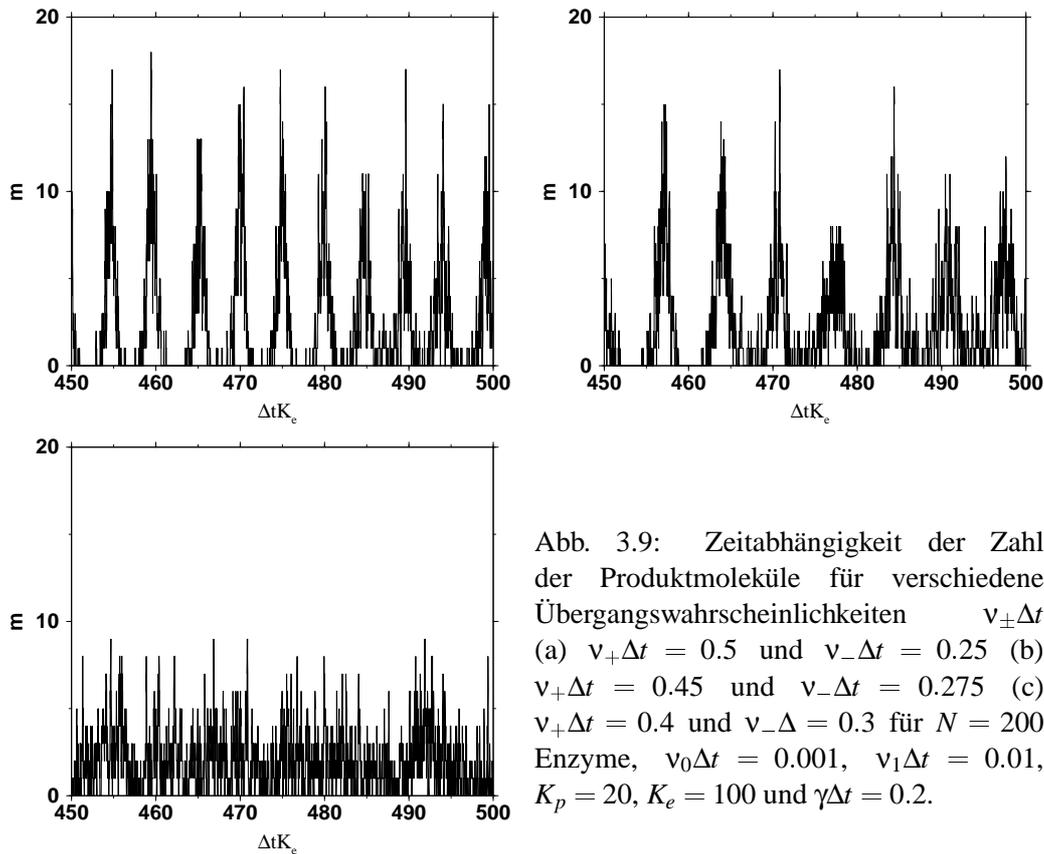


Abb. 3.9: Zeitabhängigkeit der Zahl der Produktmoleküle für verschiedene Übergangswahrscheinlichkeiten $v_{\pm}\Delta t$ (a) $v_+\Delta t = 0.5$ und $v_-\Delta t = 0.25$ (b) $v_+\Delta t = 0.45$ und $v_-\Delta t = 0.275$ (c) $v_+\Delta t = 0.4$ und $v_-\Delta t = 0.3$ für $N = 200$ Enzyme, $v_0\Delta t = 0.001$, $v_1\Delta t = 0.01$, $K_p = 20$, $K_e = 100$ und $\gamma\Delta t = 0.2$.

Die numerische Untersuchung des diskreten Automatenmodells können für verschiedene Parameter durchgeführt werden und liefern eine Fülle von Informationen über das Synchronisationsverhalten der Enzyme. Allerdings ist die Zahl der diskreten Phasenzustände K_e ein wichtiger Systemparameter, dessen Veränderung insbesondere im Fall einer kleinen Zahl von diskreten Zuständen das Verhalten des Systems beeinflussen kann. Liegt ein bekannter Reaktionsmechanismus mit bekannten Reaktionsraten vor, so kann dieses Modell sehr genau dessen kinetisches Verhalten wiedergeben. Für eine große Zahl von Zwischenzuständen oder wenn der Enzymzyklus, wie in in Kapitel 2 dargestellt wurde, ein stetiger Prozeß ist, der als Bewegung in einem Potential entlang einer Reaktionskoordinate beschrieben werden kann, ist die Verwendung des Automatenmodells wegen

¹Man kann für jede gewählte Übergangsrate Δt so anpassen, daß die mittlere Turnover-Zeit τ konstant bleibt. Darauf soll hier aber mit Blick auf den nächsten Abschnitt verzichtet werden.

der Abhängigkeit des Systemverhaltens vom diskreten Parameter K_e ungünstig. Die Eliminierung dieses Parameters und der Übergang zu einem kontinuierlichen Modell ist daher angebracht und wird im nächsten Abschnitt vollzogen.

3.3 Stochastisches Modell mit kontinuierlicher Phasendynamik

Modellbeschreibung

In Abschnitt 2.2 wurden verschiedene theoretische und experimentelle Erkenntnisse diskutiert, nach denen der Enzymzyklus als Diffusions-Drift-Prozeß entlang einer 1-dimensionalen kontinuierlichen Reaktionskoordinate verstanden werden kann. Die bisherige Beschreibung des Enzymzyklus durch eine bestimmte Anzahl diskreter Zustände, zwischen denen Übergänge möglich sind, ist für solche Enzymzyklen eine schlechte Wahl. Für große Werte K_e von diskreten Zuständen nähern sich jedoch, wie im Anhang A.2 gezeigt wird, beide Beschreibungsweisen an.

Betrachtet wird der Diffusions-Drift-Prozeß entlang der eindimensionalen Reaktionskoordinate ϕ in einem effektiven Potential² $U(\phi)$. Die Bewegung des Enzyms i entlang der Reaktionskoordinate ϕ_i im Verlauf des enzymatischen Zyklus kann dann durch

$$\frac{d\phi_i}{dt} = -\frac{\partial U(\phi_i)}{\partial \phi_i} + \eta_i(t) \quad (3.8)$$

mit Gaußschem weißen Rauschen $\eta(t)$ beschrieben werden. Dieses Rauschen hat die statistische Eigenschaft³

$$\langle \eta_i(t)\eta_j(t') \rangle = 2\sigma\delta_{ij}\delta(t-t'). \quad (3.9)$$

Wählt man das spezielle Potential

$$U = \text{const} - v\phi \quad (3.10)$$

mit konstantem negativem Anstieg v , so folgt daraus

$$\frac{d\phi_i}{dt} = v + \eta_i(t) \quad (3.11)$$

²Wie der Verlauf eines solchen Potentials aussehen könnte, ist in Abb. 2.2, S. 22 dargestellt.

³In dieser Arbeit wird immer davon ausgegangen, daß die Diffusionskonstante σ , die die Intensität der intramolekularen Fluktuationen beschreibt, von der Phase ϕ unabhängig ist. Es liegt also kein multiplikatives Rauschen vor.

als Gleichung zur Beschreibung der Phasendynamik. Für diese Gleichung kann man leicht die zugehörige Fokker-Planck-Gleichung

$$\frac{\partial P(\phi)}{\partial \phi} = -v \frac{\partial P(\phi)}{\partial \phi} + \sigma \frac{\partial^2 P(\phi)}{\partial \phi^2} \quad (3.12)$$

angeben [178, 179]. Die folgenden Untersuchungen werden immer von dem einfach geformten Potential (3.10) ausgehen, da nach meinem Wissen über Potentialformen realer Enzyme zur Zeit noch keine Kenntnisse vorliegen. Sie können jedoch leicht unter Verwendung von Gl. 3.8 auch auf kompliziertere Potentiale ausgedehnt werden.

Jedes Enzym kann entweder im freien Zustand (Grundzustand) oder innerhalb des enzymatischen Zyklus vorgefunden werden. Um den Enzymzustand zu charakterisieren, wird deshalb die binäre Zustandsvariable $u_i(t)$ eingeführt. Falls $u_i = 0$, befindet sich das Enzym i im freien Zustand und für $u_i = 1$ innerhalb des Enzymzyklus. Die Bindung eines Substratmoleküls durch das Enzym i zum Zeitpunkt t wird somit durch den Übergang von $u_i = 0$ zu $u_i = 1$ beschrieben. Der Übergang von $u_i = 0$ zu $u_i = 1$ erfolgt nach Gl. (3.4) mit der Wahrscheinlichkeitsrate

$$v(t) = v_0 + v_1 m(t). \quad (3.13)$$

Der Parameter v_1 spezifiziert die Wahrscheinlichkeitsrate, mit der der Enzymzyklus ausgelöst wird, falls ein freies Produktmolekül im Reaktionsvolumen vorhanden ist. Durch v_0 wird die spontane Rate der Zyklusinitialisierung ohne allosterische Aktivierung determiniert.

Die stochastische Differentialgleichung (3.11) lautet in diskretisierter Form

$$\phi_i(t + \Delta t) = \phi_i(t) + v\Delta t + \zeta_i \sqrt{\sigma \Delta t}. \quad (3.14)$$

Dabei sind ζ_i unabhängige Gaußsche Zufallszahlen, so daß

$$\langle \zeta_i(t) \zeta_j(t') \rangle = 2\delta_{ij} \delta(t - t')$$

gilt. Die Dynamik der Phasenvariable an den beiden Randpunkten $\phi = 0$ und $\phi = k_p$ muß noch definiert werden. Falls zum Zeitpunkt $t + \Delta t$ die Phasenvariable $\phi_i(t + \Delta t)$, gegeben durch Gl. (3.14), negativ ist, wird $\phi_i(t + \Delta t) = v\Delta t$ gesetzt. Der Enzymzyklus kann in zwei Teilintervalle zerlegt werden. Im Intervall $0 < \phi_i < k_p$ existiert der *ES*-Komplex. Dieser Teil des Zyklus wird mit der Freisetzung der Reaktionsprodukte beendet. Im Intervall $k_p < \phi_i < 1$ relaxiert das Enzym nach und nach zurück in den Grundzustand. Da die Freisetzung des Produktmoleküls unumkehrbar ist, darf der Punkt k_p nicht von rechts nach links überquert werden. Falls die Phasenvariable ϕ_i den Punkt k_p bereits von links nach rechts durchlaufen hat und zu einem späteren Zeitpunkt $t + \Delta t$ durch zufällige Fluktuationen kleiner

als k_p wird, so wird $\phi_i(t + \Delta t) = k_p + v\Delta t$ gesetzt. Diese absorbierende Randbedingung drückt die Beendigung des Enzymzyklus beim Erreichen des Punktes k_p und die Rückkehr in den Grundzustand aus.

Die zeitliche Entwicklung der Zustandsvariablen u_i wird durch folgenden Algorithmus determiniert

$$u_i(t + \Delta t) = \begin{cases} 1, & \text{falls } u_i(t) = 0, \text{ mit WS } v\Delta t \\ 0, & \text{falls } u_i(t) = 0, \text{ mit WS } 1 - v\Delta t \\ 0, & \text{falls } u_i(t) = 1 \text{ und } \phi_i(t) \geq 1 \\ 1, & \text{falls } u_i(t) = 1 \text{ und } \phi_i(t) < 1. \end{cases} \quad (3.15)$$

In Analogie zu Gl. (3.6) folgt für die Zeitentwicklung der Zahl der Produktmoleküle

$$m(t + \Delta t) = m(t) + \sum_{i=1}^N \Theta(\phi_i(t) - k_p) \Theta(k_p - \phi_i(t - \Delta t)) - \sum_{k=1}^{m(t)} \psi_k. \quad (3.16)$$

Die binäre Zufallsvariable ψ_k kann die Werte 1 und 0 mit der Wahrscheinlichkeit $\gamma\Delta t$ und $1 - \gamma\Delta t$ annehmen. Die Stufenfunktion Θ ist durch $\Theta(x) = 1$, falls $x \geq 0$ und $\Theta(x) = 0$ für $x < 0$, definiert. Der zweite Term auf der rechten Seite von Gl. (3.16) beschreibt die Freisetzung eines Produktmoleküls, wenn das Enzym i den Phasenpunkt $\phi_i = k_p$ erreicht hat. Der letzte Term dieser Gleichung bestimmt die Umwandlung eines jeden der freien Produktmoleküle in Moleküle vom Typ C mit der Wahrscheinlichkeit $\gamma\Delta t$.

Der Algorithmus des stochastischen Modells mit kontinuierlicher Phase wird durch die Gl. (3.14)-(3.16) gebildet. Die Diskretisierungsschrittweite Δt muß so klein gewählt werden, daß das Verhalten des Modells von der diskreten Schrittweite unabhängig ist. Ein Vorteil zum diskreten Automatenmodell (3.2)-(3.6) ist die Eliminierung des Parameters K_e . Welches der beiden Modelle zur Untersuchung konkreter Reaktionssysteme verwendet wird, hängt auch von der "Energiewandlung" entlang der Reaktionskoordinate ab. Existieren einige als diskret approximierbare Zwischenzustände, ist die Verwendung des Automatenmodells naheliegend. Mit dem kontinuierlichen Modell kann darüberhinaus praktisch jede beliebige stetige Energiefunktion $U(\phi)$ untersucht werden.

In Abschnitt 1.2 wurde ein Überblick über wichtige Arbeiten auf dem Gebiet gekoppelter Phasenoszillationen gegeben. Zwei Gleichungen, die die Dynamik von Oszillatoren beschreiben, sollen an dieser Stelle noch kurz mit Gl. (3.11) und dem stochastischen Modell (3.14)-(3.16) verglichen werden. Es handelt sich um das Kuramoto-Modell [85, 80] mit globaler Kopplung und die Adlergleichung [99].

Das stochastische Kuramoto-Modell

$$\dot{\phi}_i(t) = \omega_i + \eta_i(t) + K \sum_{j=1}^N \sin(\phi_j - \phi_i) \quad (3.17)$$

beschreibt ein System gekoppelter Phasenoszillatoren. Dabei ist $\phi_i(t)$ die Phase des i -ten Oszillators zum Zeitpunkt t und ω_i dessen Frequenz, die zufällig aus einer Wahrscheinlichkeitsverteilung $g(\omega)$ mit dem Mittelwert ω_0 ausgewählt wurde. Das weiße Rauschen $\eta_i(t)$, für das Gl. (3.9) gilt, verursacht Fluktuationen in der Frequenz der Oszillatoren. Der dritte Term auf der rechten Seite von Gl. (3.17) definiert die globale Kopplung zwischen den Phasenoszillatoren mit der Kopplungsstärke K . Die Untersuchungen dieses Systems ergaben, daß in Abhängigkeit von $g(\omega)$, K und der Stärke des Gaußschen Rauschens die Phasenzustände der Oszillatoren synchrones Verhalten zeigen können. Ein Vergleich zwischen Gl. (3.11) und Gl. (3.17) zeigt eine große Ähnlichkeit beider Gleichungen. Der Rauschterm als auch der Geschwindigkeits- bzw. Frequenzterm sind identisch. Unterschiede gibt es in der Art der Kopplung. In Gl. (3.17) ist die globale Kopplung der Oszillatoren explizit erfaßt. In Gl. (3.11), die die Phasendynamik eines einzelnen Enzyms beschreibt, hingegen nicht. Tatsächlich existiert in den in dieser Arbeit untersuchten Modellen keine direkte Kopplung zwischen den Phasenzuständen unterschiedlicher Enzyme. Die Kopplung wird indirekt durch die Anzahl der freien Produktmoleküle vermittelt und kommt in Gl. (3.15) durch die produktabhängige Bindungsrate $v(m)$ zum Ausdruck.

Die Dynamik eines Van-der-Pol-Oszillators unter dem Einfluß weißen Rauschens und bei Wechselwirkung mit einem externen periodischen Signal kann durch die sogenannte Adlergleichung

$$\dot{\phi}(t) = \omega - \omega_0 + \eta(t) - \varepsilon \sin(\phi) \quad (3.18)$$

für die Phasendifferenz ϕ beschrieben [99, 95] werden. $\omega - \omega_0$ auf der rechten Seite dieser Gleichung drückt den Unterschied zwischen der Eigenfrequenz ω des Oszillators und der Frequenz des externen Signals ω_0 aus. Der zweite Term η stellt das Gaußsche weiße Rauschen dar. Der Parameter ε im dritten Term von Gl. (3.18) bestimmt die Nichtlinearität. Im Gegensatz zu Gl. (3.11) und Gl. (3.17) beschreibt Gl. (3.18), wie bereits betont, die Dynamik der Phasendifferenz eines einzelnen Oszillators mit der Frequenz ω bezüglich einer externen Frequenz ω_0 unter dem Einfluß Gaußschen Rauschens.

Statistische Eigenschaften

Zum Studium des Systemverhaltens benötigt man noch die statistischen Eigenschaften des durch Gl. (3.11) und (3.9) definierten "random walk". Der Zeitpunkt, an dem der Zyklus an der Stelle $\phi = 0$ beginnt, wird zu $t = 0$ gesetzt. Der Zyklus ist nach der Zeit $\tilde{\tau}$ beendet, wenn der Phasenpunkt $\phi = 1$ erreicht ist. Diese Zeit $\tilde{\tau}$ stellt deshalb die Zyklusdauer, also die molekulare Turnover-Zeit, dar. Da die Dynamik innerhalb des Zyklus ein Zufallsprozeß ist, schwankt $\tilde{\tau}$ von einer Realisierung zur nächsten. Jedoch kann die mittlere Turnover-Zeit τ und die Schwan-

kungsbreite $\Delta\tau = \sqrt{\langle \tau^2 \rangle - \langle \tau \rangle^2}$ definiert werden. Als nächstes werden dafür die analytischen Ausdrücke abgeleitet.

Die Abhängigkeit der Driftgeschwindigkeit von ϕ wird durch das Potential $U(\phi)$ entlang der Reaktionskoordinate ϕ bestimmt. Über die Form dieses Potentials im Fall wirklicher Enzyme ist nur sehr wenig bekannt (siehe Kap. 2). Für alle numerischen Untersuchungen wird deshalb die konstante Driftgeschwindigkeit $v\tau = 1$ angenommen.

Die Zeit, die vergeht, um vom linken reflektierenden Rand $\phi = 0$ erstmalig den rechten absorbierenden Rand des Intervalls $0 \leq \phi < 1$ zu erreichen, ist $\tilde{\tau}$. Der Mittelwert τ für ein Ensemble solcher Prozesse ist gesucht. Es handelt sich also bei Festlegung des Startpunktes um die Bestimmung der mittleren Zeit, die nötig ist, um diese Schwelle zu erreichen⁴.

Falls der "random walk" zur Zeit $t = 0$ am Punkt k_s im Intervall $[0, 1)$ beginnt, so ist die Wahrscheinlichkeit, daß zur Zeit t die Phase sich noch im Intervall $[0, 1)$ liegt

$$G(k_s, t) = \int_0^1 P(\phi, t | k_s, 0) d\phi. \quad (3.19)$$

Wegen der Anfangsbedingung $P(\phi, 0 | k_s, 0) = \delta(k_s - \phi)$ gilt zur Zeit $t = 0$ $G = 1$. Wegen des rechten absorbierenden Randes $\phi = 1$ geht die Funktion $G(k_s, t)$ gegen Null für $t \rightarrow \infty$.

Die bedingte Wahrscheinlichkeitsdichte $P(\phi, t | k_s, 0)$ erfüllt die adjungierte Fokker-Planck-Gleichung

$$\frac{\partial P(\phi, t | k_s, 0)}{\partial t} = v \frac{\partial P(\phi, t | k_s, 0)}{\partial k_s} + \sigma \frac{\partial^2 P(\phi, t | k_s, 0)}{\partial k_s^2}. \quad (3.20)$$

Daher erhält man für die zeitliche Entwicklung von $G(\phi_0, t)$ die Gleichung

$$\frac{\partial G(k_s, t)}{\partial t} = v \frac{\partial G(k_s, t)}{\partial k_s} + \sigma \frac{\partial^2 G(k_s, t)}{\partial k_s^2}. \quad (3.21)$$

Die Wahrscheinlichkeit $Q(k_s, t)$, daß zur Zeit t die Phasenvariable schon den rechten Rand erreicht hat, ist durch

$$Q(k_s, t) = 1 - G(k_s, t)$$

gegeben. Somit ist die Wahrscheinlichkeit, diesen Rand innerhalb des kurzen Zeitintervalls $(t, t + \Delta t)$ zu erreichen, durch $Q(k_s, t + \Delta t) - Q(k_s, t)$ gegeben. Die Wahrscheinlichkeitsdichte, den Rand $\phi = 1$ je Zeiteinheit zu erreichen, ist

$$\pi(\phi_0, t) = \frac{\partial Q(k_s, t)}{\partial t} = -\frac{\partial G(k_s, t)}{\partial t}. \quad (3.22)$$

⁴Diese Aufgabenstellung wird in der Literatur auch als "mean first passage time" Problem bezeichnet (siehe z.B. [178, 180, 181]).

Die mittlere Zeit $\tau(k_s)$ bis zum Erreichen der Schwelle $\phi = 1$ für den “random walk” mit dem Startpunkt k_s ist

$$\tau(k_s) = \int_0^\infty t\pi(k_s, t)dt = - \int_0^\infty t\partial_t G(k_s, t)dt = \int_0^\infty G(k_s, t)dt. \quad (3.23)$$

Für die Varianz gilt demzufolge

$$\tau^2(k_s) = - \int_0^\infty t^2\partial_t G(k_s, t)dt = \int_0^\infty tG(k_s, t)dt. \quad (3.24)$$

Unter Verwendung der Identität

$$\int_0^\infty t^2\partial_t G(k_s, t)dt = G(k_s, \infty) - G(k_s, 0) = -1 \quad (3.25)$$

ergibt sich zusammen mit Gl. (3.22) und (3.23) für τ die Differentialgleichung

$$v\frac{d\tau(k_s)}{dk_s} + \sigma\frac{d^2\tau(k_s)}{dk_s^2} = -1. \quad (3.26)$$

Die Lösung von Gl. (3.26) muß zwei Randbedingungen erfüllen

$$\frac{d\tau(k_s)}{dk_s} = 0 \text{ für } k_s = 0, \quad \tau(k_s) = 0 \text{ für } \phi_0 = 1. \quad (3.27)$$

Die entsprechende Gleichung für das zweite statistische Moment der “first-passage time” ist

$$v\frac{d\tau^2(k_s)}{dk_s} + \sigma\frac{d^2\tau^2(k_s)}{dk_s^2} = -2\tau(k_s) \quad (3.28)$$

mit den Randbedingungen

$$\frac{d\tau^2(k_s)}{dk_s} = 0 \text{ für } k_s = 0, \quad \tau^2(k_s) = 0 \text{ für } \phi_0 = 1. \quad (3.29)$$

Die Lösung von Gl. (3.26) mit den Randbedingungen (3.27) ist

$$\tau(k_s) = \frac{1-k_s}{v} + \frac{\sigma}{v^2} \left[\exp\left(-\frac{v}{\sigma}\right) - \exp\left(-\frac{vk_s}{\sigma}\right) \right]. \quad (3.30)$$

Durch Einsetzen dieser Lösung in Gl. (3.28) unter Berücksichtigung der Randbedingungen (3.29) erhält man eine Differentialgleichung, die direkt gelöst werden kann. Beide Lösungen bestimmen die “mean-first-passage time” und das zweite statistische Moment eines “random walk”, der am Punkt $k_s = 0$ anfängt und

bei $\phi = 1$ endet. Da die mittlere Turnover-Zeit τ die “mean-first-passage time” (Gl. (3.30)) mit dem Startpunkt $k_s = 0$ darstellt, gilt

$$\tau(k_s) = \frac{1 - k_s}{v} + \frac{\sigma}{v^2} \left[\exp\left(-\frac{v}{\sigma}\right) - \exp\left(-\frac{vk_s}{\sigma}\right) \right]. \quad (3.31)$$

Die Varianz der Turnover-Zeit ergibt sich als Lösung von Gl. (3.28) für $k_s = 0$ zu

$$\Delta\tau^2 = \frac{2\sigma}{v^3} - \frac{5\sigma^2}{v^4} + \frac{4\sigma}{v^3} \exp\left(-\frac{v}{\sigma}\right) + \frac{\sigma^2}{v^4} \exp\left(-\frac{2v}{\sigma}\right). \quad (3.32)$$

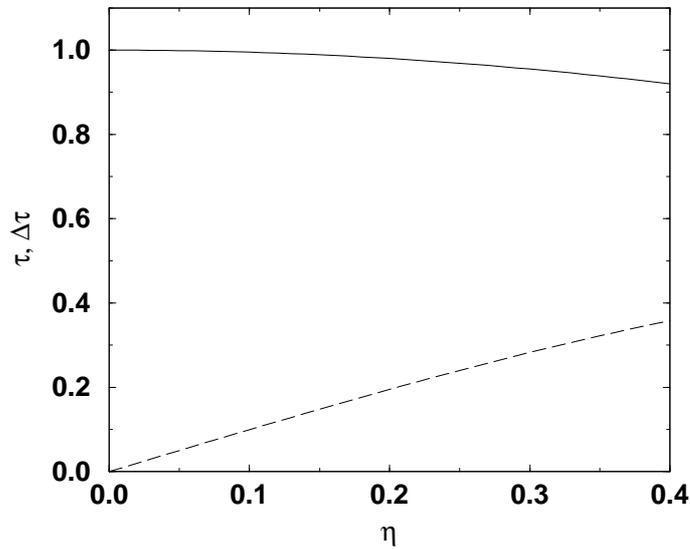


Abb. 3.10: Die Abhängigkeit der mittleren Turnover-Zeit τ (durchgezogene Linie) und der Varianz $\Delta\tau$ der Turnover-Zeit (gestrichelte Linie) von der Rauschintensität η .

In Abb. 3.10 ist die mittlere Turnover-Zeit τ und die Varianz $\Delta\tau^2$, die aus den Gl. (3.31) und (3.32) berechnet wurde, dargestellt worden. Die numerische Integration der Gleichung (3.11) zeigt, daß die Gl. (3.31) und (3.32) die statistischen Eigenschaften des Turnover-Zyklus korrekt beschreiben. Für kleine Werte der Rauschintensität σ folgt unter Vernachlässigung der Glieder höherer Ordnung für τ , $\Delta\tau$ und ξ durch

$$\tau \approx 1/v, \quad (3.33)$$

$$\Delta\tau \approx \sqrt{2\sigma/v^3}, \quad (3.34)$$

und

$$\xi = \frac{\Delta\tau}{\tau} \approx \sqrt{2\sigma/v}. \quad (3.35)$$

Numerische Untersuchung des stochastischen Modells mit kontinuierlicher Phasenvariable

Mit dem stochastischen Modell (3.14)-(3.16) bei kontinuierlicher Phasendynamik werden nun für verschiedene Parameter numerische Simulationen durchgeführt. Die Diskretisierungsschrittweite beträgt $\Delta t = 0.0005\tau$. Falls es nicht besonders hervorgehoben wird, sind als Anfangsbedingung die Enzyme zufällig entlang der Phase und im diskreten Grundzustand gleichverteilt. Die Geschwindigkeit innerhalb des Intervalls $(0, 1)$ ist $v\tau = 1$.

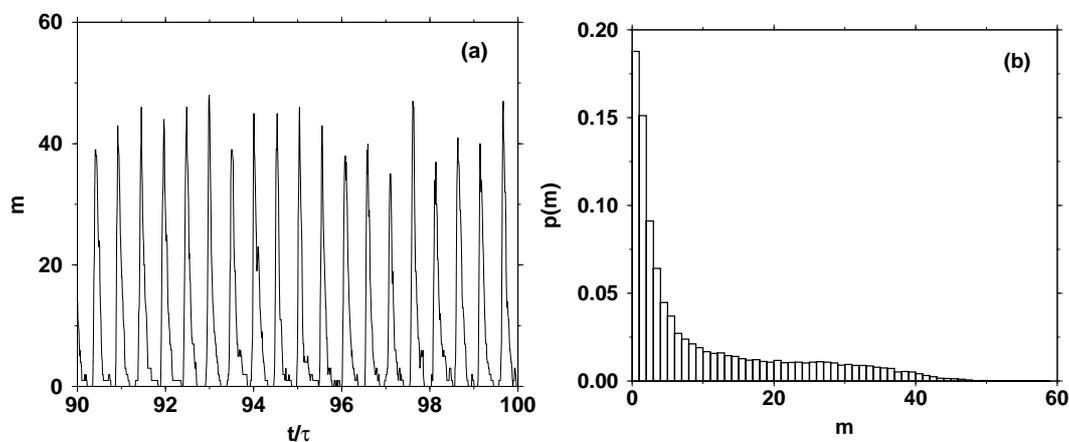


Abb. 3.11: (a) Zeitabhängigkeit der Zahl der Produktmoleküle, und (b) Häufigkeitsverteilung für den synchronen Reaktionsmodus im kontinuierlichen Modell. Sonstige Parameter entsprechend wie in Abb. 3.4. (b) wurde aus den Daten der Zeitserie aus Abb. 3.11(a), im Intervall $[50\tau, 500\tau]$ berechnet.

Die Simulationen dieses Modells zeigen genauso wie die Untersuchungen des Automatenmodells in Abschnitt 3.1 zwei prinzipiell verschiedene Verhaltensweisen. Wie zu erwarten ist, besteht für entsprechend gewählte Parameter eine hohe Übereinstimmung. Um diese zu demonstrieren, sind unter analogen Bedingungen wie in Abb. 3.4 und 3.5 die zeitliche Abhängigkeit der Produktmoleküle und die Häufigkeitsverteilung der Produktmoleküle in Abb. 3.11 dargestellt. Ein Vergleich mit den Resultaten des Automatenmodells (Abb. 3.4b und 3.5 und machen dies deutlich.

Um in Gegenwart starker Fluktuationen die Synchronisationseigenschaften in Abhängigkeit von den Systemparametern zu untersuchen, benötigt man ein quantitatives Maß der Synchronisationsstärke. Ein solches Maß kann z.B. unter Verwendung der Wahrscheinlichkeitsdichte $P(\Delta\phi)$, das die Wahrscheinlichkeit angibt, die Phasendifferenz $\Delta\phi$ zwischen zwei beliebigen Enzymen zu finden. Diese

Wahrscheinlichkeitsdichte ist definiert als

$$P(\Delta\phi) = \left\langle \left[\sum_{i,j=1, i \neq j}^N u_i u_j \right]^{-1} \sum_{i,j=1, i \neq j}^N u_i u_j \delta(\phi_i - \phi_j - \Delta\phi) \right\rangle. \quad (3.36)$$

Da im Grundzustand $u_i = 0$ ist, wird nur über Phasenzustände von Enzymen summiert, die sich innerhalb des Turnover-Zyklus befinden ($u_i = 1$). Die äußeren Klammern symbolisieren die zeitliche Mittelwertbildung während eines ausreichend langen Zeitintervalls, um zufällige Fluktuationen zu eliminieren. Der Koeffizient in eckigen Klammern in Gl. (3.36) stellt den Normalisierungsfaktor dar, so daß

$$\int_{-0.5}^{0.5} P(\Delta\phi) d\Delta\phi = 1 \quad (3.37)$$

gilt; $\delta(x)$ symbolisiert die Diracsche-Delta-Distribution. Um die Verteilung $P(\Delta\phi)$ in den folgenden numerischen Untersuchungen zu berechnen, wird, nachdem die transiente Phase vorüber ist (das ist für die gewählten Parameter immer nach $t/\tau = 250$ der Fall gewesen), zu verschiedenen Zeitpunkten (hier 312 mal) im gleichen Abstand im Zeitintervall $250 < t/\tau < 500$ der Ausdruck in den eckigen Klammern von Gl. (3.36) berechnet. Danach wird daraus der Mittelwert gebildet. Abb. 3.12 zeigt für verschiedene Parameterwerte k_p und σ typische Formen dieser Wahrscheinlichkeitsverteilung.

Ist die Intensität v_1 der allosterischen Regulierung niedrig, ist keine Synchronisation der Enzymzustände vorhanden und die Phasen unterschiedlicher Enzyme sind unabhängig. In diesem Fall sind alle Phasendifferenzen gleichwahrscheinlich und die Wahrscheinlichkeitsverteilung zeigt einen flachen Verlauf wie in Abb. 3.12a. Aus der Normalisierungsbedingung folgt dann $P(\Delta\phi) = 1$ für alle $\Delta\phi$. Falls Synchronisation der Phasenzyklen einsetzt, zeigt sich in der Verteilung von $P(\Delta\phi)$ ein Maximum. Für eine enzymatische Gruppe hat die Wahrscheinlichkeitsverteilung ein einziges Maximum an der Stelle $\Delta\phi$ wie in Abb. 3.12b. Im Fall von zwei synchronen Enzymgruppen zeigt diese Verteilung zwei Maxima (Abb. 3.12c)⁵. Das zentrale Maximum an der Stelle $\Delta\phi = 0$ ist immer etwas höher. Das ist eine Folge davon, daß die Zahl der Enzyme in unterschiedlichen Enzymgruppen nicht exakt übereinstimmen und ständig um einen Mittelwert fluktuieren.

Unter Benutzung der Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Phasendifferenzen (3.36) kann nun der Ordnungsparameter zur Charakterisierung der Synchronisationsstärke der Enzymzustände durch

$$\theta = \int_{-0.5}^{0.5} (1 - P(\Delta\phi))^2 d\Delta\phi \quad (3.38)$$

⁵Die Phasendifferenzen ± 0.5 sind äquivalent.

definiert werden. Falls keine Korrelationen zwischen den Phasenzuständen verschiedener Enzyme existieren, ist $\theta = 0$. Im Gegensatz dazu indiziert ein nicht verschwindender Wert von θ Synchronisation. Allgemein gilt, je höher der Wert von θ , umso stärker ist die Korrelation zwischen den Enzymzuständen.

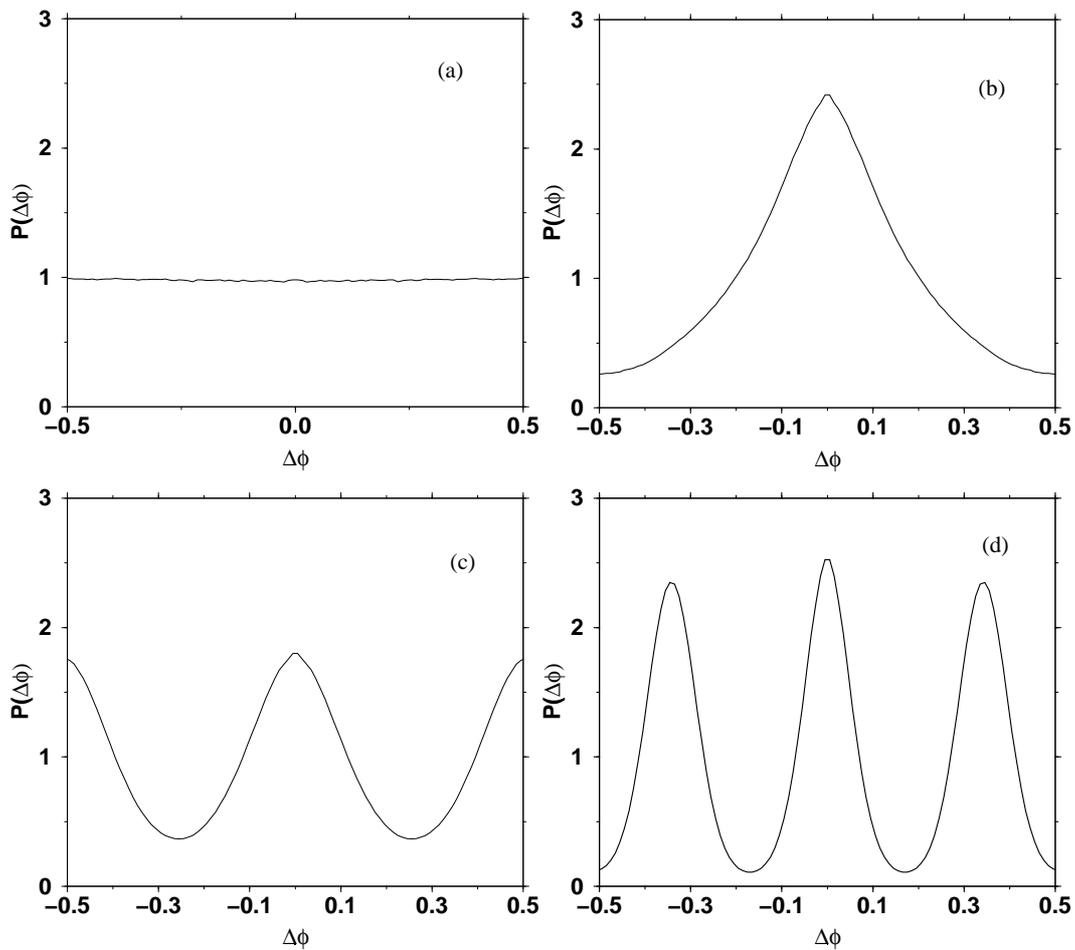


Abb. 3.12: Wahrscheinlichkeitsdichteverteilungen der Phasendifferenzen (a) ohne Synchronisation ($\nu_0\tau = 1$, $\nu_1\tau = 0.001$, $k_p = 0.3$ und $\sigma = 0.0018/\tau^2$), (b) einer Enzymgruppe ($\nu_0\tau = 0.001$, $\nu_1\tau = 1$, $k_p = 0.3$ und $\sigma = 0.0018/\tau^2$), (c) zwei Enzymgruppen ($\nu_0\tau = 0.001$, $\nu_1\tau = 1$, $k_p = 0.55$ und $\sigma = 0.0018/\tau^2$), (d) drei Enzymgruppen ($\nu_0\tau = 0.001$, $\nu_1\tau = 1$, $k_p = 0.71$ und $\sigma = 0.00045/\tau^2$). Sonstige Parameter sind $\gamma\tau = 20$, $\nu\tau = 1$ und $N = 500$.

Um den Einfluß der Fluktuationen innerhalb des Turnover-Zyklus auf den Synchronisationsprozeß zu untersuchen, werden in einer Reihe von Simulationen jeweils ein Parameter in dem stochastischen Modell variiert. Alle anderen Parameter werden konstant gehalten. Zuerst wird das Reaktionssystem untersucht, falls der Punkt, an dem die Reaktionsprodukte entstehen, $k_p = 0.2$ ist (siehe

Abb. 3.13). Unter diesen Bedingungen sind die meisten Enzyme in einer Gruppe synchronisiert.

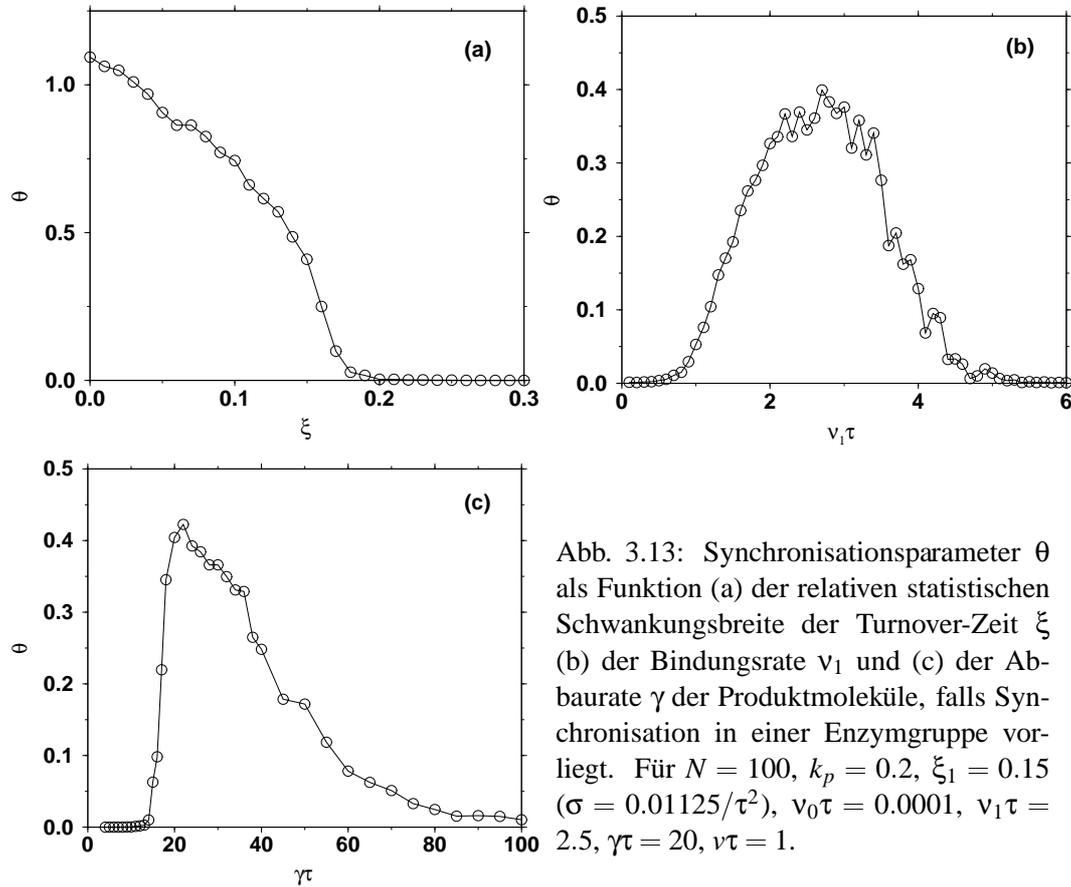


Abb. 3.13: Synchronisationsparameter θ als Funktion (a) der relativen statistischen Schwankungsbreite der Turnover-Zeit ξ (b) der Bindungsrate ν_1 und (c) der Abbaurrate γ der Produktmoleküle, falls Synchronisation in einer Enzymgruppe vorliegt. Für $N = 100$, $k_p = 0.2$, $\xi_1 = 0.15$ ($\sigma = 0.01125/\tau^2$), $\nu_0 \tau = 0.0001$, $\nu_1 \tau = 2.5$, $\gamma \tau = 20$, $\nu \tau = 1$.

Zuerst wird die Rauschintensität σ in der stochastischen Differentialgleichung (3.11), beginnend mit $\sigma = 0$, erhöht. Nachdem die transiente Phase vorüber ist, wird der Ordnungsparameter θ durch Mittelung in einem Zeitintervall von 500τ für $\sigma = 0$ berechnet. Anschließend wird σ um $5 \cdot 10^{-5}$ erhöht und nach demselben Verfahren θ erneut bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.13a dargestellt.

Für kleine Werte der Rauschintensität σ und damit der relativen statistischen Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeit (siehe Gl. (3.35), S.60) hat θ die höchsten Werte. Unter diesen Bedingungen ist die Synchronisation am stärksten ausgeprägt. Mit wachsendem ξ nimmt der Ordnungsparameter θ sukzessive ab, um bei etwa $\xi = 0.25$ zu verschwinden. Für noch höhere Werte von ξ gibt es praktisch keine Phasensynchronisation mehr zwischen den Phasen verschiedener Enzyme. Der Wert $\xi = 0.25$ bedeutet, daß 50% aller Enzyme den Enzymzyklus innerhalb des Zeitintervalls $\pm 25\%$ der mittleren Turnover-Zeit τ beenden. Als Ergebnis läßt sich feststellen, daß kleine Werte der Varianz der Turnover-Zeit die Synchronisa-

tion der Enzymzyklen erleichtern.

Als nächstes wird die Abhängigkeit der Synchronisationsstärke von der Bindungsrate v_1 der Substratmoleküle untersucht. Analog, wie oben für σ bzw. ξ beschrieben wurde, bestimmt man den Ordnungsparameter θ für wachsende Werte von v_1 . Das Resultat ist in Abb. 3.13b abgebildet. Für $v_1\tau < 0.5$ ist praktisch keine Phasensynchronisation der Enzymzustände vorhanden. Oberhalb dieses Wertes wächst mit zunehmendem v_1 auch θ monoton, um bei $v_1\tau \approx 3$ sein Maximum zu erreichen. Die weitere Erhöhung von v_1 führt interessanterweise wieder zu einer Verkleinerung von θ . Oberhalb von $v_1\tau \approx 6$ ist praktisch keine Phasensynchronisation mehr vorhanden. Hinsichtlich der Variation des Bindungsparameters v_1 existiert also ein "Fenster", innerhalb dessen die Enzymzyklen synchronisieren.

Abschließend wird noch die Abhängigkeit des Ordnungsparameters θ von der Produktabbaurate γ betrachtet. Das Ergebnis ist in Abb. 3.13c gezeigt. Für $\gamma\tau < 4$ ist keine Synchronisation der Enzymzustände vorhanden. Erhöht man γ über diese Schwelle hinaus, steigt θ sehr schnell an, um bei $\gamma\tau \approx 25$ maximal zu werden. Für noch höhere Werte von γ nimmt θ und damit die Intensität wieder ab, ohne jedoch bis $\gamma\tau = 100$ völlig zu verschwinden.

Als nächstes wird die Abhängigkeit der Synchronisationsstärke von den Parametern σ , v_1 und γ für $k_p = 0.55$, d.h. wenn die Enzyme zwei Gruppen entlang der Phasenkoordinate bilden, untersucht. Zuerst wird wieder σ und damit die Stärke der relativen Schankungsbreite ξ der Turnover-Zeit variiert. Ähnlich wie im Fall der Phasensynchronisation in einer Enzymgruppe ist die Synchronisation für sehr kleine Werte von ξ am höchsten. Wie in Abb. 3.14a erkennbar ist, steigt, beginnend von $\xi = 0$ mit wachsendem ξ , θ sogar etwas an. Allerdings ist dieser Anstieg sehr klein. Danach fällt θ mit weiter zunehmendem ξ sehr schnell, um bei etwa $\xi \approx 0.07$ völlig zu verschwinden. Die Phasensynchronisation in zwei Enzymgruppen ist also deutlich empfindlicher gegenüber Fluktuationen in der Turnover-Zeit der Enzyme als die Synchronisation in einer Enzymgruppe. Diese Sensitivität setzt sich für andere Parameter k_p , bei denen noch größere Zahlen von Enzymgruppen entstehen können, fort. Wie Untersuchungen des stochastischen Modells zeigen, treten für $k_p = 0.8$ beispielsweise vier Enzymgruppen entlang der Reaktionskoordinate auf, allerdings muß dazu $\xi < 0.04$ sein.

Nun wird in Abb. 3.14b die Abhängigkeit des Ordnungsparameters θ bei Variation der Substratbindungsrate v_1 betrachtet. Wie bereits im Fall von Phasensynchronisation in einer Enzymgruppe tritt auch für zwei Enzymgruppen ein Parameterfenster auf, innerhalb dessen Phasensynchronisation in zwei Enzymgruppen möglich ist. Auch diese Eigenschaft ist typisch und läßt sich auch bei größeren Zahlen enzymatischer Gruppen finden.

Zuletzt soll noch die Abhängigkeit der Synchronisationsintensität unter Variation der Abbaurate γ der regulatorischen Produktmoleküle untersucht werden. Auch hier zeigt sich, wie in Abb. 3.14c erkennbar ist, eine sehr ähnliche Parame-

terabhängigkeit der Synchronisationsstärke wie für eine Enzymgruppe. Oberhalb eines bestimmten Wertes γ , der im hier vorliegenden Fall von zwei Enzymgruppen etwas höher bei $\gamma \approx 12\tau^{-1}$ liegt, steigt θ sehr schnell an, um bei $\gamma \approx 30\tau^{-1}$ maximal zu werden und für noch höhere Werte von γ wieder zu sinken. Wie bereits in Abb 3.13c erkennbar war, verschwindet selbst für $\gamma\tau = 100$ die Phasensynchronisation nicht. Sie ist hier im Fall von zwei Enzymgruppen sogar noch deutlich höher.

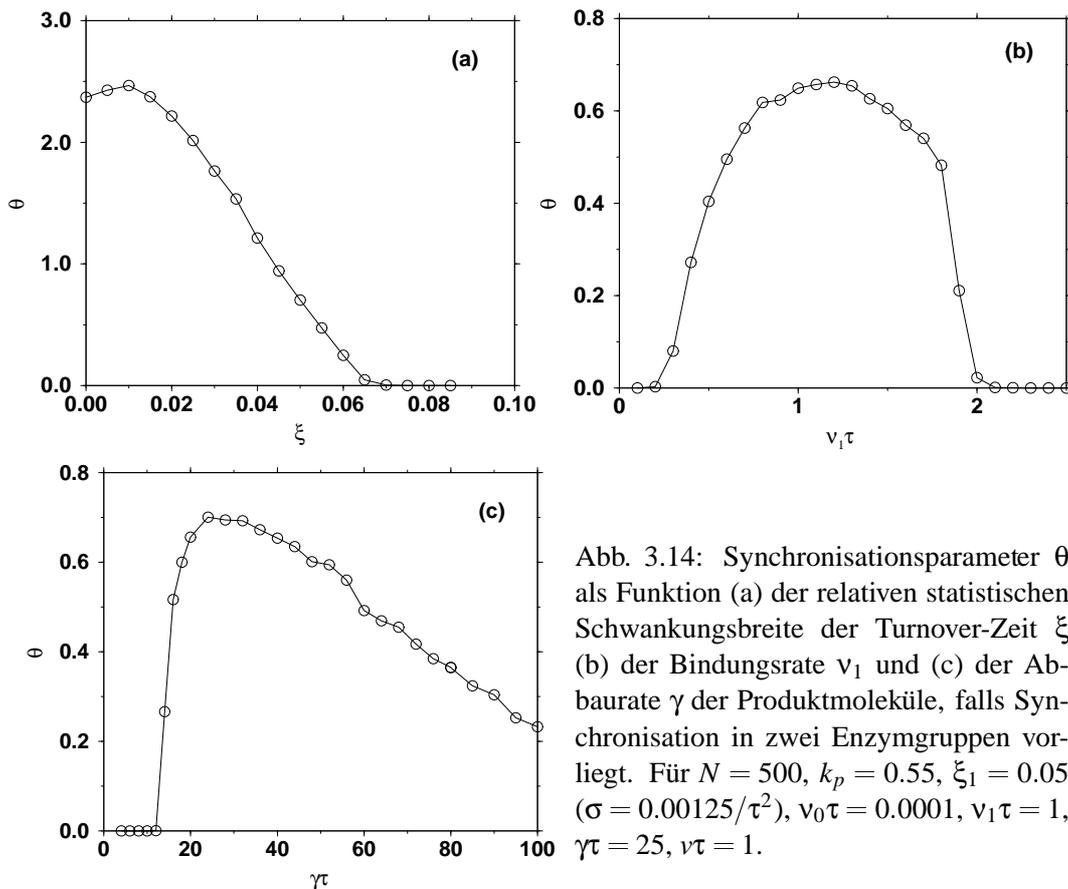


Abb. 3.14: Synchronisationsparameter θ als Funktion (a) der relativen statistischen Schwankungsbreite der Turnover-Zeit ξ (b) der Bindungsrate ν_1 und (c) der Abbaurrate γ der Produktmoleküle, falls Synchronisation in zwei Enzymgruppen vorliegt. Für $N = 500$, $k_p = 0.55$, $\xi_1 = 0.05$ ($\sigma = 0.00125/\tau^2$), $\nu_0\tau = 0.0001$, $\nu_1\tau = 1$, $\gamma\tau = 25$, $\nu\tau = 1$.

Die Parameter, für die Phasensynchronisation einsetzt, hängen von der Zahl N der Enzyme ab. Bei der Analyse des Meanfield-Modells, das zu dem in diesem Kapitel untersuchten stochastischen Modell im Limes großer Enzymzahlen korrespondiert, ergibt sich ein einfacher Zusammenhang zwischen der Bindungsrate ν_1 und der Enzymzahl N (Kapitel 4, S. 91). Bei der Betrachtung der Meanfield-Gleichungen bemerkt man, daß diese für irgendeine beliebige Konstante c invariant unter der Skalentransformation $\nu_1 \rightarrow \nu_1/c$, $m \rightarrow cm$ und $n \rightarrow cn$ sind. Diese Transformation bedeutet einfach, daß, falls die Gesamtzahl N der Enzyme um einen Faktor c verändert wird, sich die Zahl der Reaktionsprodukte und Substrat-

moleküle proportional ändert.

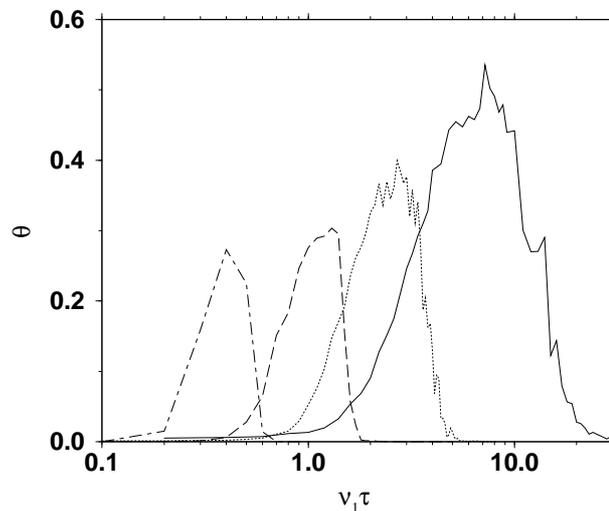


Abb. 3.15: Synchronisationsparameter θ als Funktion der Bindungsrate ν_1 für $N = 50$ (durchgezogene L.), $N = 100$ (gepunktete L.), $N = 200$ (gestrichelte L.) und $N = 500$ (Strichpunkt.). Für $\nu_0 \tau = 0.001$, $\nu \tau = 1$, $k_p = 0.2$, $\xi = 0.2$ ($\sigma = 0.02/\tau^2$) und $\gamma \tau = 20$.

Diese Eigenschaft der Skaleninvarianz findet sich für große Enzymzahlen auch im stochastischen Modell wieder. Setzt z.B. für $N = 200$ oberhalb von $\nu_1 \tau = 0.5 \tau$ Phasensynchronisation ein, so erhöht sich diese Schwelle im Fall von $N = 100$ Enzyme auf $\nu_1 \tau = 1$. Während jedoch im Meanfield-Modell des Reaktionssystems, das im nächsten Abschnitt untersucht wird, diese Beziehung zwischen N und ν_1 exakt ist, stimmt dieser Zusammenhang für sehr kleine Enzymzahlen -und damit verbundenen starken Fluktuationen in der Zahl der Produktmoleküle- im stochastischen Modell nicht mehr. Für sehr kleine Enzymzahlen erstreckt sich die Phasensynchronisation überraschenderweise über wesentlich größere Parameterintervalle. Diese Eigenschaft soll zuerst am Beispiel des Einflusses der Bindungsrate ν_1 betrachtet werden.

In Abb. 3.15 ist für verschiedene Enzymzahlen die Synchronisationsstärke θ als Funktion der Bindungsrate ν_1 gezeigt. Diese Ergebnisse wurden nach derselben Methode wie in den Abb. 3.13b und Abb. 3.14b erhalten. Qualitativ verläuft die Abhängigkeit des Ordnungsparameters θ von ν_1 gleich. Für alle betrachteten Enzymzahlen existiert ein Parameterintervall für ν_1 , innerhalb dessen Synchronisation der Enzymzustände auftritt. Vergleicht man jedoch den Verlauf von θ für $N = 50$ (durchgezogene Linie), so erkennt man, daß dieser viel größer ist als für $N = 500$ (Strichpunktlinie). Falls jedoch die bereits erwähnte Skaleninvarianz (Abschnitt 4.2, S. 91) exakt gültig wäre, müßten in der logarithmischen Darstellung von Abb. 3.15 sowohl für $N = 50$ als auch für $N = 500$ das Parameterintervall von ν_1 , innerhalb dessen Synchronisation existiert, gleich groß sein. So erstreckt

sich dieses Intervall für $N = 500$ von $\nu_1 \approx 0.2$ bis $\nu_1 \approx 0.7$. Hingegen verläuft dieses Parameterintervall für $N = 50$ nicht von $\nu_1 \approx 2$ bis $\nu_1 \approx 7$, wie das aus der Skaleninvarianz folgen würde, sondern von $\nu_1 \approx 0.5$ bis $\nu_1 \approx 25$. Diese Beobachtung, daß die Synchronisationsintervalle für kleine Enzymzahlen überproportional anwachsen gilt auch für größere Zahlen von Enzymgruppen.

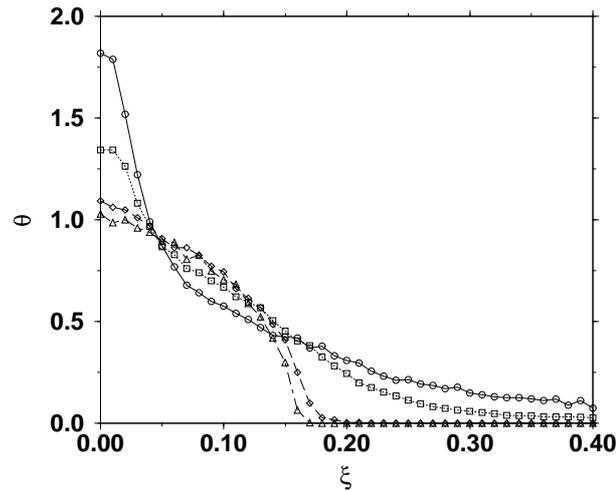


Abb. 3.16: Synchronisationsparameter θ als Funktion der relativen Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeit im Fall einer Enzymgruppe für $N = 10$ und $\nu_1 \tau = 25$ (durchgezogene L.), $N = 50$ und $\nu_1 \tau = 5$ (gepunktete L.), $N = 100$ und $\nu_1 \tau = 2.5$ (gestrichelte L.) sowie $N = 250$ und $\nu_1 \tau = 1$ (Strichpunkt.). Für $\nu_0 \tau = 0.001$, $\nu \tau = 1$, $k_p = 0.2$, ($\sigma = 0.02/\tau^2$) und $\gamma \tau = 20$.

Nun werden die Auswirkungen der Enzymzahl N auf die Phasensynchronisation bei Variation der relativen Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeit untersucht. Das Ergebnis ist für $k_p = 0.2$ (Synchronisation in einer Enzymgruppe) in Abb. 3.16 gezeigt. Der Ordnungsparameter θ wurde unter Variation von ξ wie in Abb. 3.13a und Abb. 3.14a durch Simulationen des stochastischen Modells bestimmt. Der qualitative Verlauf von θ als Funktion von ξ ist für alle Enzymzahlen N ähnlich. Für kleine Werte von ξ ist die Synchronisation am höchsten, um mit wachsendem ξ stetig abzunehmen. Um die Vergleichbarkeit für verschiedene N zu gewährleisten, wurde wieder die oben beschriebene Skaleninvarianz ausgenutzt. Betrachtet man die Abhängigkeit des Ordnungsparameters θ von ξ für $N = 10$ (durchgezogene Linie), so sieht man, daß selbst für $\xi = 0.4$ noch Phasensynchronisation vorhanden ist. Im Gegensatz dazu verschwindet für $N = 100$ die Synchronisation bereits bei $\xi \approx 0.2$. Interessant ist auch, daß sich der Verlauf von θ für noch höhere Werte von N kaum noch verändern. Daraus läßt sich schließen, daß unter den gewählten Bedingungen bereits oberhalb von $N = 100$ das System gut durch die Meanfield-Näherung beschrieben werden kann.

Als letztes wird noch die Abhängigkeit der Synchronisationsstärke θ von ξ für $k_p = 0.55$ (zwei Enzymgruppen) bestimmt. Genauso wie im eben diskutierten Fall einer Enzymgruppe ist θ als Funktion von ξ wieder für verschiedene N in Abb. 3.17 abgebildet. Auch hier gibt es für $N = 10$ (durchgezogene Linie) noch bei deutlich höheren Werten von ξ Phasensynchronisation als für größere Enzymzahlen N . Jedoch sind die Unterschiede nicht so groß wie in Abb. 3.16. Obwohl die Kurven θ als Funktion von ξ für $N = 100$ (gestrichelte Linie) und $N = 250$ (Strichpunktlinie) in Abb. 3.17 eingezeichnet sind, ist deren Verlauf so ähnlich, daß die Unterschiede zwischen beiden kaum beobachtbar sind. Daraus folgt, daß im Fall von zwei Enzymgruppen die Skaleninvarianz bereits unterhalb von $N = 100$ gültig ist.

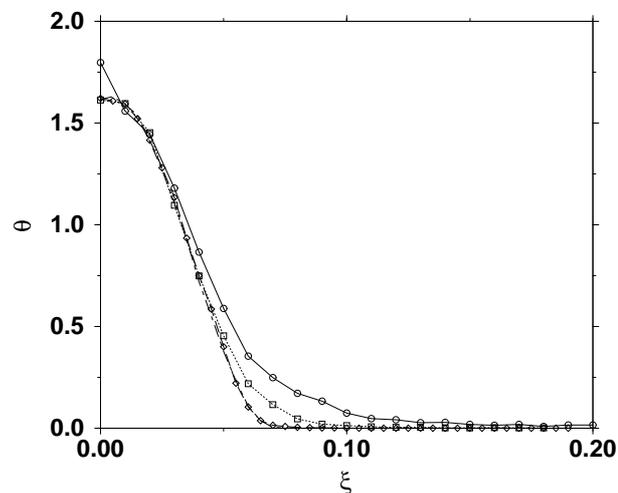


Abb. 3.17: Synchronisationsparameter θ als Funktion der relativen Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeit im Fall von zwei Enzymgruppen für $N = 10$ und $\nu_1 \tau = 25$ (durchgezogene L.), $N = 50$ und $\nu_1 \tau = 5$ (gepunktete L.), $N = 100$ und $\nu_1 \tau = 2.5$ (gestrichelte L.) sowie $N = 250$ und $\nu_1 \tau = 1$ (Strichpunktline.). Für $\nu_0 \tau = 0.001$, $\nu \tau = 1$, $k_p = 0.2$, ($\sigma = 0.02/\tau^2$) und $\gamma \tau = 20$.

Die Simulationen des stochastischen Modells können für verschiedene Parameter durchgeführt werden und führen zu vielen neuen Informationen über das Systemverhalten. Allerdings erlauben sie keine Voraussagen und Abschätzungen zur Lage der Synchronisationsschwellen und Synchronisationseigenschaften. Daher werden im nächsten Abschnitt makroskopische Gleichungen für die Mittelwerte der Enzyme entlang der Reaktionskoordinate und die Reaktionsprodukte hergeleitet, die das Reaktionssystem im Limes großer Enzymzahlen erfassen.

Kapitel 4

Die Meanfield-Näherung des produktaktivierten Enzymsystems

Im letzten Kapitel wurde für eine einfache allosterisch aktivierte Enzymreaktion ein stochastisches Modell eingeführt und mithilfe numerischer Simulationen untersucht. Für dieses Reaktionssystem wird in diesem Kapitel die Mastergleichung aufgestellt. Unter Verwendung dieser Mastergleichung werden die Gleichungen für die zeitliche Dynamik der Mittelwerte hergeleitet. Im Spezialfall vernachlässigbar geringer Fluktuationen innerhalb des Enzymzyklus ergeben sich daraus zwei einfache “Delay-Gleichungen”. Die danach durchgeführte lineare Stabilitätsanalyse der Delay-Gleichungen ermöglicht die Untersuchung des Einflusses der Parameter auf das Systemverhalten.

4.1 Herleitung der Meanfield-Gleichungen aus der Mastergleichung

Die Mastergleichung für ein einzelnes Enzym

In diesem Abschnitt werden Wahrscheinlichkeitsmaße für die Zustände des in Kapitel 3 untersuchten Reaktionssystems einer produktaktivierten Enzymreaktion eingeführt. Wegen der internen Dynamik des Reaktionssystems sind diese Wahrscheinlichkeitsverteilungen zeitabhängig. Für die zeitliche Änderung dieser Wahrscheinlichkeitsverteilungen kann eine Bilanzgleichung – die Mastergleichung – aufgestellt werden, die die Übergänge in einen bestimmten Zustand und aus diesem Zustand erfaßt [178, 49, 181, 15, 179] (siehe Anhang A).

Zuerst wird die Mastergleichung für den Fall eines einzelnen Enzyms im Reaktionssystem aufgestellt. Der vollständige enzymatische Prozeß besteht aus zwei Teilen. Im ersten Teil verweilt das Enzym im Grundzustand. In diesem Zustand

laufen keine dynamischen Prozesse an dem Enzym ab. Die Bindung eines Substratmoleküls¹ mit der Bindungsrate $v(m)$ beendet diese Wartezeit und initialisiert den zweiten Teil des Enzymzyklus. Dieser Teil wird als Diffusions-Driftprozeß entlang der Phasenvariablen (Reaktionskoordinate) ϕ mit der Geschwindigkeit v und der Diffusionskonstante σ beschrieben. Die Wahrscheinlichkeitsdichte, das Enzym am Phasenpunkt ϕ anzutreffen, falls gleichzeitig m Produktmoleküle vorhanden sind, ist $P(\phi, m)$. Die Produktmoleküle m haben nur eine endliche Lebensdauer und reagieren mit der Rate γ zu anderen Molekülen, die nicht mehr an der hier betrachteten Reaktion beteiligt sind. Entsprechend gilt für die Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung $P(\phi, m, t)$ der Enzyme entlang der Reaktionskoordinate die folgende Mastergleichung

$$\begin{aligned} \frac{\partial P(\phi, m)}{\partial t} = & -v \frac{\partial P(\phi, m)}{\partial \phi} + \sigma \frac{\partial^2 P(\phi, m)}{\partial \phi^2} \\ & + \gamma[(m+1)P(\phi, m+1) - mP(\phi, m)]. \end{aligned} \quad (4.1)$$

Der erste Term auf der rechten Seite von Gl. (4.1) beschreibt die Änderung der Wahrscheinlichkeitsdichte $P(\phi, m)$ durch die Drift des Enzymzustandes entlang der Phase ϕ mit der Geschwindigkeit v . Der Einfluß der Diffusion mit der Diffusionskonstante σ ergibt sich durch den zweiten Term. An letzter Stelle auf der rechten Seite dieser Gleichung wird die Änderung der Wahrscheinlichkeitsdichte durch den Abbau der Reaktionsprodukte mit der Rate γ beschrieben.

Darüberhinaus gibt es den besonderen Punkt $\phi = k_p$ innerhalb des Enzymzyklus, an dem die Reaktionsprodukte irreversibel freigesetzt werden². Es ist deshalb günstig, das gesamte Intervall $0 < \phi \leq 1$ der Reaktionskoordinate in zwei Segmente $(0, k_p - \varepsilon]$ und $(k_p, 1]$ einzuteilen und für beide Teilintervalle die Randbedingungen an den Enden zu formulieren. Die Bezeichnung $k_p - \varepsilon$ soll den rechten Randpunkt des linken Intervalls $(0, k_p - \varepsilon]$ beschreiben. Die Zahl der freien Produktmoleküle m erhöht sich um 1, sobald der Punkt k_p im Zyklus durch das Enzym erreicht wird. Wegen der Irreversibilität der Produktentstehung stellt $k_p - \varepsilon$ einen absorbierenden rechten Rand des Teilintervalls $(0, k_p - \varepsilon]$ dar. Daraus ergibt sich, falls $\sigma > 0$ ist, die Randbedingung

$$P(k_p - \varepsilon, m) = 0. \quad (4.2)$$

Im Spezialfall $\sigma = 0$ liegt nur ein Driftprozeß mit der Geschwindigkeit v vor. Dann gilt diese Randbedingung nicht. Innerhalb des Teilintervalls $(k_p, 1]$ befindet sich

¹Wie in Abschnitt 3.1 erläutert wurde, ist Substrat im Überschuß vorhanden. Dessen Konzentration wird im betrachteten Zeitbereich durch die ablaufende Reaktion praktisch nicht verändert. Die Substratkonzentration geht nur indirekt durch den Wert der Substratbindungsrate $v(m)$ in das Modell ein.

²Rekombinationen oder Rückreaktionen werden ausgeschlossen.

das Enzym in der Relaxationsphase, um danach in den Grundzustand zurückzukehren. Der Fluß durch den linken Rand $\phi = k_p - \varepsilon$ muß gleich dem Fluß durch den rechten Rand des Intervalls $(0, k_p - \varepsilon]$ sein. Man erhält deshalb

$$\left[vP(\phi, m+1) - \sigma \frac{\partial P(\phi, m+1)}{\partial \phi} \right]_{\phi=k_p} = \left[vP(k_p - \varepsilon, m) - \sigma \frac{\partial P(\phi, m)}{\partial \phi} \right]_{\phi=k_p - \varepsilon}. \quad (4.3)$$

Zur Vereinfachung der Schreibweise wird der Fluß der Wahrscheinlichkeitsdichte durch

$$F(\phi, m) = vP(\phi, m) - \sigma \frac{\partial P(\phi, m)}{\partial \phi} \quad (4.4)$$

abgekürzt. Dann kann Gl. 4.3 zu

$$F(k_p, m+1) = F(k_p - \varepsilon, m) \quad (4.5)$$

vereinfacht werden.

Sobald das Enzym den Phasenpunkt $\phi = 1$ erreicht hat, ist dessen Zyklus beendet, und es kehrt in den Grundzustand zurück. Im Spezialfall $\sigma = 0$ liegt nur ein Driftprozeß mit der Geschwindigkeit v vor. Die Überquerung des Punktes $\phi = 1$ ist dann in jedem Fall unumkehrbar. Falls hingegen $\sigma > 0$ gilt, wird eine zusätzliche Randbedingung benötigt. In diesem Fall ist der rechte Rand $\phi = 1$ im Intervall $(k_p, 1]$ absorbierend, und es gilt

$$P(1, m) = 0. \quad (4.6)$$

Zusätzlich zur Mastergleichung (4.1) wird zur vollständigen Beschreibung des Gesamtsystems noch die Gleichung für die zeitliche Änderung der Wahrscheinlichkeit $Q(m)$ benötigt. Diese gibt die Wahrscheinlichkeit an, das Enzym im Grundzustand bei gleichzeitiger Anwesenheit von m freien Produktmolekülen vorzufinden. Die Wahrscheinlichkeit $Q(m)$ beschreibt demnach den ersten Teil des enzymatischen Prozesses (die Wartezeit im Grundzustand), während $P(\phi, m)$ die Aufenthaltswahrscheinlichkeitsdichte des Enzyms im Enzymzyklus angibt. Die Wahrscheinlichkeit $Q(m)$ erhöht sich durch den Wahrscheinlichkeitsfluß $F(\phi, m)$ an der Stelle $\phi = 1$, der die Rückkehr des Enzyms zum Zeitpunkt t in den Grundzustand beschreibt und verringert sich mit der Rate $v(m)$ durch die Bindung eines Substratmoleküls und damit dem Verlassen des Grundzustands. Zusätzlich muß wieder der Einfluß des Abbaus der Reaktionsprodukte mit der Rate γ auf die Wahrscheinlichkeit $Q(m)$ berücksichtigt werden. Die Mastergleichung für $Q(m)$ lautet demnach

$$\begin{aligned} \frac{\partial Q(m)}{\partial t} &= F(1, m) - v(m)Q(m) \\ &+ \gamma[(m+1)Q(m+1) - mQ(m)]. \end{aligned} \quad (4.7)$$

Der Wahrscheinlichkeitsfluß durch den linken Rand $\phi = 0$ des Intervalls $(0, k_p - \varepsilon]$ ist durch die Wahrscheinlichkeit der Bindung eines Substratmoleküls durch das Enzym

$$F(0, m) = \left[vP(\phi, m) - \sigma \frac{\partial P(\phi, m)}{\partial \phi} \right]_{\phi=0} = v(m)Q(m) \quad (4.8)$$

gegeben. Die Randbedingung (4.8) stellt die Beziehung zwischen Gl. (4.1) und (4.7) her.

Das Enzym kann sich entweder im diskreten Grundzustand oder an einem Punkt des Enzymzyklus, beschrieben durch die kontinuierliche Phasenvariable ϕ , aufhalten. Ähnliche Kombinationen von kontinuierlichen und diskreten Zustandsverteilungen können bei Stoßprozessen auftreten. Dort handelt es sich um Geschwindigkeitsverteilungen, die sich aus einer kontinuierlichen Verteilung und einer Deltafunktion zusammensetzen [182].

Die beiden Mastergleichungen (4.1) und (4.7) können zu einer einzigen Gleichung zusammengefaßt werden. Dazu führt man die Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung

$$\Pi(\phi, m) = P(\phi, m) + Q(m)\delta(\phi) \quad (4.9)$$

ein. Die gemeinsame Mastergleichung zur Beschreibung der Prozesse im Grundzustand und im Phasenzyklus lautet dann

$$\begin{aligned} \frac{\partial \Pi(\phi, m)}{\partial t} = & -v \frac{\partial \Pi(\phi, m)}{\partial \phi} + \sigma \frac{\partial^2 \Pi(\phi, m)}{\partial \phi^2} \\ & + \gamma[(m+1)\Pi(\phi, m+1) - m\Pi(\phi, m)]. \end{aligned} \quad (4.10)$$

Die Verwendung dieser Mastergleichung anstelle von Gl. (4.1) und (4.7) ist für die Herleitung der Meanfield-Gleichungen nicht zwingend erforderlich, erweist sich aber für die Diskussion der Mastergleichung für ein Reaktionssystem mit N Enzymen als günstig.

Um zu zeigen, daß Gl. (4.10) wirklich die beiden Mastergleichungen (4.1) und (4.7) einschließt, wird diese Gleichung für $\phi \neq 0$ und am Punkt $\phi = 0$ untersucht. Das Einsetzen von Gl. (4.9) in die Mastergleichung (4.10) ergibt

$$\begin{aligned} \frac{\partial P(\phi, m)}{\partial t} + \delta(\phi) \frac{\partial Q(m)}{\partial t} = & -v \frac{\partial P(\phi, m)}{\partial \phi} - vQ(m) \frac{\partial \delta(\phi)}{\partial \phi} \\ & + \sigma \frac{\partial^2 P(\phi, m)}{\partial \phi^2} + \sigma Q(m) \frac{\partial^2 \delta(\phi)}{\partial \phi^2} \\ & + \gamma[(m+1)(P(\phi, m+1) + Q(m+1)\delta(\phi)) \\ & - m(P(\phi, m) + Q(m)\delta(\phi))]. \end{aligned} \quad (4.11)$$

Aus Gl. (4.11) folgt speziell für $\phi \neq 0$ sofort die Mastergleichung (4.1). Nun werden die Eigenschaften der Gl. (4.11) am diskreten Punkt $\phi = 0$ betrachtet. Durch Integration $\lim_{\varepsilon \rightarrow \infty} \int_{-\varepsilon}^{+\varepsilon}$ dieser Gleichung bezüglich ϕ um den Nullpunkt unter Beachtung von

$$\lim_{\varepsilon \rightarrow \infty} \int_{-\varepsilon}^{+\varepsilon} P(\phi, m) d\phi = 0$$

(Menge vom Maß Null) und

$$\begin{aligned} & \lim_{\varepsilon \rightarrow \infty} \int_{-\varepsilon}^{+\varepsilon} \partial_t P(\phi, m) d\phi \\ &= \lim_{\varepsilon \rightarrow \infty} \left(-vP(+\varepsilon, m) + \sigma \frac{\partial P(+\varepsilon, m)}{\partial \phi} + vP(-\varepsilon, m) - \sigma \frac{\partial P(-\varepsilon, m)}{\partial \phi} \right) \\ &= \left[vP(\phi, m) - \sigma \frac{\partial P(\phi, m)}{\partial \phi} \right]_{\phi=0} - \left[vP(\phi, m) - \sigma \frac{\partial P(\phi, m)}{\partial \phi} \right]_{\phi=1} \end{aligned}$$

folgt mit der vereinbarten Definition (4.4) für den Fluß $F(\phi, m)$

$$\frac{\partial Q(m)}{\partial t} = F(1, m) - F(0, m) + \gamma[(m+1)Q(m+1) - mQ(m)]. \quad (4.12)$$

Unter Verwendung der Randbedingung (4.8) ergibt sich also die Mastergleichung (4.7). Damit ist gezeigt, daß die Mastergleichung (4.10) die beiden Gleichungen (4.1) und (4.7) enthält.

Die Mastergleichung für N Enzyme

Falls anstatt eines einzigen Enzyms N Enzyme im Reaktionssystem existieren, wird der Systemzustand durch die Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung $\Pi(\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_N, m)$ beschrieben. Die Mastergleichung (4.10) für das Ein-Enzymsystem läßt sich auf N Enzyme erweitern und lautet

$$\begin{aligned} \frac{\partial \Pi(\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_N, m)}{\partial t} &= -v \sum_i \frac{\partial \Pi(\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_N, m)}{\partial \phi_i} + \sigma \frac{\partial^2 \Pi(\phi, m)}{\partial \phi^2} \\ &\gamma[(m+1)\Pi(\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_N, m+1) - m\Pi(\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_N, m)]. \end{aligned} \quad (4.13)$$

Die Wahrscheinlichkeitsdichte $\Pi(\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_N, m)$ setzt sich wieder aus den Aufenthaltswahrscheinlichkeiten Q für die Enzyme im Grundzustand und die Wahrscheinlichkeitsdichten P , Enzyme innerhalb des Enzymzyklus zu finden, zusammen. So ergibt sich beispielsweise als Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung

$\Pi(\phi_1, \phi_2, m)$ für zwei Enzyme

$$\begin{aligned}\Pi(\phi_1, \phi_2, m) &= [P_1(\phi_1, m) + Q_1(m)\delta(\phi_1)] [P_2(\phi_2, m) + Q_2(m)\delta(\phi_2)] \\ &= P_{1,2}(\phi_1, \phi_2, m) + P_1(\phi_1, m)Q_2(m)\delta(\phi_2) \\ &\quad + P_2(\phi_2, m)Q_1(m)\delta(\phi_1) + Q_{1,2}(m)\delta(\phi_1)\delta(\phi_2)\end{aligned}\quad (4.14)$$

und allgemein für N Enzyme

$$\begin{aligned}\Pi(\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_N, m) &= [P_1(\phi_1, m) + Q_1(m)\delta(\phi_1)] [P_2(\phi_2, m) + Q_2(m)\delta(\phi_2)] \dots \\ &\quad [P_N(\phi_N, m) + Q_N(m)\delta(\phi_N)] = \prod_{i=1}^N [P_i(\phi_i, m) + Q_i(m)\delta(\phi_i)].\end{aligned}\quad (4.15)$$

Für N Enzyme gibt es somit 2^N Funktionen $P_{\dots, i, i+1, \dots}$ und $Q_{\dots, i, i+1, \dots}$. Da die Anzahl der unabhängigen Variablen in der Mastergleichung (4.13) $N + 2$ beträgt (N Phasenvariablen, die Zahl der freien Produktmoleküle und die Zeit), ist diese nur schwer handhabbar.

Die Mastergleichung soll zur Herleitung der Meanfield-Gleichungen für die Mittelwerte der Enzymkonzentration entlang der Reaktionskoordinate und der Konzentration der Reaktionsprodukte verwendet werden. Um dieses Problem zu vereinfachen, werden zwei Eigenschaften des Enzymsystems ausgenutzt. Erstens sind Wechselwirkungen zwischen den Phasenzuständen verschiedener Enzyme nur durch die Freisetzung und Bindung regulatorischer Produktmoleküle möglich. Innerhalb des Enzymzyklus ist die Änderung der Phase ϕ_i des Enzyms i ein Diffusionsprozeß mit der Diffusionskonstanten σ und der Driftgeschwindigkeit v . Die beiden Parameter v und σ sind nur von ϕ_i abhängig und nicht von den Zuständen der anderen Enzyme. Die Verweildauer eines Enzyms im Grundzustand ist ebenfalls unabhängig vom Zustand der anderen Enzyme und wird ausschließlich durch die Zahl m der freien Produktmoleküle beeinflusst. Nur über die Produktmoleküle kommt eine indirekte Kopplung der Enzymzustände unterschiedlicher Enzyme zustande. Als Konsequenz folgt daraus, daß die Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung $\Pi(\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_N, m)$ in

$$\Pi(\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_N, m) = \Pi(\phi_1, m) \cdot \Pi(\phi_2, m) \cdot \dots \cdot \Pi(\phi_N, m) \quad (4.16)$$

zerlegt werden kann. Zweitens wird in dieser Arbeit davon ausgegangen, daß alle N Enzyme identisch sind. Deshalb gilt

$$\Pi(\phi_i, m) = \Pi(\phi_j, m), i \neq j. \quad (4.17)$$

Es muß ausdrücklich betont werden, daß die Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung $\Pi(\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_N, m)$ nicht bezüglich der Zahl m der freien Produktmoleküle faktorisiert. Es gilt also keineswegs

$$\Pi(\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_N, m) = \Pi(\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_N)\Pi(m),$$

denn zwischen den Phasenzuständen und den Produktmolekülen existieren Wechselwirkungen. Die Eigenschaft (4.16) kann beispielsweise bei der Integration entlang der Phasenvariablen ausgenutzt werden. Sucht man z.B. die Wahrscheinlichkeit $G(m)$, m Produktmoleküle im Reaktionssystem vorzufinden, so erhält man diese durch Integration

$$\begin{aligned} G(m) &= \int_0^1 \dots \int_0^1 \Pi(\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_N, m) d\phi_1 \dots d\phi_N \\ &= \int_0^1 \Pi(\phi_1, m) d\phi_1 \dots \int_0^1 \Pi(\phi_N, m) d\phi_N \end{aligned}$$

entlang der Phasenvariable ϕ . Die Funktion $G(m)$ kann daher direkt aus der Mastergleichung (4.10) bzw. den Gl. (4.1) und (4.7) des Ein-Enzymsystems hergeleitet werden. Mit Hilfe von $G(m)$ kann durch

$$\langle m \rangle = \sum_{m=0}^{\infty} m G(m)$$

sofort der Mittelwert der Produktmoleküle berechnet werden.

Herleitung der Meanfield-Gleichungen

Aus den Mastergleichungen (4.1) und (4.7) für das Ein-Enzymsystem werden nun die Gleichungen der Meanfield-Näherung hergeleitet. Die Dichteverteilung $\tilde{n}(\phi)$ der Enzymkonzentration entlang der Reaktionskoordinate ist durch

$$\tilde{n}(\phi) = N \sum_{m=0}^{\infty} P(\phi, m) \quad (4.18)$$

gegeben. Aus Gl. (4.1) und (4.18) folgt

$$\begin{aligned} \frac{\partial \tilde{n}(\phi)}{\partial t} &= N \sum_{m=0}^{\infty} \left\{ -v \frac{\partial P(\phi, m)}{\partial \phi} + \sigma \frac{\partial^2 P(\phi, m)}{\partial \phi^2} \right. \\ &\quad \left. + \gamma [(m+1)P(\phi, m+1) - mP(\phi, m)] \right\}. \end{aligned}$$

Berücksichtigt man noch, daß

$$\begin{aligned} &\sum_{m=0}^{\infty} [(m+1)P(\phi, m+1) - mP(\phi, m)] \\ &= \sum_{m=1}^{\infty} [mP(\phi, m) - mP(\phi, m)] = 0 \end{aligned} \quad (4.19)$$

und gilt, so ergibt sich aus diesen Beziehungen

$$\frac{\partial \tilde{n}(\phi)}{\partial t} = -v \frac{\partial \tilde{n}(\phi)}{\partial \phi} + \sigma \frac{\partial^2 \tilde{n}(\phi)}{\partial \phi^2}. \quad (4.20)$$

Der Fluß der Konzentrationsdichte der Enzyme im Phasenpunkt ϕ wird im Folgenden durch

$$f(\phi) = v\tilde{n}(\phi) - \sigma \frac{\partial \tilde{n}(\phi)}{\partial \phi} \quad (4.21)$$

abgekürzt. Die Randbedingungen für Gl. (4.20) folgen aus den Randbedingungen (4.2) und (4.3) der Mastergleichung und führen sofort zu

$$\tilde{n}(k_p - \varepsilon) = 0 \quad (4.22)$$

sowie

$$f(k_p) = \left[v\tilde{n}(\phi) - \sigma \frac{\partial \tilde{n}(\phi)}{\partial \phi} \right]_{\phi=k_p} = -\sigma \frac{\partial \tilde{n}(\phi)}{\partial \phi} \Big|_{\phi=k_p - \varepsilon}. \quad (4.23)$$

Der Mittelwert $n = N \sum_{m=0}^{\infty} Q(m)$ der Enzyme im Grundzustand ergibt sich aus der Differenz der Gesamtzahl der Enzyme und der Zahl der Enzyme die sich innerhalb des Enzymzyklus befinden, zu

$$n = N - \int_0^1 \tilde{n}(\phi) d\phi. \quad (4.24)$$

Unter Verwendung von Gl. (4.20) gilt somit

$$\begin{aligned} \frac{dn}{dt} &= - \int_0^1 \partial_t \tilde{n}(\phi) d\phi = \int_0^1 \left(v \partial_\phi \tilde{n}(\phi) - \sigma \partial_\phi^2 \tilde{n}(\phi) \right) d\phi \\ &= f(1) - f(0). \end{aligned} \quad (4.25)$$

Benutzt man die zu Gl. (4.8) entsprechende Randbedingung für $\tilde{n}(\phi)$ an der Stelle $\phi = 0$

$$f(0) = \left[v\tilde{n}(\phi) - \sigma \frac{\partial \tilde{n}(\phi)}{\partial \phi} \right]_{\phi=0} = v(m)n, \quad (4.26)$$

ergibt sich aus Gl. (4.25)

$$\frac{dn}{dt} = -v(t)n(t) + f(1). \quad (4.27)$$

Diese Gleichung beschreibt die Dynamik des Mittelwertes der Enzymkonzentration im Grundzustand. Durch die Produktabhängigkeit der Rate $v(m)$ benötigt man noch eine Gleichung für den Mittelwert der Reaktionsprodukte.

Die Wahrscheinlichkeit $G(m)$, m freie Produktmoleküle vorzufinden, ist

$$G(m) = \int_0^{k_p - \varepsilon} P(\phi, m) d\phi + \int_{k_p}^1 P(\phi, m) d\phi + Q(m). \quad (4.28)$$

Daraus folgt

$$\frac{dG(m)}{dt} = \int_0^{k_p - \varepsilon} \partial_t P(\phi, m) d\phi + \int_{k_p}^1 \partial_t P(\phi, m) d\phi + \partial_t Q(m).$$

$\partial_t P(\phi, m)$ wird durch die rechte Seite der Mastergleichungen (4.1) und $\partial_t Q(m)$ durch die rechte Seite der Mastergleichung (4.7) substituiert. Dann ergibt sich

$$\begin{aligned} \frac{dG(m)}{dt} &= -v[P(k_p - \varepsilon, m) - P(0, m)] \\ &+ \sigma \left[\frac{\partial P(\phi, m)}{\partial \phi} \Big|_{\phi=k_p - \varepsilon} - \frac{\partial P(\phi, m)}{\partial \phi} \Big|_{\phi=0} \right] \\ &- v[P(1, m) - P(k_p, m)] + \sigma \left[\frac{\partial P(\phi, m)}{\partial \phi} \Big|_{\phi=1} - \frac{\partial P(\phi, m)}{\partial \phi} \Big|_{\phi=k_p} \right] \\ &+ F(1, m) - v(m)Q(m) + \gamma[(m+1)G(m+1) - mG(m)]. \end{aligned} \quad (4.29)$$

Wegen der Randbedingungen (4.3) kann $P(k_p - \varepsilon, m)$ durch $P(k_p, m)$ ersetzt werden. Darüberhinaus erlaubt die Ausnutzung der Randbedingung (4.8) die Eliminierung von $v(m)Q(m)$ in Gl. (4.29). Zur Vereinfachung der Schreibweise wird der Fluß an einem bestimmten Phasenpunkt wieder durch

$$F(\phi, m) = vP(\phi, m) - \sigma \frac{\partial P(\phi, m)}{\partial \phi}$$

abgekürzt. Es folgt

$$\begin{aligned} \frac{dG(m)}{dt} &= F(0, m) - F(k_p, m+1) + F(k_p, m) - F(1, m) + F(1, m) - F(0, m) \\ &+ \gamma[(m+1)G(m+1) - mG(m)]. \end{aligned} \quad (4.30)$$

Gl. (4.30) vereinfacht sich weiter zu

$$\begin{aligned} \frac{dG(m)}{dt} &= -F(k_p, m+1) + F(k_p, m) \\ &+ \gamma[(m+1)G(m+1) - mG(m)]. \end{aligned} \quad (4.31)$$

Der Mittelwert der freien Produktmoleküle ist durch

$$\langle m \rangle = \sum_m m G(m) \quad (4.32)$$

gegeben. Multipliziert man Gl. (4.31) mit m und summiert über alle m , so erhält man

$$\begin{aligned} \frac{d \langle m \rangle}{dt} = & \gamma \left[\sum_{m=1}^{\infty} m(m+1)G(m+1) - \sum_{m=0}^{\infty} m^2 G(m) \right] \\ & + \left[\sum_{m=0}^{\infty} mF(k_p, m) - \sum_{m=0}^{\infty} mF(k_p, m+1) \right] \end{aligned}$$

und daraus

$$\frac{d \langle m \rangle}{dt} = -\gamma \sum_{m=0}^{\infty} m G(m) + \sum_{m=0}^{\infty} [mF(k_p, m) - (m-1)F(k_p, m)].$$

Als Ergebnis der Mittelwertbildung ergibt sich schließlich

$$\frac{d \langle m \rangle}{dt} = -\gamma \langle m \rangle + f(k_p). \quad (4.33)$$

Der letzte Term stellt den in Gl. (4.21) definierten Fluß der Konzentrationsdichte dar. Zum Abschluß sollen noch einmal alle Ergebnisse zusammengestellt werden. Die Meanfield-Gleichungen (4.20), (4.27) und (4.33) lauten gemeinsam mit ihren Randbedingungen (4.23) und (4.26).

$$\frac{\partial \tilde{n}(\phi)}{\partial t} = -v \frac{\partial \tilde{n}(\phi)}{\partial \phi} + \sigma \frac{\partial^2 \tilde{n}(\phi)}{\partial \phi^2} \quad (4.34)$$

$$\frac{dn}{dt} = -v \langle m \rangle n(t) + f(1) \quad (4.35)$$

$$\frac{d \langle m \rangle}{dt} = -\gamma \langle m \rangle + f(k_p) \quad (4.36)$$

$$f(\phi) = v \tilde{n}(\phi) - \sigma \frac{\partial \tilde{n}(\phi)}{\partial \phi} \quad (4.37)$$

$$\tilde{n}(k_p - \varepsilon) = 0, \tilde{n}(1) = 0, \text{ falls } \sigma > 0 \quad (4.38)$$

$$f(k_p) = f(k_p - \varepsilon) \quad (4.39)$$

$$f(0) = v \langle m \rangle n \quad (4.40)$$

Die Gleichungen (4.34)–(4.40) sind die gesuchten Meanfield-Gleichungen. Zukünftig werden die Klammern “<>” um die Variable m , die andeuten, daß es sich um einen Mittelwert handelt, weggelassen. Verwechslungen mit der diskreten Variablen m sind nicht zu befürchten. Die Meanfield-Gleichungen vernachlässigen die molekularen Fluktuationen in den Konzentrationen der Reaktanden. Im Fall molekularer Netzwerke spielt der Phasenzzyklus die Rolle einer internen dynamischen Variable. Die räumliche Verteilung ist wegen der schnellen diffusiven Durchmischung unwichtig. Zum Zeitpunkt t wird der Systemzustand durch die Konzentration $\tilde{n}(\phi)$ der Enzyme innerhalb des Zyklus, die Zahl n der Enzyme im Grundzustand und die Zahl $m(t)$ der freien Produktmoleküle beschrieben.

Betrachtet man den Spezialfall $\sigma = 0$, d.h. unter Vernachlässigung der intramolekularen Fluktuationen, so können die Meanfield-Gleichungen enorm vereinfacht werden. Aus Gl. (4.34)–(4.40) ergeben sich

$$\frac{\partial \tilde{n}(\phi)}{\partial t} = -v \frac{\partial \tilde{n}(\phi)}{\partial \phi} \quad (4.41)$$

$$\frac{dn}{dt} = -v(t)n(t) + f(1) \quad (4.42)$$

$$\frac{dm}{dt} = -\gamma m + f(k_p). \quad (4.43)$$

Da die Dynamik von \tilde{n} ausschließlich durch den Driftprozeß mit der Geschwindigkeit v bestimmt wird, ist die Passage des Phasenpunktes k_p durch die Enzyme bereits ohne zusätzliche reflektierende Ränder irreversibel. Analog ist die Situation am Ende des Zyklus am Phasenpunkt $\phi = 1$. Die einzige nötige Randbedingung muß für den Punkt $\phi = 0$ angegeben werden. Sie lautet

$$v\tilde{n}(0) = v(m(t))n. \quad (4.44)$$

Die Lösung von Gl. (4.41) ist

$$\tilde{n}(\phi, t) = \tilde{n}(vt - \phi).$$

Insbesondere gilt

$$\tilde{n}(0, t) = \tilde{n}(vt)$$

oder

$$\tilde{n}(\phi, t) = \tilde{n}(v(t - \frac{\phi}{v})) = \tilde{n}(0, t - \frac{\phi}{v}).$$

Setzt man $\tau_1 = k_p/v$ und $\tau = 1/v$, so erhält man mit dieser Lösung unter Beachtung der Randbedingung (4.44)

$$\frac{v}{v}n(t - \tau) = \frac{v}{v}n(t - \frac{1}{v}) = \tilde{n}(0, t - \frac{1}{v}) = \tilde{n}(1, t)$$

und

$$\frac{v}{v}n(t - \tau_1) = \frac{v}{v}n(t - \frac{k_p}{v}) = \tilde{n}(0, t - \frac{k_p}{v}) = \tilde{n}(k_p, t).$$

Daraus ergeben sich mit Gl. (4.42) und (4.43)

$$\frac{dn}{dt} = -v(t)n(t) + v(t - \tau)n(t - \tau) \quad (4.45)$$

$$\frac{dm}{dt} = -\gamma m + v(t - \tau_1)n(t - \tau_1). \quad (4.46)$$

Diese beiden Gleichungen kann man anschaulich interpretieren. Der erste Term der rechten Seite von Gl. (4.45) beschreibt die Verringerung der Konzentration der Enzyme im Grundzustand, während der zweite Term die Zunahme dieser Konzentration angibt. Da die intramolekularen Fluktuationen nun vernachlässigt werden, beträgt die Zyklusdauer τ . Die Zahl der Enzyme, die zum Zeitpunkt t in den Grundzustand zurückkehren, ist deshalb gleich der Zahl von Enzymen $v(t - \tau)n(t - \tau)$, die zum Zeitpunkt $t - \tau$ den Enzymzyklus begonnen haben.

Der erste Term der rechten Seite von Gl. (4.46) beschreibt die Abnahme der Produktmoleküle durch die Umwandlung in Moleküle vom Typ C mit der Rate γ .

Der zweite Term erfaßt die Zunahme der Produktmoleküle durch die Enzyme, die zum Zeitpunkt t den Phasenpunkt k_p kreuzen. Da die Zeitdauer vom Beginn des Enzymzyklus bis zum Erreichen dieses Punktes τ_1 ist, entspricht diese Enzymmenge $v(t - \tau_1)n(t - \tau_1)$.

Die Differentialgleichungen der Meanfield-Näherung bilden ein geschlossenes System. Man erkennt, daß im Gegensatz zu Gleichungen der klassischen Reaktionskinetik diese durch den Bezug auf Systemzustände in der Vergangenheit ein "Gedächtnis" aufweisen. Das Lösungsverhalten derartiger Gleichungen besitzt, bedingt durch den Einfluß der Werte von Variablen in der Vergangenheit und Gegenwart, Ähnlichkeit mit dem partieller Differentialgleichungen. Beispielsweise ist die Anfangsbedingung eine Funktion der Zeit, also ein Element aus einem unendlich-dimensionalen Funktionenraum. Im Gegensatz dazu ist die Anfangsbedingung bei gewöhnlichen Differentialgleichungssystemen ein endlich-dimensionaler Vektor. Eine Darstellung der Eigenschaften von solchen als Funktionaldifferentialgleichungen bezeichneten Gleichungen findet sich in [183]. Speziell für Delay-Gleichungen wird in [184, 185, 186] ein Überblick gegeben. Eine große Zahl von Anwendungsbeispielen für Delay-Gleichungen in Physik und Biologie finden sich in [187, 188, 189].

4.2 Untersuchung der Meanfield-Gleichungen

Numerische Integration

Zur Integration werden die Delay-Gleichungen in Differenzgleichungen überführt

$$m(t + \Delta t) = m(t) - \Delta t [\gamma m(t) - v(m(t - \tau_1))n(t - \tau_1)] \quad (4.47)$$

$$n(t + \Delta t) = n(t) - \Delta t [v(m(t))n(t) - v(m(t - \tau))n(t - \tau)]. \quad (4.48)$$

Da weder Enzyme zerstört noch erzeugt werden, muß die Erhaltung der Enzymzahl im Verlauf der numerischen Integration gewährleistet sein. Diese ergibt sich als Summe aus der Anzahl $n(t)$ der Enzyme im Grundzustand und im Zyklus. Da sich zum Zeitpunkt t gerade jene Enzyme im Zyklus befinden, die innerhalb des Zeitintervalls $[t - \tau, t]$ ein Substratmolekül gebunden haben, ist deren Zahl einfach das Integral

$$\int_{t-\tau}^t v(m(t'))n(t')dt'.$$

Somit folgt für die Gesamtzahl der Enzyme

$$N(t) = n(t) + \int_{t-\tau}^t v(m(t'))n(t')dt'. \quad (4.49)$$

In diskretisierter Form lautet diese Gleichung

$$N(t) = n(t) + \sum_{l=1}^L v(m(t-l\Delta t))n(t-l\Delta t)\Delta t. \quad (4.50)$$

Dabei ist $L = 1/\Delta t$ die Gesamtzahl der Zeitschritte eines Enzyms, die zum Durchqueren des Enzymzyklus nötig sind. Falls der Algorithmus (4.47) und (4.48) die Teilchenzahl erhält, muß

$$N(t + \Delta t) - N(t) = 0 \quad (4.51)$$

gelten. Aus Gl. (4.50) folgt

$$N(t + \Delta t) - N(t) = n(t + \Delta t) - n(t) + \Delta t [v(m(t))n(t) - v(m(t - \tau))n(t - \tau)]. \quad (4.52)$$

Zusammen mit Gl. (4.48) folgt schließlich (4.52)

$$\begin{aligned} n(t) - \Delta t [v(m(t))n(t) - v(m(t - \tau))n(t - \tau)] - n(t) \\ + \Delta t [v(m(t))n(t) - v(m(t - \tau))n(t - \tau)] = 0. \end{aligned} \quad (4.53)$$

Daher ist mit dem verwendeten Algorithmus (4.47) und (4.48) die Bedingung (4.51) erfüllt. Bei der numerischen Lösung der Delay-Gleichungen kann diese Eigenschaft ausgenutzt werden, um die korrekte Durchführung der Integration zu kontrollieren.

Um die Ähnlichkeit im Lösungsverhalten zwischen den Meanfield-Gleichungen und dem stochastischen Modell zu überprüfen, integriert man die Gl. (4.45) und (4.46) mit vergleichbaren Parametern numerisch. Die Zeitabhängigkeit der Zahl der Produktmoleküle als Lösungen dieser beiden Gleichungen für zwei verschiedene Parametersätze ist in Abb. 4.1 gezeigt. Die Parameter in Abb. 4.1a korrespondieren zu den entsprechenden Parametern in Abb. 3.2, in der die Zahl der Produktmoleküle, gemäß einer Poissonverteilung, um einen bestimmten Mittelwert schwankt. Wie aus Abb. 4.1a erkennbar ist, ergibt die Lösung der Meanfield-Gleichungen in diesem Fall gedämpfte Oszillationen, die das System in den stationären Zustand überführen. Die Konzentration der Reaktionsprodukte im Fixpunkt stimmt sehr gut mit dem Mittelwert der Zahl der Reaktionsprodukte in Abb. 3.2 des Automatenmodells überein.

Wenn andererseits die entsprechenden Parameter für den Fall von Spiking gewählt werden (wie in Abb. 3.4 und Abb. 3.6), bilden sich, wie in Abb. 4.1b gezeigt, stabile periodische Oszillationen in der Lösung der Meanfield-Gleichungen heraus. Beim Vergleich von Abb. 4.1b mit Abb. 3.6b zeigt sich, daß beide Beschreibungsweisen sehr ähnliches Verhalten hinsichtlich der Periode und Amplitude dieser Oszillationen ergeben. Diese Übereinstimmung zwischen den Resultaten des Automatenmodells und den Meanfield-Gleichungen ist typisch für das hier betrachtete System und wurde auch für andere Parameter gefunden.

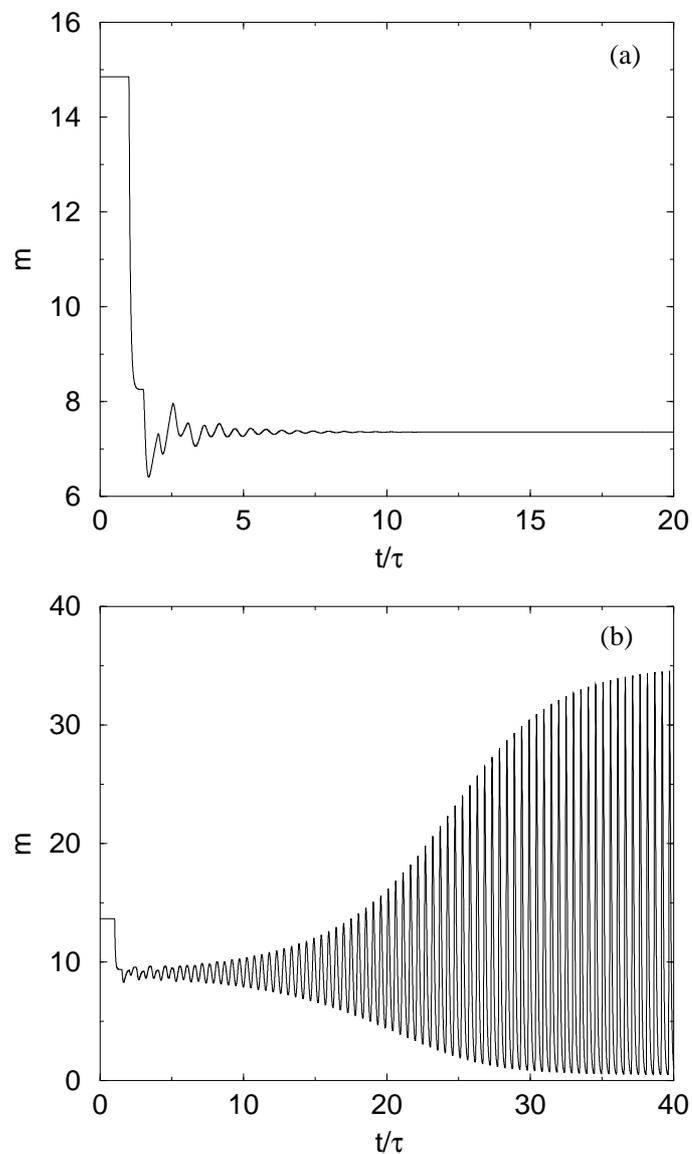


Abb. 4.1: Zeitabhängigkeit der Konzentration der Reaktionsprodukte aus der numerischen Lösung der Meanfield-Gleichungen mit den Parametern (a) $v_0\tau = 1$ und $v_1\tau = 0.2$ (entsprechende Parameter wie in Abb. 3.1) und (b) $v_0\tau = 1$ und $v_1\tau = 1$ (entsprechende Parameter wie in Abb. 3.2). Der Transient führt in (a) zu einem stabilen Fixpunkt und in (b) zu periodischem Spiking mit der halben Periode der Turnover Zeit. Sonstige Parameter sind $\gamma\tau = 20$, $\tau_1 = 0.5\tau$ und $N = 200$.

Lineare Stabilitätsanalyse

Der Vorteil der Systembeschreibung durch die Meanfield-Gleichungen besteht in der Möglichkeit der analytischen Untersuchung der Synchronisationsbedingungen unter Benutzung der linearen Stabilitätsanalyse. Die Untersuchung der Meanfield-Gleichungen (4.34)-(4.40), die die intramolekulare Diffusion berücksichtigen, bereitet durch die Randbedingungen erhebliche technische Schwierigkeiten. Da an dieser Stelle die lineare Stabilitätsanalyse das erste Mal Anwendung findet, werden zuerst die übersichtlicheren Meanfield-Gleichungen (4.45) und (4.46) untersucht.

Der Gleichgewichtszustand $n = \bar{n}$, $m = \bar{m}$ des Systems ist durch die stationäre Lösung der Gl. (4.45) und (4.46) gegeben. Die Betrachtung von Gl. (4.45) zeigt, daß für jeden beliebigen stationären Zustand die rechte Seite trivialerweise verschwindet. Aus Gl. (4.46) folgt mit $v = v_0 + v_1 \bar{m}$

$$\bar{m} = \frac{v_0 \bar{n}}{\gamma - v_1 \bar{n}}. \quad (4.54)$$

Die Gesamtzahl der Enzyme ist gleich der Summe aus der Zahl \bar{n} der Enzyme im Grundzustand und der Zahl der Enzyme, die sich gerade innerhalb des Enzymzyklus befinden. Im Fixpunkt kann diese Zahl leicht bestimmt werden. Zu einem bestimmten Zeitpunkt t sind alle die Enzyme im Zyklus, die innerhalb des Zeitintervalls $t - \tau < t' < t$ den katalytischen Zyklus begonnen haben. Befindet sich das System im Fixpunkt, so beginnen $v \bar{n} \Delta t$ Enzyme je Zeitintervall Δt diesen Prozeß. Daher ist die Zahl der Enzyme innerhalb des Zyklus gleich $v \bar{n} \tau$. Die Gesamtzahl N aller Enzyme ist somit

$$N = \bar{n} + v(\bar{m}) \bar{n} \tau. \quad (4.55)$$

Unter Benutzung der Gl. (4.54) und (4.55) ergibt sich daraus

$$0 = \bar{n}^2 - \bar{n} \frac{v_0 \gamma + \gamma + v_1 N}{v} + \frac{\gamma N}{v_1}. \quad (4.56)$$

Die Wurzel dieser quadratischen Gleichung ist

$$\bar{n} = \frac{v_0 + \gamma + v_1 N}{2v_1} - \sqrt{\left(\frac{v_0 \gamma + \gamma + v_1 N}{2v_1}\right)^2 - \frac{\gamma N}{v_1}}. \quad (4.57)$$

Die zweite Lösung der quadratischen Gleichung (4.55) mit positivem Vorzeichen vor der Wurzel kann ausgeschlossen werden, da in diesem Fall die Zahl \bar{m} der Produktmoleküle negativ wäre.

Die Gl. (4.54) und (4.57) beschreiben die stationäre Lösung des Systems. Diese kann ihre Stabilität bei Erhöhung der allosterischen Bindungsrate v_1 verlieren.

Zur Durchführung der linearen Stabilitätsanalyse führt man die kleinen Störungen des Fixpunktes

$$m(t) = \bar{m} + \delta m(t), n(t) = \bar{n} + \delta n(t) \quad (4.58)$$

ein.

Damit ergibt sich als Linearisierung von Gl. (4.45) und (4.46)

$$\frac{d\delta m(t)}{dt} = -\gamma\delta m + \bar{v}\delta n(t - \tau_1) + v_1\bar{n}\delta m(t - \tau_1) \quad (4.59)$$

$$\frac{d\delta n(t)}{dt} = -\bar{v}\delta n - v_1\bar{n}\delta m + \bar{v}\delta n(t - \tau) + v_1\bar{n}\delta m(t - \tau). \quad (4.60)$$

Die Lösungen dieser linearen Differentialgleichungen mit Zeitverzögerung können in der Form $\delta m \sim e^{\lambda t}$, $\delta n \sim e^{\lambda t}$ angenommen werden. Setzt man diese Ausdrücke in die Gl. (4.59) und (4.60) ein, so ergibt sich ein homogenes Gleichungssystem, aus dem die charakteristische Gleichung

$$\lambda^2 + \lambda \left[\gamma + \bar{v} \left(1 - e^{-\lambda\tau} \right) - v_1\bar{n}e^{-\lambda\tau_1} \right] + \bar{v}\bar{v} \left(1 - e^{-\lambda\tau} \right) = 0 \quad (4.61)$$

folgt. Diese quasi-polynomiale Gleichung ist typisch für dynamische Systeme mit Zeitverzögerung.

Die Lösungen der Gl. (4.61) sind i.A. komplex (d.h. $\lambda = x + i\omega$). Der Fixpunkt \bar{n} und \bar{m} ist stabil, falls der Realteil negativ ist. Die Instabilitätsgrenze wird deshalb durch die Bedingung $x = 0$ gegeben. Der Imaginärteil von λ verschwindet jedoch für $x = 0$ nicht. Es liegt also eine Hopf-Bifurkation vor.

Wird $\lambda = i\omega$ in Gl. (4.61) eingesetzt, ergibt sich eine Gleichung mit komplexen Koeffizienten, aus der die Stabilitätsgrenzen des Fixpunktes im Parameterraum und die Oszillationsfrequenz ω ermittelt werden können. Die Untersuchung dieser Gleichung zeigt, daß eine unendliche Zahl von Lösungen für verschiedene Frequenzen $\omega_k \approx 2\pi k/\tau$ mit $k = 1, 2, 3, \dots$ existiert.

Die Gl. (4.61) wurde numerisch mit $\lambda = i\omega$ für verschiedene Parameter untersucht. Abb. 4.2 zeigt das berechnete Bifurkationsdiagramm in der Parameterebene (v_1, τ_1) . Für kleine Werte der allosterischen Aktivierung v_1 ist der stationäre Zustand, in dem sich das System im Fixpunkt \bar{n} und \bar{m} befindet, stabil. Durch die Erhöhung des Parameters v_1 wird das System beim Überschreiten der Stabilitätsgrenze instabil, und es bilden sich stabile periodische Oszillationen.

Wie bereits betont, existieren unendlich viele Lösungen von Gl. (4.61), die zu verschiedenen Oszillationsfrequenzen ω_k gehören. Wie sich aus den Resultaten der Bifurkationsanalyse ergibt, verschiebt sich die Lage der zu diesen verschiedenen Lösungen gehörigen Bifurkationsäste mit steigendem k immer weiter nach oben, d.h. zu höheren Werten von v_1 , dem Parameter zur Beschreibung der Intensität der allosterischen Aktivierung. Da das System bereits beim Erreichen der

untersten Bifurkationsgrenze instabil wird und zu oszillieren beginnt, sind andere Bifurkationslinien, die zu höheren Frequenzen gehören, hinsichtlich der Stabilität jedoch unwichtig.

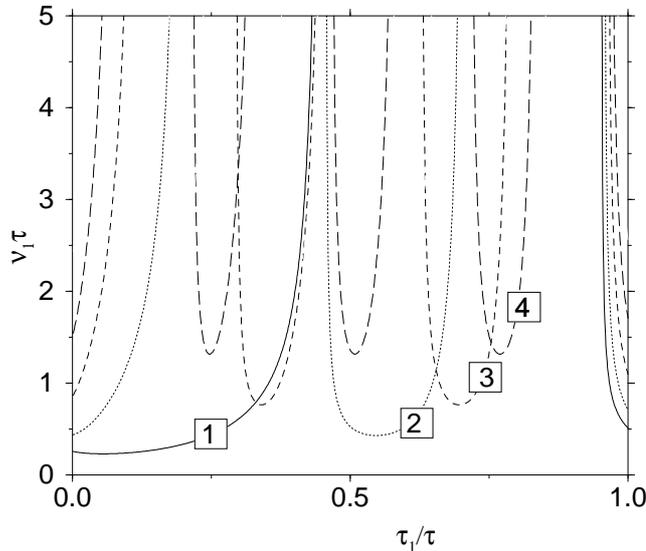


Abb. 4.2: Das Bifurkationsdiagramm in der Parameterenebene (v_1, τ_1) . Der stabile Fixpunkt wird instabil und Oszillationen, hervorgerufen durch k Enzymgruppen, setzen ein, wenn eine der durch “ k ” bezeichneten Kurven in der vertikalen Richtung von unten nach oben gekreuzt wird. Die Reaktionsparameter sind $v_0\tau = 1$, $\gamma\tau = 20$ und $N = 200$. Nur die ersten vier Instabilitätsgrenzen, die zu $k = 1, 2, 3$ und 4 gehören, sind eingezeichnet.

Die verschiedenen Kurven in Abb. 4.2 gehören zu verschiedenen Frequenzen $\omega_k = 2\pi k/\tau$ mit verschiedener Anzahl k enzymatischer Gruppen. Innerhalb des Intervalls $0 \leq \tau_1/\tau \leq 0.34$ und $0.955 \leq \tau_1/\tau \leq 1$ gehört die unterste Grenzlinie zu $k = 1$. Daher wird das System oberhalb dieser Linie synchrone Oszillationen der gesamten Enzympopulation zeigen. Zwischen $0.34 \leq \tau_1/\tau \leq 0.4$ und $0.65 \leq \tau_1/\tau \leq 0.780$, zeigt das System Spiking mit 3 synchronen Enzymgruppen ($k = 3$) usw.

In Abb. 4.3 sind die Frequenzen ω_k zu den Bifurkationsgrenzen in Abb. 4.2, die sich aus der numerischen Lösung von Gl. (4.61) ergeben, dargestellt. Man sieht darin deutlich, daß diese Frequenzen der ersten instabilen Moden mit verschiedenen k nicht ganz mit $\omega_k = 2\pi k/\tau$ übereinstimmen. Die tatsächlichen Frequenzen sind immer etwas kleiner als ω_k , da die Enzyme eine bestimmte Zeit im Grundzustand verweilen, um durch die Bindung eines Substratmoleküls diesen wieder zu verlassen.

Das Bifurkationsdiagramm 4.2 weist zwei Lücken bei $\tau_1/\tau = 0.45$ und $\tau_1/\tau = 0.95$ auf. Genauere Untersuchungen für höhere Werte von k zeigen, daß diese

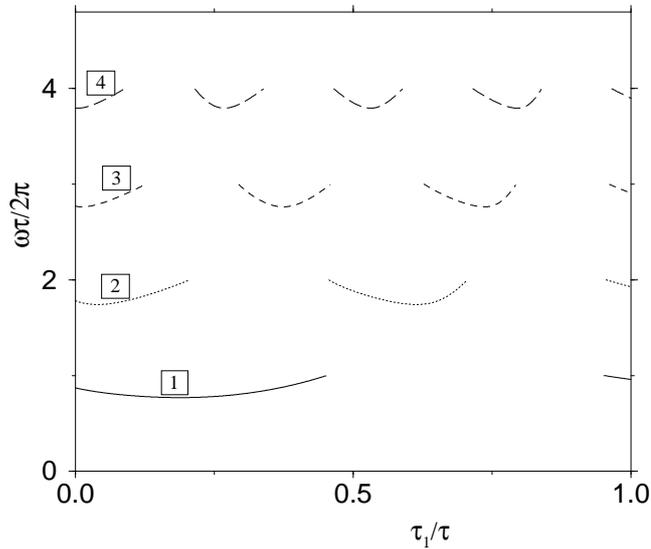


Abb. 4.3: Frequenzen ω der ersten Oszillationsmoden für verschiedene Anzahl k von Enzymgruppen in Abhängigkeit von τ_1 . Die Reaktionsparameter sind dieselben wie in Abb. 4.2. Der Bifurkationsparameter ν_1 ist an der jeweiligen Instabilitätsgrenze, die in Abb. 4.2 dargestellt ist, gewählt.

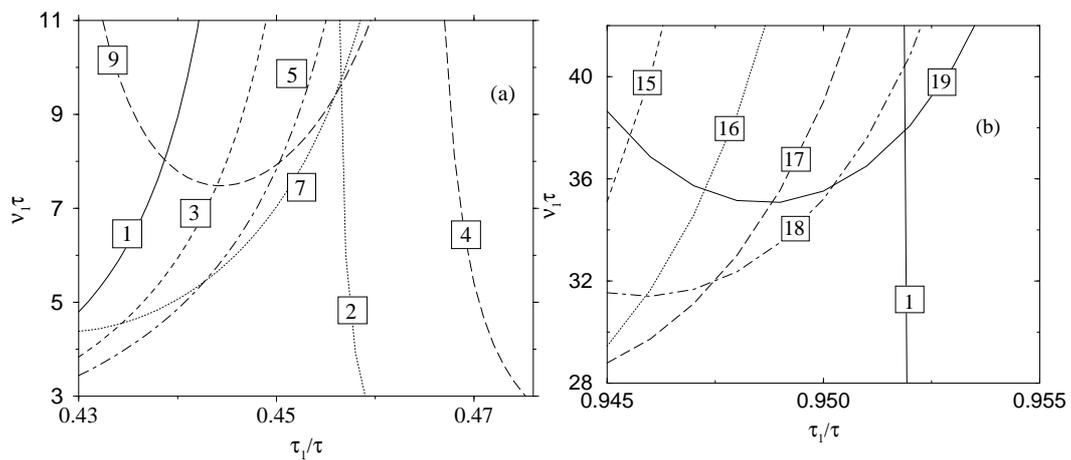


Abb. 4.4: Ein Ausschnitt des Bifurkationsdiagramms von Abb. 4.2 zwischen (a) $0.43 \leq \tau_1/\tau \leq 0.465$ und (b) $0.945 \leq \tau_1/\tau \leq 0.955$. Die Instabilitätsgrenzen, die zu höheren Zahlen von Enzymgruppen gehören (bis $k = 19$), sind dargestellt.

Lücken ebenfalls durch Bifurkationsgrenzen geschlossen werden (Abb 4.4). Jedoch liegen diese bei viel höheren Werten des Bifurkationsparameters v_1 , der die Intensität der allosterischen Aktivierung kennzeichnet. Beispielsweise wird an der Stelle $\tau_1/\tau = 0.952$ diese Bifurkationsgrenze für $v_1/\tau = 37.9$ erreicht und zwar für $k = 19$, also im Fall von 19 enzymatischen Gruppen (Abb 4.4).

Nun soll die Abhängigkeit der Instabilitätsgrenzen vom Parameter v_0 , der die Bindungsrate eines *ES*-Komplexes ohne allosterische Aktivierung angibt, an einem Beispiel betrachtet werden. In Abb. 4.5a ist diese Abhängigkeit für ein Intervall, das sich über fünf Zehnerpotenzen erstreckt, dargestellt. Für sehr kleine

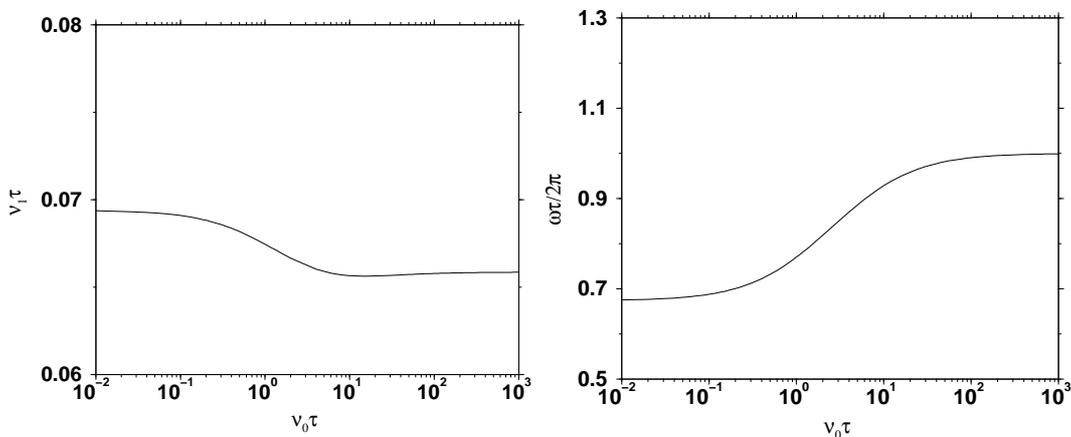


Abb. 4.5: (a) Das Bifurkationsdiagramm in der Parameterebene (v_1, v_0) . Die Linie ist die Bifurkationsgrenze für $\tau_1 = 0.2\tau$ (eine Enzymgruppe). (b) Frequenzen ω der ersten Oszillationsmode entlang der in Abbildung (a) dargestellten Bifurkationsgrenze. Die sonstigen Reaktionsparameter sind $\gamma\tau = 20$ und $N = 1000$.

Werte von v_0 verringert sich mit wachsendem Parameter v_0 der Bifurkationsparameter v_1 und erreicht etwa bei $v_0 = 10$ ein absolutes Minimum, um danach wieder sehr langsam anzusteigen. Interessanterweise variiert der Bifurkationsparameter jedoch innerhalb des gesamten Intervalls $[10^{-2}, 10^3]$ um weniger als 10%. Daraus kann geschlossen werden, daß dieser Parameter nur eine untergeordnete Rolle bei der Beeinflussung der Dynamik spielt. Im nächsten Kapitel wird man sehen, daß eine ähnliche Eigenschaft auch für das Modell der allosterischen Produktinhibierung gilt. Deutlich stärker ausgeprägt ist, wie in Abb. 4.5b erkennbar, die Schwankungsbreite der Frequenz ω , mit der das System instabil wird. Diese steigt mit wachsendem v_0 von $0.67 \cdot 2\pi/\tau$ – $0.95 \cdot 2\pi/\tau$ immer weiter an.

Ein weiterer Parameter, dessen Einfluß auf die Stabilität des Reaktionssystems nun untersucht wird, ist der Parameter γ , der die Umwandlungsrate der Produktmoleküle in die Moleküle vom Typ C festlegt. Für eine (durchgezogene Linie) und zwei (gepunktete Linie) Enzymgruppen sind die Instabilitätsgrenzen in Abhängigkeit von γ in Abb. 4.6a abgebildet. Der Verlauf dieser Grenzen ist für beide Fälle

qualitativ derselbe. Zuerst fallen die Bifurkationslinien mit wachsendem γ leicht, um bei etwa $\gamma\tau \approx 10$ ein absolutes Minimum zu erreichen. Anschließend steigen die Bifurkationslinien mit weiter wachsendem γ wieder an.

Einen qualitativ ähnlichen Verlauf zeigt in Abb. 4.6b die Abhängigkeit der Frequenzen ω an den Instabilitätsgrenzen. Die durchgezogene Linie gehört wieder zum Spiking, hervorgerufen durch Phasensynchronisation mit einer Enzymgruppe bzw. im Fall der gepunkteten Linie für zwei Enzymgruppen.

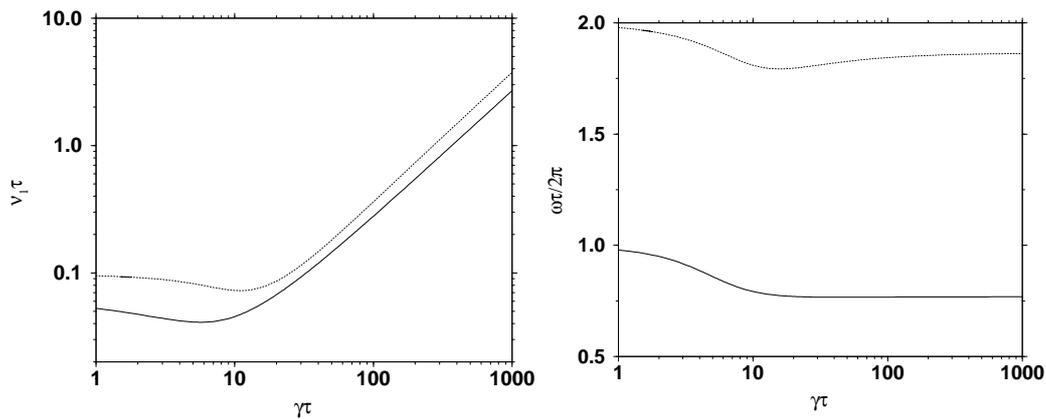


Abb. 4.6: Das Bifurkationsdiagramm in der Parameterebene (v_1, γ) . Der stabile Fixpunkt wird instabil und Oszillationen entwickeln sich. Die durchgezogene Linie ist die Bifurkationsgrenze für $\tau_1 = 0.2\tau$ (eine Enzymgruppe), während die gepunktete Linie die Bifurkationsgrenze für $\tau_1 = 0.55\tau$ (zwei Enzymgruppen) zeigt. Die sonstigen Reaktionsparameter sind $v_0\tau = 1$, $\gamma\tau = 20$ und $N = 200$.

Das Systemverhalten oberhalb der Bifurkationslinien wurde durch die numerische Lösung der Meanfield-Gleichungen (4.45) und (4.46) untersucht. Die Lösung dieser Gleichungen für verschiedene Parameter zeigt, daß die durch die Bifurkationsanalyse betrachteten Instabilitäten tatsächlich zu stabilen Oszillationen mit der vorausgesagten Frequenz führen. Diese Bifurkationen können in Abhängigkeit von den Parametern sowohl sub- als auch superkritische Hopf-Bifurkationen sein.

Erhöht man allmählich die Intensität v_1 der allosterischen Regulierung, wird der Fixpunkt \bar{n} und \bar{m} an dem durch die lineare Stabilitätsanalyse vorausgesagten Punkt v_{1c} instabil. Das führt zu Oszillationen mit einer endlichen Amplitude (harte Anregung), die, wie in Abb 4.7a zu sehen ist, sich mit wachsendem v_1 weiter erhöht. Startet man jedoch im oszillatorischen Bereich und verringert den Parameter v_1 langsam, findet man, daß die Oszillationen sogar noch unterhalb der früheren Bifurkationsgrenze v_{1c} existieren, um plötzlich unterhalb eines zweiten kritischen $v_{1\bar{c}} < v_{1c}$ Wertes zu verschwinden. Es tritt also Hysterese bezüglich der Variation des Parameters v_1 auf. Solche subkritischen Übergänge sind typisch

für dieses System, jedoch finden sich für andere Parameterkonstellationen auch superkritische Übergänge (weiche Anregung) vom stabilen Fixpunkt zu oszillatorischem Verhalten (Abb. 4.7b).

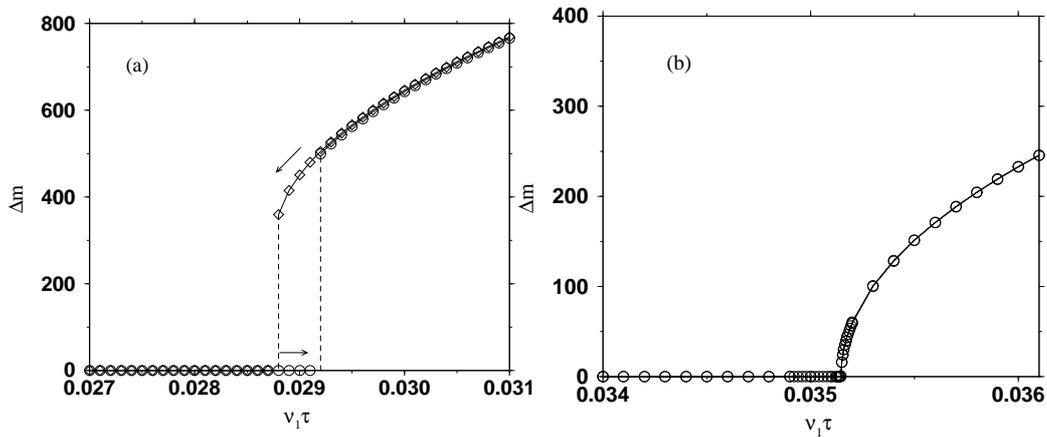


Abb. 4.7: Die Amplitude Δm für stabile (a) Zwei-Gruppen- Oszillationen ($\tau_1 = 0.55\tau$ und $\gamma\tau = 50$) und (b) Ein-Gruppen- Oszillationen ($\tau_1 = 0.2\tau$ und $\gamma\tau = 20$) als Funktion von v_1 . Im Fall (a) ergibt sich eine subkritische Hopf-Bifurkation, im Fall (b) eine superkritische Hopf-Bifurkation.

Die Abhängigkeit des Verlaufs der Bifurkationslinien von der Gesamtzahl der Enzyme N im Reaktionsvolumen kann leicht verstanden werden. Bei der Betrachtung der Meanfield-Gleichungen (4.45) und (4.46) bemerkt man, daß diese invariant unter der Skalentransformation $v_1 \rightarrow v_1/c$, $m \rightarrow cm$ und $n \rightarrow cn$ für irgendeine Konstante c sind. Diese Transformation bedeutet einfach, daß, falls die Gesamtzahl N der Enzyme um einen Faktor c verändert wird, sich die Zahl der Reaktionsprodukte ebenfalls proportional ändert. Die Existenz dieser Skalentransformation kann zur Bestimmung der Bifurkationsdiagramme für beliebige N benutzt werden. In Abb. 4.2 sind die Bifurkationslinien z.B. für $N = 200$ Enzyme bestimmt worden. Falls man das Bifurkationsdiagramm für $N = 2000$ Enzyme finden möchte, muß man nur v_1 durch $v_1/10$ im ursprünglichen Diagramm ersetzen. Dieselbe Transformation kann auch auf die anderen Bifurkationsdiagramme angewendet werden.

Kapitel 5

Untersuchung eines produktinhibierten Enzymsystems

In diesem Kapitel wird unter den Bedingungen molekularer Netzwerke eine produktinhibierte Enzymreaktion untersucht [190]. Die verschiedenen in der Natur auftretenden Mechanismen enzymatischer Inhibierung wurden bereits in Kapitel 2.1 vorgestellt. Ich werde mich bei der Betrachtung der Kopplung enzymatischer Reaktionen durch Produkthemmung auf die allosterische Inhibierung beschränken. Neben der Einbeziehung der intramolekularen Dynamik im Verlauf des enzymatischen Turnover werden explizit die Bindungs- und Dissoziationsvorgänge der regulatorischen Produktmoleküle berücksichtigt. Diese Erweiterung führt zu einem deutlich komplizierteren stochastischen Reaktionsmodell als das in Kapitel 3 für den Fall der Produktaktivierung untersuchte Modell.

Nach der Beschreibung des verwendeten Modells in Abschnitt 5.1 werden danach in Abschnitt 5.2 die Ergebnisse der numerischen Simulationen vorgestellt. Auch im Fall der Produktinhibition kann es zur Synchronisation der Enzymzyklen kommen. Numerisch wird die Synchronisationsstärke als Funktion der Systemparameter untersucht.

Unter Verwendung der Mastergleichung für dieses Reaktionssystem werden in Abschnitt 5.3 die Meanfield-Gleichungen hergeleitet und numerisch gelöst. Darüberhinaus werden unter Benutzung der linearen Stabilitätsanalyse die Instabilitätsgrenzen als Funktion der Reaktionsparameter bestimmt. Anschließend werden in Abschnitt 5.4 verschiedene Modifikationen des Inhibitionsmechanismus und dessen Auswirkungen auf das Synchronisationsverhalten betrachtet.

Die Meanfield-Gleichungen können in Abhängigkeit der verwendeten Parameter das System entweder im Fall von allosterischer Produktinhibition oder -aktivierung beschreiben. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Stabilitätsanalyse des stark vereinfachten Modells allosterischer Produktaktivierung aus Kapitel 3 mit denen des

in diesem Kapitel eingeführten komplexeren Modells sowohl für den Fall der Inhibierung als auch Aktivierung durchzuführen. Dieser Vergleich erfolgt im letzten Abschnitt.

5.1 Stochastisches Modell mit kontinuierlicher Phasendynamik

Wie bereits in Kapitel 3 wird die enzymatische Umwandlung eines Substratmoleküls in ein Reaktionsprodukt



untersucht. Für die katalytische Umwandlung spielen verschiedene Prozesse eine Rolle. Frei bewegliche Substratmoleküle kollidieren mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit pro Zeiteinheit in der Nähe der enzymatischen Bindungsstelle, können dort binden und wieder dissoziieren. Durch die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes werden Konformationsänderungen der Proteinstruktur verursacht. Nach einer bestimmten Zeit wird ein Reaktionsprodukt freigesetzt und das Enzym relaxiert in den Grundzustand. Diese Prozesse wurden bereits in dem einfachsten Modell einer allosterisch produktaktivierten Enzymreaktion in Kapitel 3 berücksichtigt (für eine ausführliche Diskussion siehe S. 40 f.). In diesem einfachen Modell war die Bindungsrate $v(m)$ der Substratmoleküle eine Funktion der Zahl der freien Reaktionsprodukte, ohne daß die Bindung und Dissoziation des regulatorischen Produktmoleküls an jedes einzelne Enzym betrachtet wurden. Nun wird dieses einfache Modell um folgende zusätzliche Prozesse ergänzt, die die Bindung des regulatorischen Produktmoleküls an eine separate Bindungsstelle, räumlich getrennt von der Substratbindungsstelle, betreffen.

- Kollision des frei beweglichen regulatorischen Produktmoleküls mit dem Enzym in der Nähe der regulatorischen Bindungsstelle des Enzyms.
- Bindung des Produktmoleküls und dadurch hervorgerufen eine Änderung der Substratbindungsrate.
- Dissoziation des Produktmoleküls mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit und eine erneute Änderung der Substratbindungsrate (Abb 5.1).

Die beiden ersten Punkte werden analog wie in Abschnitt 3.1 (S. 41) zu einer effektiven Bindungsrate μ zusammengefaßt. Ähnlich wie die Substratmoleküle, die nur an das Enzym im Grundzustand binden können, kann die Bindungsrate μ der regulatorischen Moleküle im allgemeinen vom Enzymzustand abhängen. Im ersten Teil dieses Kapitels wird der Spezialfall

betrachtet, daß das regulatorische Produktmolekül nur im Grundzustand an das Enzym binden kann. Später in Abschnitt 5.4 untersuche ich zwei weitere Möglichkeiten. Einmal die Bindung des Produkts mit konstanter Bindungsrate μ mit Ausnahme der Relaxationsphase und die Bindung mit der Rate μ völlig unabhängig vom Enzymzustand.

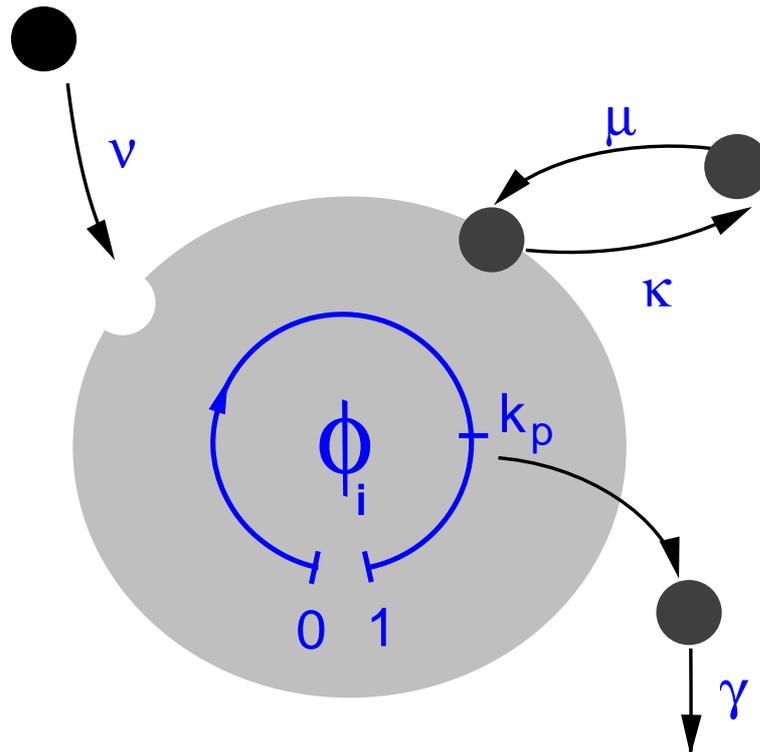
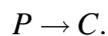


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des molekularen Enzymzyklus des Enzyms i entlang der Reaktionskoordinate ϕ_i . Der Enzymzyklus startet durch die Bindung eines Substratmoleküls mit der Rate v . Diese hängt davon ab, ob ein regulatorisches Produktmolekül gebunden ist oder nicht. Innerhalb des Enzymzyklus wird am Phasenpunkt $\phi = k_p$ ein Produktmolekül freigesetzt, das dann mit der Rate γ abgebaut wird. Das regulatorische Produktmolekül kann mit der Rate μ an die regulatorische Bindungsstelle binden und mit der Rate κ dissoziieren.

Wie bereits in Kapitel 3 wird wieder eine nachfolgende Reaktion



angenommen, die die freiwerdenden Reaktionsprodukte P mit der Rate γ in Moleküle vom Typ C umwandelt, die im Reaktionsablauf keine weitere Rolle mehr spielen.

Zur Formalisierung der Zustandsänderung durch die Bindung eines Substratmoleküls durch das Enzym i wird die binäre Zustandsvariable u_i eingeführt. Falls sich das Enzym i im freien Zustand befindet und bereit ist, ein Substratmolekül zu binden, hat u_i den Wert 0. Die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes führt zu einer Änderung der Zustandsvariable in $u_i = 1$. Die Substratbindung initiiert den katalytischen Zyklus, bestehend aus der katalytischen Umwandlung des Substratmoleküls in ein Produktmolekül und nachfolgender Rückkehr des Enzyms in den Grundzustand. Dieser Zyklus wird durch einen Diffusions-Drift-Prozeß innerhalb eines Potentialprofils entlang der Reaktionskoordinate ϕ_i angenähert. Der Phasenpunkt $\phi_i = 0$ definiert den Beginn des enzymatischen Zyklus. Am Ende des enzymatischen Zyklus erreicht ϕ_i den Wert 1 und das Enzym kehrt in den Grundzustand zurück, beschrieben durch einen Übergang von $u_i = 1$ zu $u_i = 0$.

Zur formalen Beschreibung dieser regulatorischen Eigenschaft führt man für jedes Enzym i analog zu u_i eine zweite binäre Zustandsvariable r_i ein, die den Wert 1 annimmt, falls ein regulatorisches Produktmolekül gebunden ist und sonst 0 ist. Die Wahrscheinlichkeitsrate v pro Einheitszeit τ für die Bindung eines Substratmoleküls hängt von r_i ab. Das bedeutet $v = v_1$, falls $r_i = 1$ und $v = v_0$ falls $r_i = 0$. Im hier untersuchten Fall der Produktinhibition ist $v_0 \gg v_1$. Um die Stärke der Inhibition durch die Produktbindung zu charakterisieren, ist es günstig, den Koeffizienten χ durch $v_1 = v_0/\chi$ zu definieren.

In der betrachteten hypothetischen Reaktion wird die Dissoziation der Substratmoleküle vernachlässigt. Die Wahrscheinlichkeitsrate v ist proportional zur Substratkonzentration. Diese ist wesentlich höher als die Enzymkonzentration und wird als konstant angenommen.

Im folgenden wird der Algorithmus präsentiert, der für die numerischen Simulationen verwendet wird. Die Dynamik der Phase ϕ_i des Enzyms i wird wieder durch die diskretisierte Form

$$\phi_i(t + \Delta t) = \phi_i(t) + v\Delta t + \zeta_i\sqrt{\sigma\Delta t} \quad (5.2)$$

der Langevin-Gleichung (3.11) mit ζ_i als unabhängige Gaussche Zufallszahlen beschrieben, so daß

$$\langle \zeta_i(t)\zeta_j(t') \rangle = 2\delta_{ij}\delta(t - t') \quad (5.3)$$

gilt. Für kleine Rauschintensitäten σ in Gl. (5.1), gelten näherungsweise die Gleichungen $\tau \approx 1/v$, $\Delta\tau \approx \sqrt{2\sigma/v^3}$ und $\xi \approx \sqrt{2\sigma/v}$ (siehe Gl. (3.33) - (3.35) (S. 60). Zusätzlich zu Gl. (5.2) muß noch die Dynamik der Phasenvariablen an den Rändern $\phi = 0$ und $\phi = 1$ sowie am Punkt $\phi = k_p$ spezifiziert werden. Falls aufgrund von Fluktuationen zum Zeitpunkt $t + \Delta t$ die Phasenvariable $\phi_i(t + \Delta t)$ von Gl. (5.2) negativ ist, wird diese durch $\phi_i(t + \Delta t) = v\Delta t$ ersetzt. Analog wird am Punkt k_p der Reaktionskoordinate verfahren, bei dessen Passieren ein Reaktionsprodukt freigesetzt wird. Im Intervall der Reaktionskoordinaten $0 < \phi_i < k_p$ bilden

Enzym und Substratmolekül einen Enzym-Substrat-Komplex, während innerhalb des Phasenintervalls $k_p < \phi_i < 1$ das Reaktionsprodukt vom Enzym getrennt vorliegt und das Enzym nach und nach in den Grundzustand zurückkehrt. Um zu verhindern, daß, bedingt durch Zufallsschwankungen der Phasenvariablen ϕ_i um k_p , mehrmals im selben Turnover-Zyklus Reaktionsprodukte freigesetzt werden, darf nach Erreichen des Punktes k_p kein Phasenpunkt $\phi_i < k_p$ eingenommen werden. Falls zu einem späteren Zeitpunkt $t + \Delta t$ die Phasenvariable ϕ_i kleiner ist als k_p , dann wird $\phi_i(t + \Delta t) = k_p + v\Delta t$ gesetzt. Der Zyklus ist nach Erreichen des Punktes $\phi = 1$ beendet.

Die zeitliche Entwicklung der Zustandsvariablen u_i und r_i wird durch folgende Algorithmen determiniert:

$$r_i(t + \Delta t) = \begin{cases} 1, & \text{falls } r_i(t) = 0, \text{ mit WS } \mu_i\Delta t \\ 0, & \text{falls } r_i(t) = 0, \text{ mit WS } 1 - \mu_i\Delta t \\ 0, & \text{falls } r_i(t) = 1, \text{ mit WS } \kappa\Delta t \\ 1, & \text{falls } r_i(t) = 1, \text{ mit WS } 1 - \kappa\Delta t \end{cases} \quad (5.4)$$

und

$$u_i(t + \Delta t) = \begin{cases} 1, & \text{falls } u_i(t) = 0, \text{ mit WS } v_i\Delta t \\ 0, & \text{falls } u_i(t) = 0, \text{ mit WS } 1 - v_i\Delta t \\ 0, & \text{falls } u_i(t) = 1, \text{ und } \phi_i(t) = 1 \\ 1, & \text{falls } u_i(t) = 1, \text{ und } \phi_i(t) < 1. \end{cases} \quad (5.5)$$

Die Bindungsrate für die Substratmoleküle ist $v = v_0$, falls $r_i = 0$ und $v = v_1 = v_0/\chi$, falls $r_i = 1$. Die Wahrscheinlichkeitsrate μ_i für die Bindung der regulatorischen Produktmoleküle ist durch

$$\mu_i = m(t)\beta(u_i, \phi_i) \quad (5.6)$$

gegeben. Dabei ist $\beta(u_i, \phi_i)$ eine Ratenkonstante, die abhängig von den Zustandsvariablen u_i und ϕ_i ist.

Die zeitliche Entwicklung der Zahl der freien Reaktionsprodukte m wird durch den folgenden stochastischen Algorithmus beschrieben:

$$m(t + \Delta t) = m(t) + \sum_{i=1}^N \Theta(\phi_i(t) - k_p)\Theta(k_p - \phi_i(t - \Delta t)) - \sum_{j=1}^{m(t)} \Psi_j \quad (5.7)$$

$$+ \sum_{i=1}^N (r_i(t) - r_i(t + \Delta t)).$$

Dabei ist Ψ_j eine binäre Zufallszahl, die die Werte 1 oder 0 mit der Wahrscheinlichkeit $\gamma\Delta t$ annehmen kann. Die Stufenfunktion $\Theta(x)$ ist so definiert, daß $\Theta(x) = 1$ ist, falls $x \geq 0$ und $\Theta(x) = 0$ falls $x < 0$. Der zweite Term in Gl. (5.7) beschreibt die Erhöhung der Zahl der freien Produktmoleküle durch die Freisetzung

eines Reaktionsprodukts, wenn ein Enzym den Phasenpunkt k_p erreicht. Der dritte Term beschreibt den stochastischen Abbau der Produktmoleküle. Jedes der m Produktmoleküle kann mit der kleinen Wahrscheinlichkeit $\gamma\Delta t$ innerhalb des Zeitintervalls Δt verschwinden und dadurch die Zahl der freien Moleküle m vermindern. Der letzte Term in dieser Gleichung beschreibt die Erhöhung bzw. Verminderung der freien Produktmoleküle um 1, wenn ein Produktmolekül von der regulatorischen Bindungsstelle eines Enzyms dissoziiert bzw. dort bindet. Die Schrittweite Δt muß klein genug gewählt werden, so daß die Bedingungen $\mu_i\Delta t \ll 1$, $\gamma\Delta t \ll 1$, $\kappa\Delta t \ll 1$, und $v_i\Delta t \ll 1$ erfüllt sind und die numerische Lösung unabhängig von Δt ist.

5.2 Synchrone und asynchrone Enzymaktivität

In diesem Abschnitt stelle ich die Resultate der numerischen Simulationen des in Kapitel 5.1 eingeführten stochastischen Modells vor. Die Gesamtzahl der Enzyme ist, wenn nicht ausdrücklich darauf hingewiesen wird, in allen Simulationen $N = 400$. Der Parameter χ ($v_1 = v_0/\chi$), der die Stärke der allosterischen Inhibition angibt, ist $\chi = 10^4$. Die Driftgeschwindigkeit v in Gl. (3.11) bzw. (5.2) ist 1 und damit die charakteristische Zeit $\tau = 1/v$. Falls nicht ausdrücklich betont wird, sind als Anfangsbedingung die Enzyme zufällig entlang des Phasenzyklus verteilt.

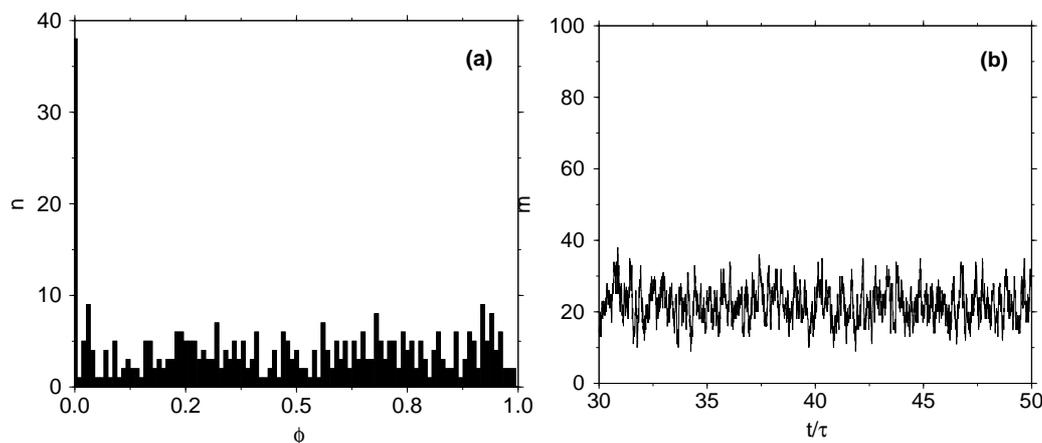


Abb. 5.2: Phasenverteilung (a) und Zeitabhängigkeit der Zahl der Produktmoleküle (b) im nichtsynchrone Systemzustand für $N = 400$ Enzyme. Die Reaktionsparameter sind $\beta\tau = 0.03$, $v_0\tau = 10$, $\chi = 10^4$, $\gamma\tau = 15$, $\kappa\tau = 20$, $\tau_1 = 0.55\tau$, $\nu\tau = 1$ und $\sigma = 0$.

Simulationen des stochastischen Modells zeigen die Existenz von zwei qualitativ verschiedenen Verhaltensmodi. Unterhalb einer bestimmten Schwelle der Ratenkonstante β , die die Bindung der regulatorischen Produktmoleküle an die

Enzyme kontrolliert, finden katalytische Turnover der Enzyme unabhängig voneinander statt. In Abb. 5.2a ist die Verteilung der Enzyme entlang der Reaktionskoordinaten ϕ für diesen Fall dargestellt. Um diese Verteilung zu erhalten, wird der Phasenzustand eines jeden Enzyms zu einem festen Zeitpunkt bestimmt, das Intervall $0 \leq \phi \leq 1$ in 100 Unterintervalle zerlegt und die Zahl der Enzyme in jedem dieser Unterintervalle abgezählt. Falls die Enzyme unabhängig voneinander operieren, ergibt sich eine Gleichverteilung der Phasenzustände. Das bedeutet, daß alle Phasenzustände gleichwahrscheinlich sind und zwischen den Zuständen unterschiedlicher Enzyme keinerlei Korrelationen existieren. Die Zahl der freien Produktmoleküle als Funktion der Zeit, dargestellt in Abb. 5.2b, schwankt in diesem Fall um einen bestimmten Mittelwert (asynchroner Reaktionsmodus).

Wird der Parameter β und damit die Bindungsrate der regulatorischen Produktmoleküle erhöht, erfolgt eine drastische Veränderung im Systemverhalten. Diese ist durch einen Übergang von asynchroner zu synchroner Enzymaktivität gekennzeichnet. Abb. 5.3a zeigt eine typische Phasenverteilung der Enzyme bei synchronem Verhalten. Im Vergleich zum asynchronen Modus bei kleinen Werten von β ist diese Verteilung keine Gleichverteilung mehr, sondern zeigt ein deutliches Maximum. Das bedeutet, daß Korrelationen zwischen unterschiedlichen Enzymen existieren und deren Phasenzustände synchronisiert sind. In Abb. 5.3b beobachtet man als Ergebnis der synchronen enzymatischen Aktivität periodisches Spiking in der Zahl der freien Reaktionsprodukte. Die Periode des Auftretens dieser Spikes ist vergleichbar mit der mittleren Turnover-Zeit der Enzyme. Die Enzyme befinden sich also in einer Enzymgruppe entlang der Phasenkoordinate. Im Gegensatz zu dem in Kapitel 3 untersuchten Enzymmodell mit Produktaktivierung kann sich, wie noch gezeigt wird, bei Produktinhibierung immer nur eine Enzymgruppe bilden.

Der Übergang zur synchronen Enzymaktivität verläuft selbständig. Als Anfangsbedingungen zum Zeitpunkt $t = 0$ sind die Enzyme entlang der Reaktionskoordinate ϕ zufällig und gleichverteilt. Nach einem transienten Zeitabschnitt erfolgt eine spontane Synchronisation der Enzymzustände, die von dem charakteristischen Spiking in der Zahl der freien Reaktionsprodukte begleitet ist. Die Zeitdauer des Transienten hängt stark von den Simulationsparametern, vor allem von der relativen Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeit und der Bindungsrate β für die regulatorischen Produktmoleküle ab. Für kleine Werte von ξ und β , wie in Abb. 5.3, dauert der Transient hunderte Turnover-Zyklen. Für größere Werte von ξ und β wie z.B. in Abb. 5.4 bildet sich das Spiking bereits nach wenigen Enzymzyklen heraus.

Im Fall unkorrelierter Phasenzustände sind alle Phasendifferenzen gleich wahrscheinlich. In diesem Fall ist die Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung $P(\Delta\phi)$ zwischen zwei Enzymen die Phasendifferenz $\Delta\phi$ vorzufinden, wie in Abb. 5.5a gezeigt, eine Gleichverteilung. Falls die Enzymzustände jedoch in einer Enzym-

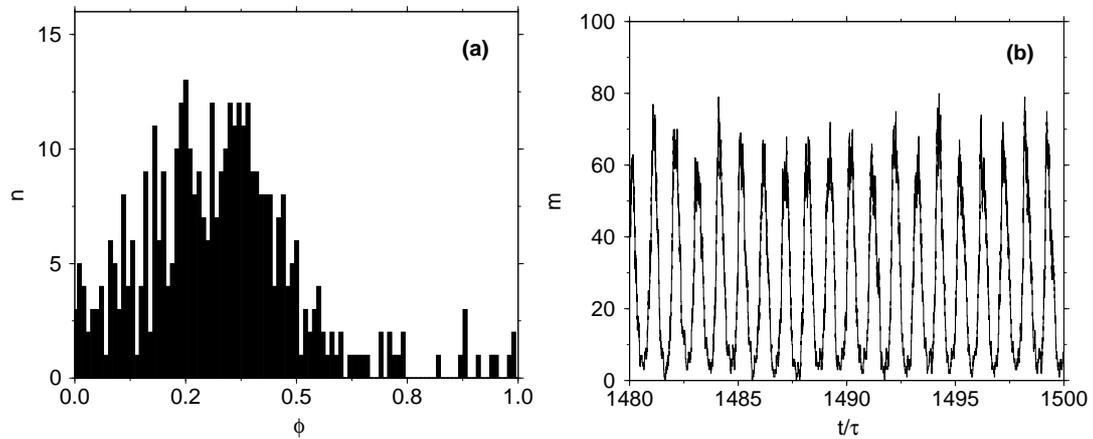


Abb. 5.3: Phasenverteilung (a) und Zeitabhängigkeit der Zahl der Produktmoleküle (b) im synchronisierten Systemzustand für $N = 400$ Enzyme. Die Reaktionsparameter sind $\beta\tau = 0.1$, $\nu_0\tau = 100$, $\chi = 10^4$, $\gamma\tau = 15$, $\kappa\tau = 20$, $\tau_1 = 0.55\tau$, $\nu\tau = 1$ und $\sigma = 0$.

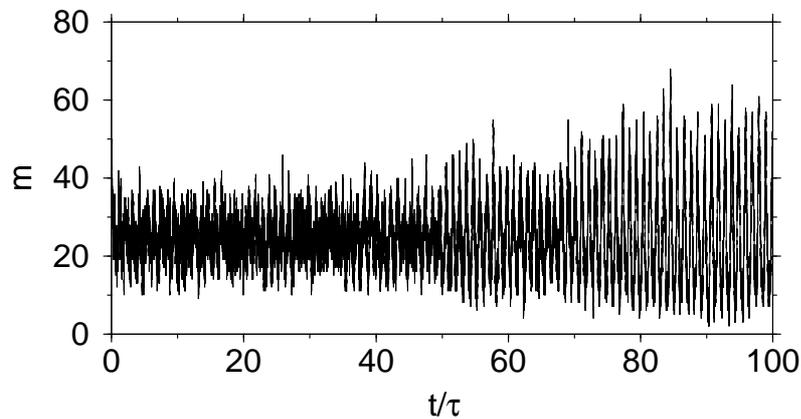


Abb. 5.4: Transientes Verhalten der Enzyme mit zufälliger Phasenverteilung der Enzyme als Anfangsbedingung und Herausbildung korrelierter Phasenzustände der gesamten Enzympopulation. $N = 400$. Die Reaktionsparameter sind $\beta\tau = 5$, $\nu_0\tau = 100$, $\chi = 10^4$, $\gamma\tau = 15$, $\kappa\tau = 20$, $\tau_1 = 0.55\tau$, $\nu\tau = 1$, und $\sigma = 0.00125/\tau^2$.

gruppe synchron operieren, zeigt die Verteilung der Phasendifferenzen $P(\Delta\phi)$ ein Maximum in der Umgebung von $\Delta\phi = 0$ (siehe Abb. 5.5).

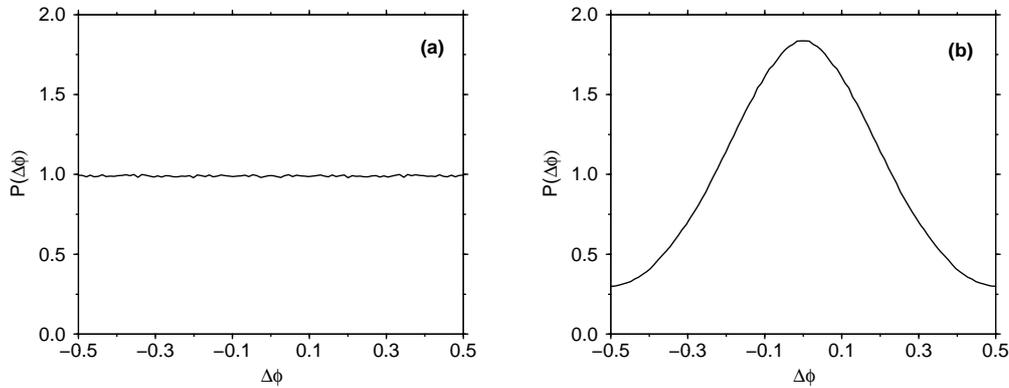


Abb. 5.5: Wahrscheinlichkeitsdichteverteilungen der Phasendifferenzen (a) ohne Synchronisation (Parameter wie in Abb. 5.2), (b) mit einer Enzymgruppe (Parameter wie in Abb. 5.3).

Im Kapitel 3 wurde zur Charakterisierung der Synchronisationsstärke der Ordnungsparameter θ eingeführt (siehe Gl. (3.38), S. 62). Dieser Ordnungsparameter soll im Folgenden wieder dazu verwendet werden, die Synchronisationsstärke der Enzymzustände als Funktion der Systemparameter zu bestimmen. Zuerst wird der Einfluß der Fluktuationen innerhalb des Zyklus auf die Synchronisation untersucht. Dazu variiert man die Rauschintensität σ im stochastischen Modell bei Konstanthaltung der restlichen Parameter. Abb. 5.6a zeigt ein Beispiel der Abhängigkeit des Ordnungsparameters θ von der relativen Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeit τ (siehe Gl. (3.35)). Mit wachsendem ξ verkleinert sich θ und verschwindet für $\xi > 0.1$. Als nächstes wird die Rauschintensität σ fixiert und der Parameter β , der die Bindungsrate der regulatorischen Produktmoleküle festlegt, erhöht. Wie in Abb. 5.6b erkennbar ist, findet sich oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes synchrones Verhalten. Die weitere Erhöhung von β führt zu einer Verstärkung der Synchronisationsintensität, charakterisiert durch ein Anwachsen des Ordnungsparameters θ . Interessanterweise existiert ein zweiter Schwellenwert für β , oberhalb dessen das System wieder desynchronisiert. Das bedeutet, daß nur in einem bestimmten "Parameterfenster" das System synchrones Verhalten aufweist.

Desweiteren wird θ für verschiedene Werte des Parameters v_0 , der die Bindungsrate der Substratmoleküle festlegt, berechnet. Wie man in Abb. 5.6c sieht, existiert auch für diesen Parameter ein ähnliches Fenster, innerhalb dessen die Enzymzustände synchronisieren. Nur innerhalb des Intervalls $20 < v_0 < 300$ zeigen die Enzyme synchrone Aktivität.

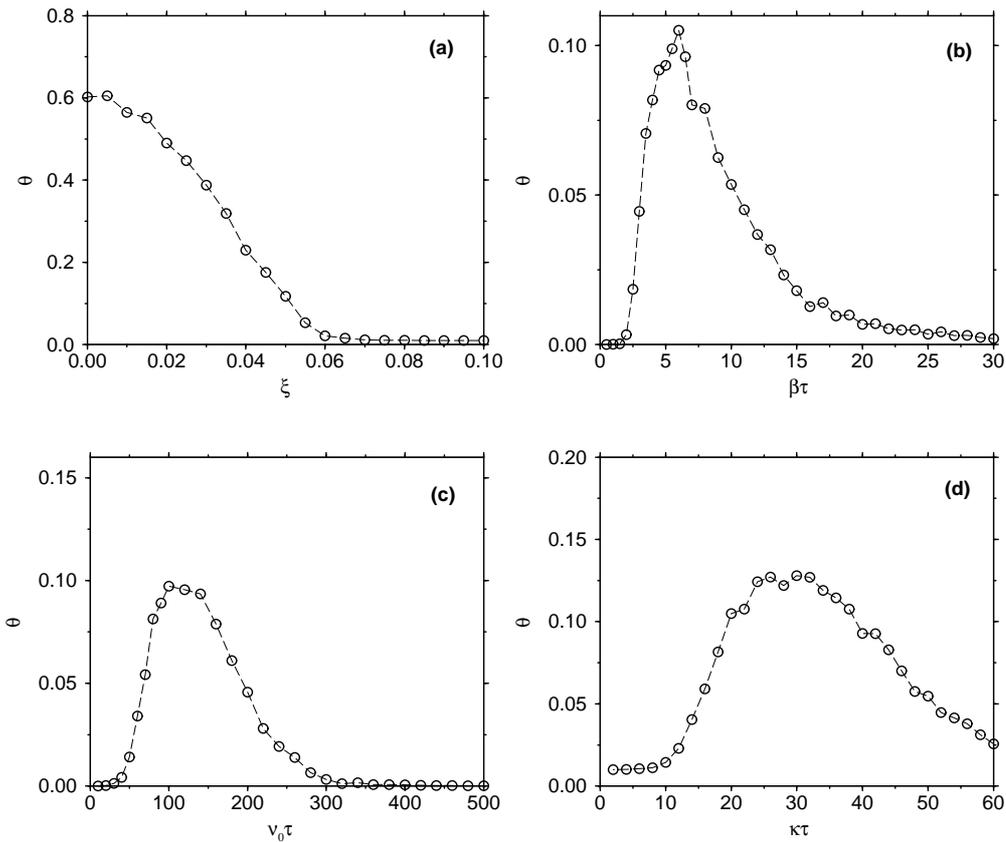


Abb. 5.6: Der Ordnungsparameter θ als Funktion der (a) relativen Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeit, (b) Bindungsrate β der regulatorischen Moleküle, (c) Bindungsrate ν_0 der Substratmoleküle und (d) die Dissoziationsrate κ der regulatorischen Moleküle. Die jeweils festgehaltenen Parameter sind $\sigma = 0.00125/\tau^2$ ($\xi = 0.05$), $\beta\tau = 5$, $\nu_0\tau = 100$, $\chi = 10^4$ und $\kappa\tau = 20$. Weitere Parameter sind $\gamma\tau = 15$, $\tau_1 = 0.55\tau$, $\nu\tau = 1$ und $N = 400$.

Abschließend ist in Abb. 5.6d der Ordnungsparameter θ als Funktion von κ der Dissoziationsrate der regulatorischen Produktmoleküle dargestellt. Oberhalb von $\kappa\tau \approx 4$ beginnt θ anzuwachsen und erreicht sein Maximum etwa bei $\kappa\tau \approx 20$. Für noch höhere Werte von κ verkleinert sich der Ordnungsparameter wieder, und die Synchronisationsintensität wird schwächer. Selbst für $\kappa\tau = 100$ (nicht in Abb. 5.6d dargestellt) ist die Synchronisation der Enzymzustände noch deutlich nachweisbar.

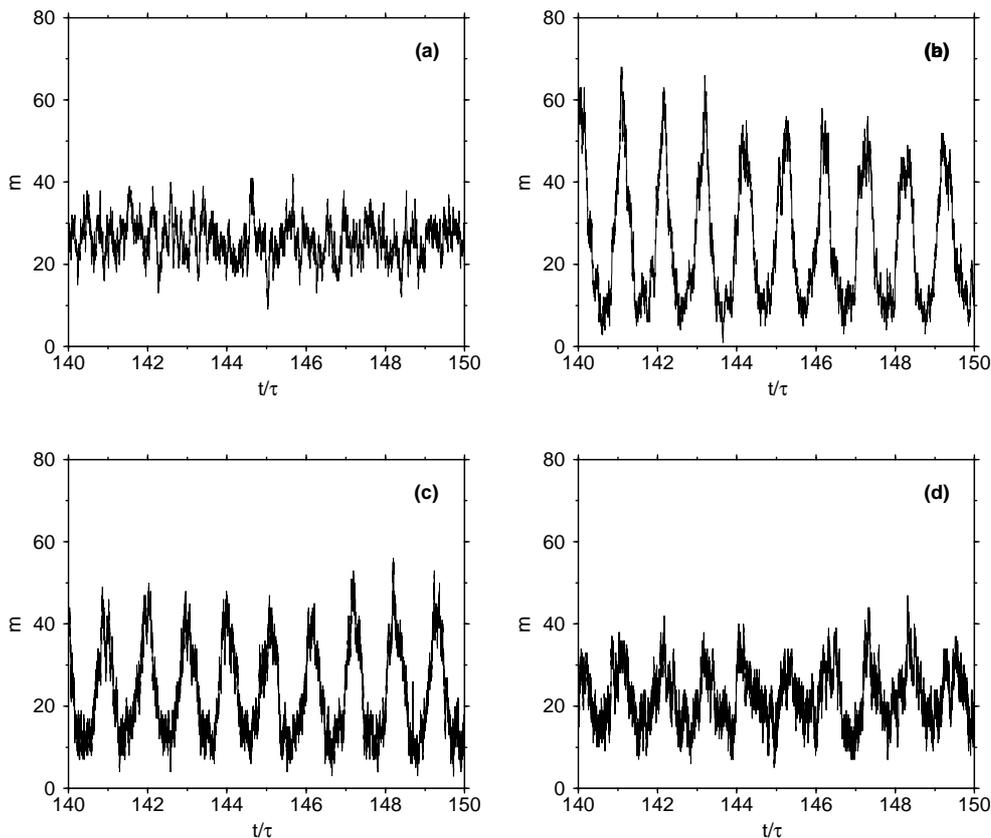


Abb. 5.7: Zeitabhängigkeit der Zahl der Produktmoleküle für vier verschiedene Werte der Bindungsrate für die regulatorischen Moleküle (a) $\beta\tau = 1$, (b) $\beta\tau = 5$, (c) $\beta\tau = 15$ und (d) $\beta\tau = 20$. Weitere Parameter wie in Abb. 5.5.

Typische Beispiele der Zahl der freien Produktmoleküle als Funktion der Zeit für verschiedene Werte von β sind in Abb. 5.7a-d gezeigt. Für sehr kleine Werte von β ist keine Synchronisation vorhanden (Abb. 5.7a, $\beta\tau = 1$). Oberhalb des Synchronisationsschwellwertes (Abb. 5.7b, $\beta\tau = 5$) entwickelt sich Spiking in der Zahl der freien Reaktionsprodukte. Die Amplitude des Spiking verringert sich jedoch für noch höhere Werte von β erneut (Abb. 5.7c, $\beta\tau = 15$), bis

es nur schwer von den natürlich auftretenden Zufallsschwankungen unterscheidbar ist (Abb. 5.7d, $\beta\tau = 20$). Obwohl Simulationen des stochastischen Modells der Gl. (5.4)-(5.7) bereits viele Informationen zu dem betrachteten System liefern, sind analytische Untersuchungen nötig, um die Synchronisationsparameter vorauszusagen, für die das System instabil wird. Solche analytischen Untersuchungen werden im folgenden Abschnitt durchgeführt.

5.3 Meanfield-Näherung des produktinhibierten Enzymsystems

Die Gleichungen der Meanfield-Näherung

Nun werden für das in Abschnitt 5.1 beschriebene stochastische Modell einer allosterischen Enzymreaktion die Mastergleichungen aufgestellt. Die Herangehensweise erfolgt analog wie in Kapitel 4 für das einfache Modell einer Enzymreaktion mit Produktaktivierung. Im Gegensatz zum einfachen Enzymsystem aus Kapitel 3, für das in Kapitel 4 die Mastergleichung aufgestellt und daraus die Meanfield-Gleichung hergeleitet wurde, wird jetzt die Bindung und Dissoziation der regulatorischen Produktmoleküle explizit berücksichtigt.

Der enzymatische Prozeß besteht wieder aus zwei Teilen. Einerseits aus dem Diffusions-Drift-Prozeß entlang der Reaktionskoordinate ϕ und andererseits im Aufenthalt des Enzyms im Grundzustand, der durch die Bindung eines Substratmoleküls beendet wird.

Der Abbau der freien Produktmoleküle (Umwandlung in Moleküle vom Typ C) erfolgt wieder mit der Rate γ . Die Bindung der regulatorischen Produktmoleküle mit der Rate β an die regulatorische Bindungsstelle des Enzyms kann nur im Grundzustand erfolgen, d.h. wenn noch kein Enzym-Substrat-Komplex gebildet wurde. Diese Annahme entspricht dem Modell aus Abschnitt 5.2¹.

Hat ein regulatorisches Produktmolekül gebunden, so ist der Wert der binären Zustandsvariablen $r = 1$, ansonsten 0. Bindung und Dissoziation der Produktmoleküle ändern jeweils die Anzahl der freien Produktmoleküle um 1. Die Dissoziation des regulatorischen Produktmoleküls von dieser Bindungsstelle erfolgt mit der Dissoziationsrate $\kappa(r)$. Da ein regulatorisches Produktmolekül nur dann dissoziieren kann, falls es vorher gebunden war, also $r = 1$ erfüllt ist, gilt $\kappa(1) = \kappa$ und $\kappa(0) = 0$.

Die Bindung eines Substratmoleküls durch das Enzym im Grundzustand erfolgt mit der Rate $\nu(r)$ (siehe Fußnote S. 71). Diese hängt also davon ab, ob ein regulatorisches Produktmolekül an das Enzym gebunden hat oder nicht. Falls

¹In den Modifikationen des Abschnitts 5.4 wird diese Annahme verändert.

nicht (d.h. $r = 0$), so ist $v(0) = v_0$, andernfalls (d.h. $r = 1$) ist $v(1) = v_1$. Daraus ergibt sich folgende Mastergleichung für die Wahrscheinlichkeitsdichte $P(\phi, r, m)$

$$\begin{aligned} \frac{\partial P(\phi, r, m)}{\partial t} &= -v \frac{\partial P(\phi, r, m)}{\partial \phi} + \sigma \frac{\partial^2 P(\phi, r, m)}{\partial \phi^2} \\ &+ \kappa(r+1)P(\phi, r+1, m-1) - \kappa(r)P(\phi, r, m) \\ &+ \gamma[(m+1)P(\phi, r, m+1) - mP(\phi, r, m)]. \end{aligned} \quad (5.8)$$

Die ersten beiden Terme auf der rechten Seite von Gl. (5.8) beschreiben den Diffusions-Drift-Prozeß mit der Diffusionskonstante σ und der Geschwindigkeit v . Der dritte und vierte Term geben den Einfluß der Änderung der Anzahl der freien Produktmoleküle durch die Dissoziation eines Produktmoleküls von der regulatorischen Bindungsstelle wieder. Der letzte Term charakterisiert den Abbau der Produkte.

Die Freisetzung des Produktmoleküls und damit die Dissoziation des *ES*-Komplexes im Verlauf des Enzymzyklus erfolgt am Phasenpunkt $\phi = k_p$. Da dieser Prozeß irreversibel ist, wird das gesamte Intervall $0 < \phi \leq 1$ der Reaktionskoordinate in zwei Segmente $(0, k_p - \varepsilon]$ und $(k_p, 1]$ eingeteilt. Für beide Teilintervalle werden die Randbedingungen an den Enden getrennt formuliert (siehe Abschnitt 4.1, S. 71). Die Bezeichnung $k_p - \varepsilon$ soll wieder den rechten Randpunkt des linken Intervalls $(0, k_p - \varepsilon]$ beschreiben. Die Zahl der freien Produktmoleküle m erhöht sich um 1, sobald der Punkt k_p im Zyklus durch das Enzym erreicht wird. Wegen der Irreversibilität der Produktentstehung stellt $k_p - \varepsilon$ einen absorbierenden rechten Rand des Teilintervalls $(0, k_p - \varepsilon]$ dar. Daraus ergibt sich, falls $\sigma > 0$ ist, die Randbedingung

$$P(k_p - \varepsilon, r, m) = 0. \quad (5.9)$$

Im Spezialfall $\sigma = 0$ liegt nur ein Driftprozeß mit der Geschwindigkeit v vor. Dann gilt diese Randbedingung nicht. Innerhalb des Teilintervalls $(k_p, 1]$ befindet sich das Enzym in der Relaxationsphase, um danach in den Grundzustand zurückzukehren. Der Fluß durch den linken Rand $\phi = k_p - \varepsilon$ muß gleich dem Fluß durch den rechten Rand des Intervalls $(0, k_p - \varepsilon]$ sein. Man erhält deshalb unter Verwendung von Gl. (4.4) für den Fluß

$$F(\phi, r, m) = vP(\phi, r, m) - \sigma \frac{\partial P(\phi, r, m)}{\partial \phi}$$

als Randbedingung an der Intervallgrenze k_p der Teilintervalle $(0, k_p - \varepsilon]$ und $(k_p, 1]$

$$F(k_p, r, m+1) = F(k_p - \varepsilon, r, m). \quad (5.10)$$

Darüberhinaus wird noch die Mastergleichung für die Aufenthaltswahrscheinlichkeit $Q(r, m, t)$ des Enzyms im Grundzustand und im Zustand r bei gleichzeitig vorhandenen m Produktmolekülen benötigt. Diese lautet

$$\begin{aligned} \frac{\partial Q(r, m)}{\partial t} = & F(1, r, m) - v(r)Q(r, m) + \gamma[(m+1)Q(r, m+1) - mQ(r, m)] \\ & + \beta(r-1)(m+1)Q(r-1, m+1) - \beta(r)mQ(r, m) \\ & + \kappa(r+1)Q(r+1, m-1) - \kappa(r)Q(r, m). \end{aligned} \quad (5.11)$$

Der erste Term gibt den Fluß an, mit dem das Enzym nach Beenden des Zyklus in den Grundzustand zurückkehrt. $v(r)Q(r, m)$ beschreibt das Verlassen des Grundzustandes, falls das Enzym ein Substratmolekül mit der Rate v bindet. Der dritte Term beschreibt den Abbau der Produkte mit der Rate γ . Der vierte Term erfaßt die Änderung der Anzahl freier Produktmoleküle durch Bindung eines Produktmoleküls an die regulatorische Bindungsstelle des Enzyms mit der Rate β und der letzte Term durch dessen Dissoziation mit der Rate κ .

Zusätzlich müssen die Randbedingungen an den Punkten $\phi = 0$ und $\phi = 1$ für die Wahrscheinlichkeitsdichte $P(\phi, r, m)$ berücksichtigt werden. Die Randbedingungen lauten

$$F(0, r, m) = \left[vP(\phi, r, m) - \sigma \frac{\partial P(\phi, r, m)}{\partial \phi} \right]_{\phi=0} = v(m)Q(r, m) \quad (5.12)$$

und

$$P(1, m) = 0. \quad (5.13)$$

Die genaue Begründung und Diskussion dieser Randbedingungen erfolgte in Abschnitt 4.1 und ist auch für dieses System gültig.

Mit denselben Argumenten² wie in Abschnitt 4, (S. 70) ist es möglich, bereits aus der Ein-Enzym-Mastergleichung die Meanfield-Gleichungen herzuleiten. Diese Herleitung erfolgt in Anhang A.3 aus den Mastergleichungen (5.8) und (5.11) mit den Randbedingungen (5.9), (5.10), (5.12) und (5.13). Im Folgenden werden nun die Struktur und Eigenschaften dieser Meanfield-Gleichungen diskutiert.

Wie bereits betont wurde, beschreiben die makroskopischen Gleichungen die Kinetik chemischer Reaktionen unter Vernachlässigung von Konzentrationsfluktuationen der Reaktanten. Im Grenzfall großer Enzymzahlen kann unser System durch die Einführung der Dichtefunktionen $\tilde{n}_0(\phi, t)$ und $\tilde{n}_1(\phi, t)$ beschrieben werden. Dabei gibt $\tilde{n}_0(\phi, t)\Delta\phi$ den Mittelwert von Enzymen an, die kein regulatorisches Produktmolekül gebunden haben und sich zum Zeitpunkt t im Phasenintervall $\phi + \Delta\phi$ innerhalb des Enzymzyklus befinden. Hingegen gibt die Funktion

²Die Enzyme sind identisch, und es existieren keine direkten Wechselwirkungen zwischen den Enzymzuständen verschiedener Enzyme. Es gibt nur Wechselwirkungen zwischen den Enzymzuständen und der Zahl der freien regulatorischen Moleküle.

$\tilde{n}_1(\phi, t)\Delta\phi$ jene Enzyme desselben Intervalls an, die ein Produktmolekül gebunden haben. Zusätzlich wird die Konzentration $n_0(t)$ der Enzyme im Grundzustand eingeführt, die kein regulatorisches Produktmolekül gebunden haben. Analog wird die Konzentration $n_1(t)$ der Enzyme mit gebundenem Produktmolekül eingeführt. Schließlich wird die Konzentration m der freien Reaktionsprodukte definiert, die den Mittelwert der Produkte zur Zeit t darstellt.

Die makroskopischen Gleichungen für $\tilde{n}_0(\phi, t)$ und $\tilde{n}_1(\phi, t)$ sind

$$\frac{\partial \tilde{n}_1(\phi, t)}{\partial t} = -v \frac{\partial \tilde{n}_1(\phi, t)}{\partial \phi} - \kappa \tilde{n}_1(\phi, t) + \sigma \frac{\partial^2 \tilde{n}_1(\phi, t)}{\partial \phi^2} \quad (5.14)$$

und

$$\frac{\partial \tilde{n}_0(\phi, t)}{\partial t} = -v \frac{\partial \tilde{n}_0(\phi, t)}{\partial \phi} + \kappa \tilde{n}_1(\phi, t) + \sigma \frac{\partial^2 \tilde{n}_0(\phi, t)}{\partial \phi^2}. \quad (5.15)$$

Die Zeitentwicklung der Dichtefunktionen $\tilde{n}_0(\phi, t)$ und $\tilde{n}_1(\phi, t)$ setzt sich aus einer Drift mit konstanter Geschwindigkeit v , begleitet von Diffusion entlang der Reaktionskoordinate ϕ , zusammen. Zusätzlich wird in diesen Gleichungen die Abnahme der Konzentrationsdichte $\tilde{n}_1(\phi, t)$ der inhibierten Enzyme innerhalb des Zyklus durch Dissoziation der regulatorischen Reaktionsprodukte mit der Rate κ und die dadurch bedingte gleichzeitige Zunahme der Konzentrationsdichte $\tilde{n}_0(\phi, t)$ der aktiven Enzyme berücksichtigt. Bei allen weiteren Untersuchungen in diesem Abschnitt werden Fluktuationen innerhalb des Enzymzyklus als vernachlässigbar klein angenommen. Deshalb wird in Gl. (5.14) und (5.15) $\sigma = 0$ gesetzt.

Die Randbedingungen der Gl. (5.14) und (5.15) am Punkt $\phi = 0$ sind unter dieser Voraussetzung durch

$$v\tilde{n}_1(0, t) = v_1 n_1(t), \quad (5.16)$$

$$v\tilde{n}_0(0, t) = v_0 n_0(t) \quad (5.17)$$

gegeben. Das bedeutet, daß die ein Substratmolekül bindenden Enzyme im Grundzustand einen Fluß für die Konzentrationsdichte $\tilde{n}_1(\phi, t)$ an der Stelle $\phi = 0$ erzeugen. Weitere Randbedingungen werden im Spezialfall $\sigma = 0$ nicht benötigt. Insbesondere ist eine Separation des Intervalls $(0, 1]$ der Reaktionskoordinate in Teilintervalle $(0, k_p - \varepsilon]$, $(k_p, 1]$ unnötig. Da die Dynamik der Reaktionskoordinate nur durch die Drift mit der Geschwindigkeit v bestimmt ist, verläuft die Bewegung irreversibel. Die Freisetzung des Produktmoleküls an der Stelle $\phi = k_p$ und die Beendigung des Enzymzyklus an der Stelle $\phi = 1$ sind somit unumkehrbar.

Die Gleichung zur Beschreibung der Konzentrationsänderung der inhibierten Enzyme im Grundzustand hat die Form

$$\frac{dn_1}{dt} = \beta m(t)n_0(t) - \kappa n_1(t) - v_1 n_1(t) + v\tilde{n}_1(1, t). \quad (5.18)$$

Der erste Term auf der rechten Seite dieser Gleichung berücksichtigt, daß die Zahl $n_1(t)$ der inhibierten Enzyme durch die Bindung eines regulatorischen Produktmoleküls durch ein nichtinhibiertes Enzym anwächst. Analog beschreibt der zweite Term die Konzentrationsabnahme der inhibierten Enzyme durch den Dissoziationsprozeß der regulatorischen Produktmoleküle. Der letzte Term der Gleichung beschreibt das Anwachsen der Konzentration $n_1(t)$ durch Enzyme, die den Enzymzyklus gerade beendet haben und in den Grundzustand zurückkehren. Eine ähnliche Gleichung gilt für die Konzentration n_0 der nichtinhibierten Enzyme im Grundzustand:

$$\frac{dn_0}{dt} = -\beta m(t)n_0(t) + \kappa n_1(t) - \nu_0 n_0(t) + \nu \tilde{n}_0(1, t). \quad (5.19)$$

Nun wird noch die Gleichung zur Beschreibung der Konzentrationsänderung der freien Reaktionsprodukte im Reaktionsvolumen benötigt:

$$\begin{aligned} \frac{dm}{dt} = & -\gamma m(t) + \nu \tilde{n}_1(k_p, t) + \nu \tilde{n}_0(k_p, t) + \kappa n_1(t) \\ & -\beta m(t)n_0(t) + \kappa \int_0^1 \tilde{n}_1(\phi, t) d\phi. \end{aligned} \quad (5.20)$$

Der erste Term auf der rechten Seite dieser Gleichung beschreibt den Abbau der Produktmoleküle durch weitere nicht näher spezifizierte chemische Reaktionen. Der zweite und dritte Term gibt die Konzentrationserhöhung der freien Produktmoleküle durch Freisetzung von Reaktionsprodukten am Phasenpunkt $\phi = k_p$ innerhalb des Zyklus an. Der vierte und fünfte Term erfaßt die Veränderung der Reaktionsprodukte durch Dissoziation und Bindung dieser Moleküle an der regulatorischen Bindungsstelle der Enzyme im Grundzustand. Der letzte Term gibt die Konzentrationserhöhung der freien Produkte durch Dissoziation von den Enzymen im Zyklus an.

Die Gesamtzahl

$$N = n_1(t) + n_0(t) + \int_0^1 \tilde{n}_1(\phi, t) d\phi + \int_0^1 \tilde{n}_0(\phi, t) d\phi \quad (5.21)$$

der Enzyme im System ist eine Erhaltungsgröße. Diese konstante Zahl N setzt sich aus der Zahl der Enzyme im Grundzustand und der Enzyme im katalytischen Zyklus zusammen.

Die Gleichungen (5.14)-(5.21) bilden die Meanfield-Näherung und wurden in Anhang A.3 aus den Mastergleichungen 5.8 und 5.11 hergeleitet. Diese Gleichungen können noch weiter zu drei Delay-Differentialgleichungen reduziert werden. Die analytische Lösung von Gl. (5.14) und (5.15) lautet für $\sigma = 0$

$$\tilde{n}_1(\phi, t) = \frac{\nu_1}{\nu} e^{-\kappa \frac{\phi}{\nu}} n_1\left(t - \frac{\phi}{\nu}\right), \quad (5.22)$$

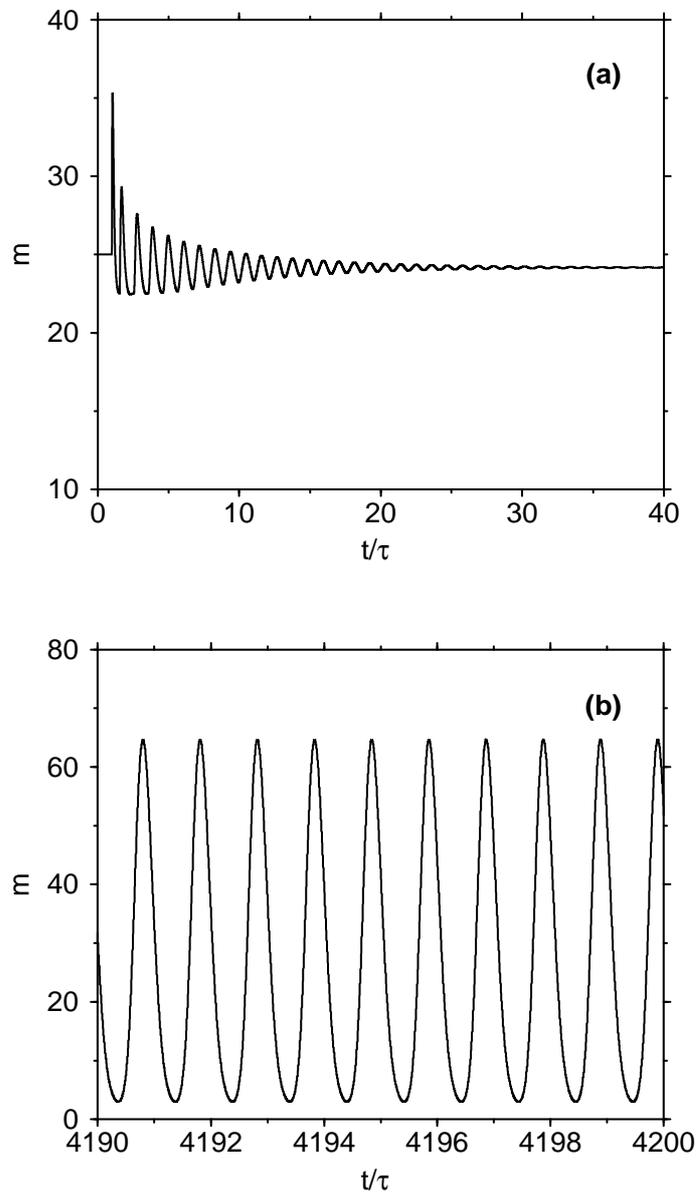


Abb. 5.8: Zeitabhängigkeit der Zahl der Produktmoleküle aus der numerischen Integration der makroskopischen Gleichungen: (a) für dieselben Parameter wie in Abb. 5.2 und (b) für dieselben Parameter wie in Abb. 5.3.

$$\tilde{n}_0(\phi, t) = \frac{v_1}{v} (1 - e^{-\kappa \frac{\phi}{v}}) n_1(t - \frac{\phi}{v}) + \frac{v_0}{v} n_0(t - \frac{\phi}{v}). \quad (5.23)$$

Durch Einsetzen der Lösungen (5.22) und (5.23) in Gl. (5.19)-(5.20) ergeben sich folgende Gleichungen:

$$\begin{aligned} \frac{dn_1}{dt} = & \beta m(t) n_0(t) - \kappa n_1(t) - v_1 n_1(t) \\ & + v_1 n_1(t - \tau) e^{-\kappa \tau}, \end{aligned} \quad (5.24)$$

$$\begin{aligned} \frac{dn_0}{dt} = & -\beta m(t) n_0(t) + \kappa n_1(t) - v_0 n_0(t) + v_1 n_1(t - \tau) (1 - e^{-\kappa \tau}) \\ & + v_0 n_0(t - \tau), \end{aligned} \quad (5.25)$$

$$\begin{aligned} \frac{dm(t)}{dt} = & -\gamma m(t) + v_1 n_1(t - \tau_1) + v_0 n_0(t - \tau_1) + \kappa n_1(t) \\ & - \beta m(t) n_0(t) + \kappa \int_0^\tau v_1 n_1(t - t') e^{-\kappa t'} dt'. \end{aligned} \quad (5.26)$$

Weiter unten in diesem Abschnitt werden diese Gleichungen numerisch integriert und diese Ergebnisse mit den Resultaten der Untersuchungen des stochastischen Modells verglichen. Zur Integration wurde der Algorithmus aus Abschnitt 4.2 entsprechend angepaßt. Für die Gl. (5.24)-(5.26) wird ebenfalls eine lineare Stabilitätsanalyse durchgeführt, die für dieses dynamische System die Erstellung von Bifurkationsdiagrammen erlaubt, um dadurch die Synchronisationsbedingungen zu bestimmen.

Abb. 5.8 zeigt die Zeitabhängigkeit der Anzahl der Produktmoleküle in der makroskopischen Näherung. Für kleine Bindungsraten β der regulatorischen Produktmoleküle wie in Abb. 5.8a ist kein Spiking vorhanden, und nach einer Störung wird innerhalb einer kurzen Transientzeit ein konstantes Niveau in der Produktmolekülkonzentration erreicht. Für höhere Werte der Bindungsrate β können beständige Oszillationen in der Produktmolekülzahl beobachtet werden (Abb. 5.8b).

Lineare Stabilitätsanalyse

Wie bereits betont, wurden in der makroskopischen Näherung Fluktuationen vernachlässigt. Es muß daher erwartet werden, daß diese Näherung nur gültig ist, wenn die Zahl der beteiligten Moleküle sehr groß ist. Interessanterweise haben wir jedoch gefunden, daß bereits für relativ geringe Molekülzahlen und den damit verbundenen starken Fluktuationen die makroskopischen Gleichungen das mittlere Konzentrationsniveau und die charakteristischen Frequenzen und Amplituden des Spiking zuverlässig beschreiben.

Die Bereiche im Parameterraum, in denen Spiking auftritt, werden im Folgenden durch eine lineare Stabilitätsanalyse bestimmt. Die Gesamtzahl der Enzyme ist durch Gl. (5.21) gegeben. Falls sich das System im stationären Zustand befindet, beschrieben durch \bar{n}_0 , \bar{n}_1 , und \bar{m} , vereinfacht sich Gl. (5.21) zu

$$N = \bar{n}_1 + \bar{n}_0 + v_1 \bar{n}_1 + v_0 \bar{n}_0 \quad (5.27)$$

oder

$$\bar{n}_0 = \frac{N - \bar{n}_1 - v_1 \bar{n}_1}{1 + v_0}. \quad (5.28)$$

Setzt man diese Gleichung in Gl. (5.24) ein, ergibt sich mit $\dot{n}_1(t) = 0$

$$\bar{n}_1 = \frac{\beta \bar{m} N}{\beta \bar{m} (1 + v_1) + (\kappa + v_1 (1 - e^{-\kappa})) (1 + v_0)}. \quad (5.29)$$

Durch Eliminierung von \bar{n}_0 und \bar{n}_1 im stationären Fall in Gl. (5.26) findet man

$$\begin{aligned} \bar{m}^2 + \bar{m} \frac{1}{1 + v_1} \left[\frac{1}{\beta} (\kappa + v_1 (1 - e^{-\kappa})) (1 + v_0) \right. \\ \left. + \frac{N}{\gamma} (\kappa + v_1 (1 - e^{-\kappa})) - \frac{N}{\gamma} (\kappa + v_1 (2 - e^{-\kappa})) \right] \\ - \frac{N v_0 (\kappa + v_1 (1 - e^{-\kappa}))}{\beta \gamma (1 + v_1)} = 0. \end{aligned} \quad (5.30)$$

Diese quadratische Gleichung hat zwei Wurzeln, die leicht berechnet werden können. Ihre Lösungen repräsentieren die Produktkonzentration im stationären Fall. Daher wird nur die positive Wurzel von Gl. (5.30) benutzt. Die Lösung \bar{m} , \bar{n}_0 , und \bar{n}_1 der Gl. (5.28)-(5.30) definieren den positiven Fixpunkt der zum stationären Zustand der makroskopischen Gleichungen gehört, in dem die Enzymphasen nicht korreliert sind und keine Synchronisation auftritt.

Nun kann die Stabilität dieses Fixpunktes hinsichtlich kleiner Störungen $m = \bar{m} + \delta m$, $n_0 = \bar{n}_0 + \delta n_0$, $n_1 = \bar{n}_1 + \delta n_1$ untersucht werden. Diese werden in Gl. (5.24)-(5.26) eingesetzt, und nach der Linearisierung dieser Gleichungen erhält man

$$\begin{aligned} \frac{d\delta n_1}{dt} = & \beta \bar{m} \delta n_0(t) + \beta \bar{n}_0 \delta m(t) - \kappa \delta n_1(t) - v_1 \delta n_1(t) \\ & + v_1 \delta n_1(t-1) e^{-\kappa}, \end{aligned} \quad (5.31)$$

$$\begin{aligned} \frac{d\delta n_0}{dt} = & -\beta \bar{m} \delta n_0(t) - \beta \bar{n}_0 \delta m(t) + \kappa \delta n_1(t) - v_0 \delta n_0(t) \\ & + v_1 \delta n_1(t-1) (1 - e^{-\kappa}) + v_0 \delta n_0(t-1), \end{aligned} \quad (5.32)$$

$$\begin{aligned} \frac{d\delta m}{dt} = & -\gamma \delta m(t) + v_1 \delta n_1(t - \tau_1) + v_0 \delta n_0(t - \tau_1) + \kappa \delta n_1(t) \\ & - \beta \bar{m} \delta n_0(t) - \beta \bar{n}_0 \delta m(t) + \kappa \int_0^1 v_1 \delta n_1(t-t') e^{-\kappa t'} dt'. \end{aligned} \quad (5.33)$$

Die Lösungen dieser linearen Differential-Delay-Gleichungen werden in der Form $\delta n_1(t) = A \exp(\lambda t)$, $\delta n_0(t) = B \exp(\lambda t)$ und $\delta n_1(t) = C \exp(\lambda t)$ angenommen. Geht man mit diesen Lösungen in Gl. (5.31)-(5.33) ein, erhält man ein lineares homogenes Gleichungssystem

$$\hat{\mathbf{D}} \begin{pmatrix} A \\ B \\ C \end{pmatrix} = \lambda \begin{pmatrix} A \\ B \\ C \end{pmatrix} \quad (5.34)$$

mit der Koeffizientenmatrix

$$\hat{\mathbf{D}} = \begin{pmatrix} \kappa + v_1(a - e^{-\lambda - \kappa}) & \beta \bar{m} & -\beta \bar{n}_0 \\ -\kappa - v_1 e^{-\lambda} (1 - e^{-\kappa}) & \beta \bar{m} + v_0 (1 - e^{-\lambda}) & \beta \bar{n}_0 \\ \frac{v_1 \kappa}{\lambda + \kappa} (e^{-\lambda - \kappa} - 1) - \kappa - v_1 e^{-\lambda \tau_1} & \beta \bar{m} - v_0 e^{-\lambda \tau_1} & \gamma + \beta \bar{n}_0 \end{pmatrix}. \quad (5.35)$$

Die Lösbarkeitsbedingung dieses linearen homogenen Gleichungssystems ist gegeben durch die charakteristische Gleichung

$$\det(\hat{\mathbf{D}} - \lambda \mathbf{I}) = 0. \quad (5.36)$$

Diese quasipolynomiale charakteristische Gleichung hat eine unendliche Anzahl von komplexwertigen Lösungen $\lambda_j = \Gamma_j + i\omega_j$. Falls für eine gewählte Parametermenge die Realteile Γ_j aller Eigenwerte λ_j kleiner Null sind, ist der stationäre Zustand linear stabil. Falls hingegen mindestens ein Eigenwert $\Gamma_j > 0$ ist, wird der stationäre Zustand instabil und Oszillationen mit der Frequenz ω_j treten auf. Die Instabilitätsgrenze wird durch die Bedingung $\Gamma_i = 0$ bestimmt. Numerische Untersuchungen von Gl. (5.36) zeigen, daß nur für die kleinste Mode $j = 1$ mit $\omega \approx 2\pi/\tau$ der Realteil Γ_i Null werden kann.

Abb. 5.9 zeigt die Bifurkationslinien in der Parameterebene (τ_1, β) , die durch numerische Lösung von Gl. (5.36) für zwei verschiedene Substratbindungsraten v_0 erhalten wurden. Innerhalb der durch die durchgehenden und gestrichelten Linien gelegenen Gebiete wird der stationäre Zustand instabil und Spiking entwickelt sich. Die große Instabilitätsregion in Abb. 5.9a gehört zur höheren Bindungsrate $v_0\tau = 100$, wohingegen die kleinere Region zu $v_0\tau = 20$ gehört. Falls man daher τ_1 konstant hält und den Parameter β erhöht, bis die untere (durchgezogene) Bifurkationslinie gekreuzt wird, verliert das System seine Stabilität und beginnt zu oszillieren. Falls man jedoch β solange erhöht, bis die obere gestrichelte Line überschritten wird, werden die Oszillationen ausgedämpft und das System kehrt in den stationären Zustand zurück. Daraus folgt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des stochastischen Modells (siehe Abb. 5.9b), daß Synchronisation nur innerhalb eines bestimmten "Fensters" des Parameters β auftritt. Dabei

ist dieses Fenster um so schmaler (dünne Linie in Abb. 5.9a), je kleiner die Substratbindungsrate v_0 ist. Darüberhinaus ist die Synchronisation nur in einem kleineren Intervall der Parameters τ_1 zu finden, d.h. nur dann, wenn das entstehende Reaktionsprodukt etwa in der Mitte des Enzymzyklus freigesetzt wird.

Der Realteil von λ verschwindet auf der Bifurkationslinie, wohingegen der Imaginärteil endlich bleibt. Dieser Wert des Imaginärteils bestimmt die Oszillationsfrequenz des Systems, wenn der stationäre Zustand verloren geht.

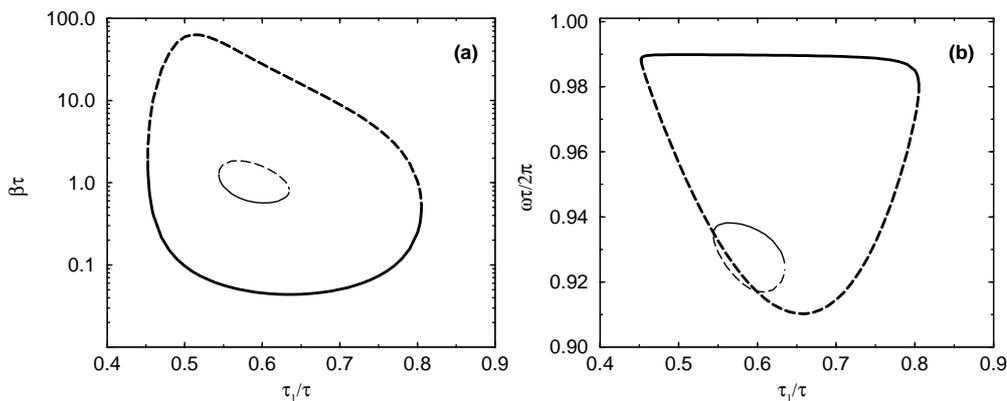


Abb. 5.9: Bifurkationsdiagramm (a) in der Parameterebene (τ_1 , β) für zwei verschiedene Werte der Substratbindungsrate v_0 . Die dickeren Kurven gehören zu $v_0\tau = 100$ und die dünneren Kurven zu $v_0\tau = 20$. (b) die dazugehörigen Spikingfrequenzen an der Bifurkationslinie. Weitere Parameter sind $\gamma\tau = 15$, $\chi = 10^4$, $\kappa\tau = 20$ und $N = 400$.

In Abb. 5.9b ist der Imaginärteil von λ entlang der Bifurkationslinien von Abb. 5.9a als Funktion von τ_1 dargestellt. Die durchgezogene (gestrichelte) Linie in Abb. 5.9b gehört zu den durchgezogenen (gestrichelt) gezeichneten Bifurkationslinien in Abb. 5.9a. Man sieht, daß für die untere Bifurkationslinie in Abb. 5.9a, die zur höheren Substratbindungsrate v_0 gehört, die Frequenz der Oszillationen nahe bei $\omega_0 \approx 2\pi/\tau$ liegt und damit dessen zeitliche Periode ungefähr mit der Turnover-Zeit τ übereinstimmt. Bevor die Oszillation beim Überschreiten der oberen gestrichelten Bifurkationslinie verschwinden, weisen sie jedoch eine etwas längere Periode auf. Das kann durch die längere mittlere Wartezeit der Enzyme im Grundzustand erklärt werden, die durch die starke Produktinhibition bei höherer Produktbindungsrate β hervorgerufen wird.

Abb. 5.10a zeigt die Bifurkationslinien in der Parameterebene (κ , β) für die gleichen beiden Werte der Substratbindungsrate v_0 wie in Abb. 5.9. Es werden hier dieselben Bezeichnungen wie oben benutzt. Man kann erkennen, daß in Abhängigkeit von v_0 und β die Instabilität, die zu Spiking führt, nur oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes der Dissoziationskonstante κ auftritt.

Obwohl in Abb. 5.10a die Bifurkationslinien nur für $\kappa \leq 60$ dargestellt sind, kann man diese Bifurkationslinien auch noch für viel höhere Werte von κ finden. Synchronisation existiert auch noch für extrem hohe Dissoziationsraten (verglichen mit der Wechselzahl τ^{-1} der Enzyme). Das stimmt mit den numerischen Simulationen des stochastischen Modells überein, das eine Abschwächung der Synchronisationsstärke für höhere Dissoziationsraten κ aufweist, jedoch kein völliges Verschwinden der Synchronisation zeigt (siehe z.B. Abb. 5.6d). In Abb. 5.10b ist der Imaginärteil entlang der Bifurkationslinien von Abb. 5.10a dargestellt.

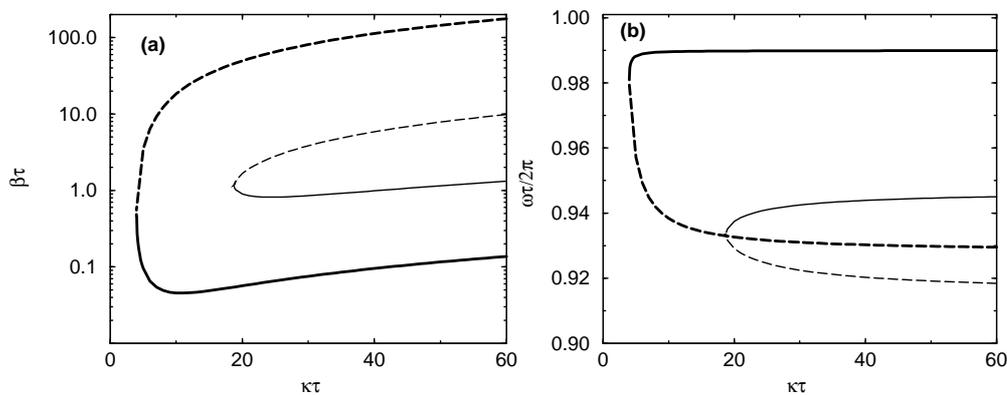


Abb. 5.10: Bifurkationsdiagramm (a) in der Parameterebene (κ , β) für zwei verschiedene Werte der Substratbindungsrate v_0 . Die dickeren Kurven gehören zu $v_0\tau = 100$ und die dünneren Kurven zu $v_0\tau = 20$. (b) zeigt die dazugehörigen Spikingfrequenzen an der Bifurkationslinie. Weitere Parameter sind $\gamma\tau = 15\tau$, $\chi = 10^4$, $k_p = 0.55$ und $N = 400$.

Abschließend wird noch an einem Beispiel der Verlauf der Instabilitätsgrenzen in der Parameterebene (β , v_0) dargestellt. Unterhalb von $v_0 = 19\tau^{-1}$ ist das System für alle Werte des Bifurkationsparameters β stabil. Für höhere Werte von v_0 wird das System bei Erhöhung von β zuerst instabil. Das geschieht beim Kreuzen der unteren Linie in Abb. 5.11 in vertikaler Richtung von unten nach oben. Eine weitere Erhöhung von β für konstantes v_0 führt zum Überschreiten einer zweiten Linie, oberhalb derer das System wieder stabil wird. Mit wachsender Bindungsrate v_0 erhöht sich der Parameterbereich, für den das Reaktionssystem Oszillationen zeigt, immer weiter.

Die numerischen Lösungen der nichtlinearen Evolutionsgleichungen (5.24)-(5.26) der makroskopischen Näherung zeigen, daß, wenn der Parameter β , der die Bindungsrate der Produktmoleküle bestimmt, leicht erhöht wird, der stationäre Zustand tatsächlich seine Stabilität an dem durch die lineare Stabilitätsanalyse vorausgesagten Punkt verliert. Das führt zu Oszillationen mit kleiner Amplitude Δm . Die Amplitude dieser Oszillationen erhöht sich mit wachsendem β stetig. Die Bifurkation ist superkritisch (Abb. 5.12).

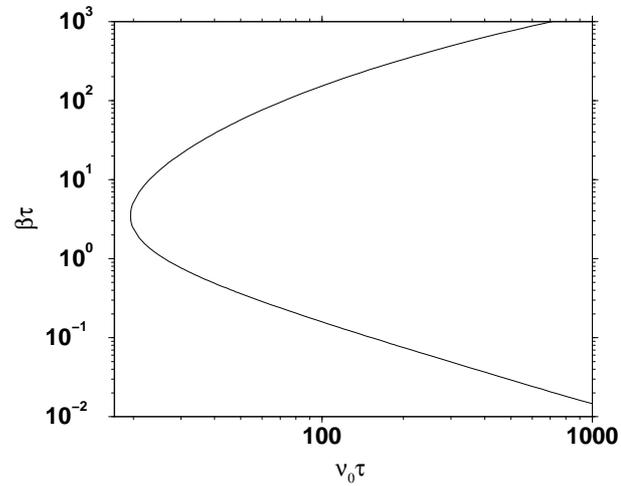


Abb. 5.11: Bifurkationsdiagramm in der Parameterebene (β , ν_0) für $\gamma\tau = 20$, $\kappa\tau = 20$, $\chi = 10^4$, $k_p = 0.55$ und $N = 200$.

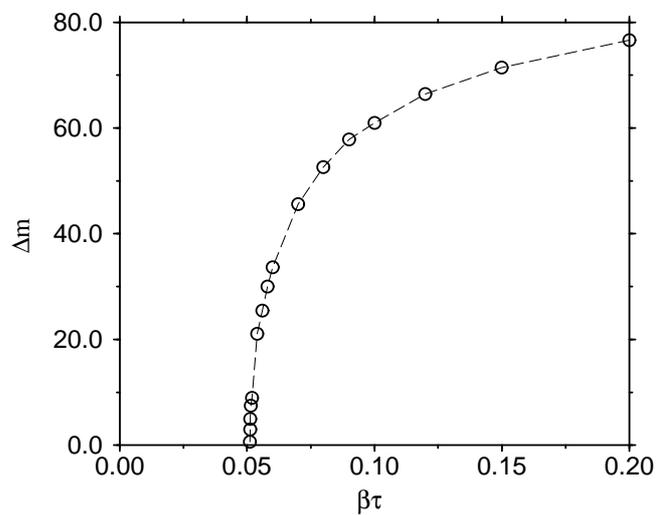


Abb. 5.12: Oszillationsamplitude Δm als Funktion von β in der makroskopischen Näherung $\nu_0\tau = 100$, $\chi = 10^4$, $\gamma\tau = 15$, $\tau_1 = 0.55\tau$, $\kappa\tau = 20\tau$ und $N = 400$.

Für die Abhängigkeit des Verlaufs der Bifurkationslinien von der Gesamtzahl der Enzyme N im Reaktionsvolumen gilt dasselbe, was am Ende des Kapitels 4 gesagt wurde. Die Meanfield-Gleichungen (5.14)-(5.21) sind wieder unter der Skalentransformation $\beta \rightarrow \beta/c$, $m \rightarrow cm$, $n \rightarrow cn$ usw. für irgendeine Konstante c invariant. Falls die Gesamtzahl N der Enzyme um einen Faktor c verändert wird, ändert sich die Zahl der Reaktionsprodukte und Substratmoleküle proportional dazu. Die Existenz dieser Skalentransformation kann zur Bestimmung der Bifurkationsdiagramme für beliebige N benutzt werden. In Abb. 5.9 sind die Bifurkationslinien z.B. für $N = 400$ Enzyme bestimmt worden. Falls man das Bifurkationsdiagramm für $N = 4000$ Enzyme bestimmen möchten, muß β durch $\beta/10$ im ursprünglichen Diagramm ersetzt werden.

5.4 Modifikationen des Inhibitionsmechanismus

In diesem Abschnitt werden zwei Modifikationen des stochastischen Modells hinsichtlich des Mechanismus der Bindung der regulatorischen Produktmoleküle untersucht. Im stochastischen Modell, daß in Abschnitt 5.2 numerisch untersucht wurde, war die Bindung der regulatorischen Produktmoleküle durch die Enzyme nur dann möglich, wenn sich diese im Grundzustand befanden. Im Allgemeinen wird die Fähigkeit der Enzyme, ein regulatorisches Molekül zu binden, von dessen Zustand abhängen. Für reale Enzyme ist diese Abhängigkeit zur Zeit noch nicht bekannt und möglicherweise sehr kompliziert. Im Folgenden werden zwei mögliche Modifikationen betrachtet und durch numerische Simulationen gezeigt, daß der Effekt gegenseitiger Synchronisation der Enzymzustände in beiden vorkommt.

Modifikation 1

In der ersten Modifikation des ursprünglichen stochastischen Modells wird davon ausgegangen, daß ein Enzym ein regulatorisches Produktmolekül unabhängig von seinem Zustand, sowohl im Grundzustand, als auch wenn es sich innerhalb des katalytischen Zyklus befindet, mit konstanter Bindungsrate binden kann. Das bedeutet, die Bindung des regulatorischen Moleküls durch das Enzym i ist nun mit konstanter Rate β unabhängig von den Zustandsvariablen u_i und ϕ_i möglich. Wie auch im ursprünglichen stochastischen Modell hängt die Dissoziation der regulatorischen Moleküle nicht vom Enzymzustand ab. Mit diesem modifizierten Modell wurden numerische Simulationen durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt sind. Wie in Abschnitt 5.1 ist $N = 400$ die Gesamtzahl der Enzyme, $v\tau = 1$ die Drift-Geschwindigkeit in der Langevin-Gleichung (3.11) und $\chi = 10^4$ die Inhibitionsstärke. Zur Bestimmung der parameterabhängigen Syn-

chronisationsstärke benutzt man wieder den Parameter θ , der in Gl. (3.38) eingeführt wurde. Es wird immer solange gewartet, bis der Transient vorbei ist. Danach wird durch Mittelwertbildung zur Eliminierung statistischer Fluktuationen über ein Zeitintervall 4000τ der Wert dieses Parameters berechnet.

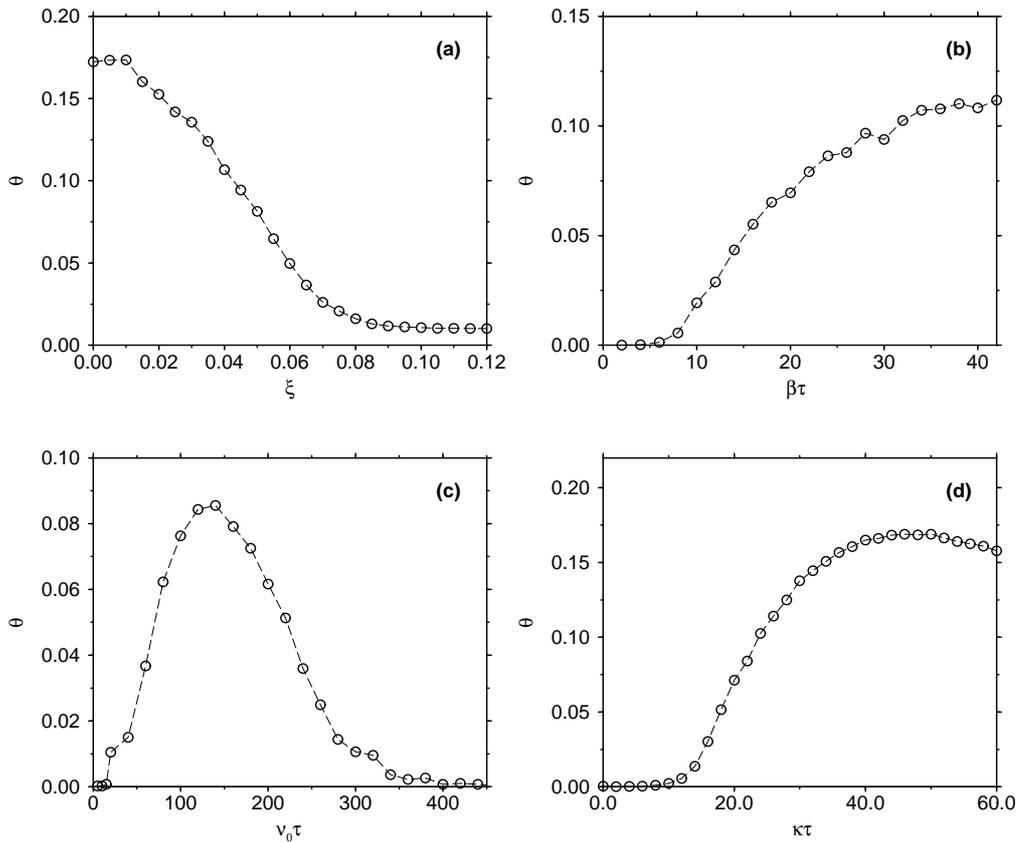


Abb. 5.13: Der Ordnungsparameter θ als Funktion der (a) relativen Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeit, (b) Bindungsrate β der regulatorischen Moleküle, (c) Bindungsrate ν_0 der Substratmoleküle und (d) Dissoziationsrate κ der regulatorischen Moleküle in Modifikation 1. Die jeweils festgehaltenen Parameter sind $\sigma = 0.00125/\tau^2$ ($\xi = 0.05$), $\beta\tau = 20\tau$, $\nu_0\tau = 100$, $\chi = 10^4$ und $\kappa\tau = 20$. Weitere Parameter sind $\gamma\tau = 25$, $\tau_1 = 0.55\tau$, $\nu\tau = 1$ und $N = 400$.

Zuerst wird der Einfluß von Fluktuationen innerhalb des enzymatischen Zyklus untersucht. Während alle anderen Parameter festgehalten werden, wird der Ordnungsparameter θ für verschiedene Rauschintensitäten σ (Gl. (3.11) und (3.9)), die nach Gl. (3.33)-(3.35) die relative Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeiten bestimmen, berechnet. Das Ergebnis ist in Abb. 5.13a dargestellt. Wie darin erkennbar, ist Synchronisation auch in diesem modifizierten Modell vorhanden. Die Abhängigkeit des Parameters θ von ξ ist qualitativ ähnlich zu

jener, die in Abb. 5.6a gezeigt ist. Synchronisation existiert bis zu einem Niveau von $\xi \approx 0.1$.

Als nächstes hält man die Rauschintensität σ (und damit ξ) fest und variiert den Parameter β , der die Bindungsrate der regulatorischen Produktmoleküle festlegt. Abb. 5.13b zeigt die Abhängigkeit von θ als Funktion von β . Unterhalb von $\beta = 5\tau^{-1}$ ist praktisch keine Synchronisation vorhanden. Der Ordnungsparameter θ wächst monoton mit wachsendem β , auch noch für sehr hohe Bindungsraten β , im Gegensatz zum ursprünglichen Modell, wo Synchronisation nur innerhalb eines bestimmten Intervalls von β gefunden wurde (Abb. 5.6b).

In einer weiteren Reihe von Simulationen, variieren die Bindungsrate v_0 , die die Bindung eines Substratmoleküls an das Enzym beschreibt. Die Synchronisationsstärke θ als Funktion von v_0 ist in Abb. 5.13c gezeigt. Es stellt sich heraus, daß für sehr kleine Bindungsraten $v_0 < 30\tau_0^{-1}$ keine Synchronisation vorhanden ist. Innerhalb des Intervalls $30 < v_0\tau^{-1} < 350$ existiert Spiking, wohingegen für noch höhere Werte von v_0 das Synchronisationsphänomen erneut verschwindet. Solch ein Synchronisationsfenster als Funktion der Substratbindungsrate wurde bereits in Abb. 5.6c des ursprünglichen Modells gefunden.

Abschließend wird in Abb. 5.13d der Ordnungsparameter θ als Funktion der Produktmoleküldissoziationsrate κ dargestellt. Die Synchronisation beginnt bei etwa $\kappa \approx 13\tau^{-1}$. Der Parameter θ wächst monoton mit wachsendem κ , bis er bei $\kappa \approx 35\tau^{-1}$ nahezu unverändert bleibt. Diese Parameterabhängigkeit unterscheidet sich von dem klaren Maximum, das im ursprünglichen Modell gefunden wurde (Abb. 5.6d).

Modifikation 2

In der zweiten untersuchten Modifikation des stochastischen Modells wird angenommen, daß die Bindung eines regulatorischen Moleküls an das Enzym in jedem Molekülzustand möglich ist außer in der Phase, die nach Freisetzung des Reaktionsprodukts beginnt und bis zur Rückkehr in den Grundzustand andauert. Daher ist $\beta(u_i, \phi_i) = \beta$, falls $u_i = 0$. Wenn hingegen $u_i = 1$ und $\phi_i > k_p$, so ist $\beta(u_i, \phi_i) = 0$. Numerische Simulationen dieses modifizierten stochastischen Modells wurden wieder mit $N = 400$ Enzymen und $\chi = 10^4$ durchgeführt.

Die Simulationsergebnisse zeigen, daß Synchronisation auch in diesem modifizierten Modell möglich ist und dessen Eigenschaften denen ähneln, die bereits in den anderen beiden Modellen gefunden wurden. Jedoch existiert Synchronisation jetzt auch noch für viel höhere Rauschintensitäten der intramolekularen Dynamik. Abb. 5.14a zeigt die berechnete Abhängigkeit des Ordnungsparameters θ von der relativen Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeiten in diesem Fall. Man sieht, daß der Ordnungsparameter erst für Werte der relativen Schwankungsbreite größer als $\xi = 0.3$ verschwindet. Bemerkenswerterweise findet man für andere Parameter-

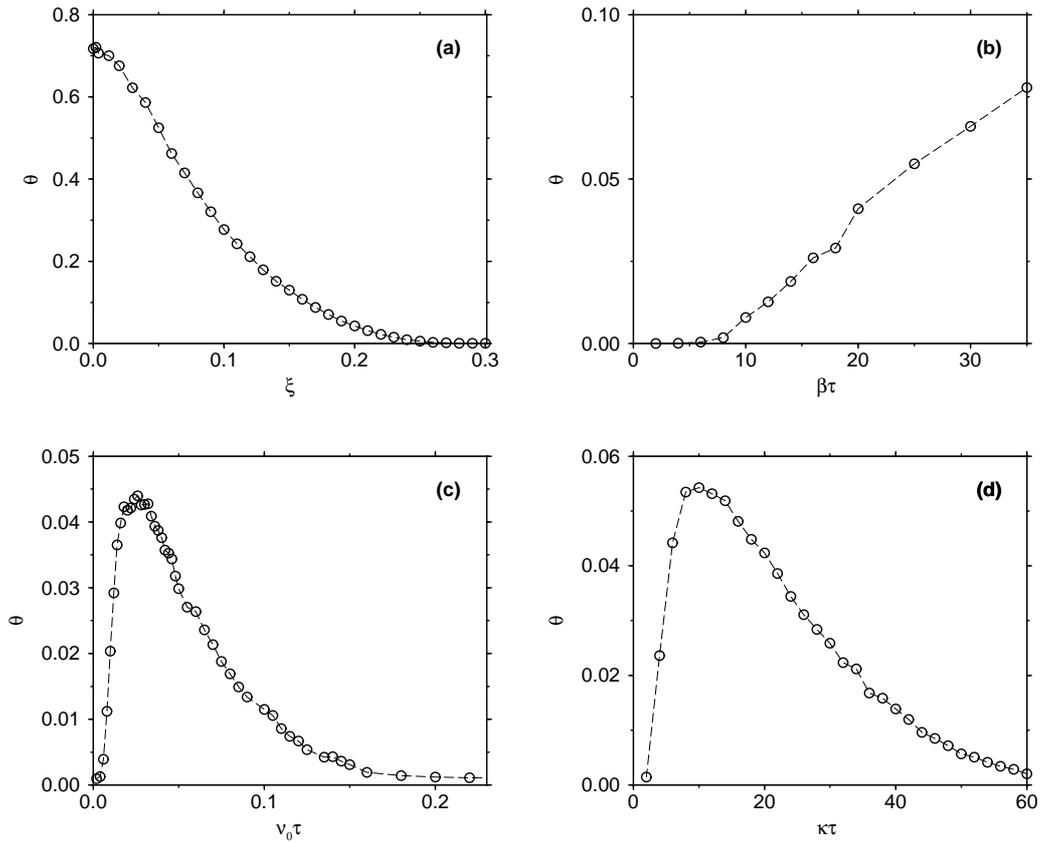


Abb. 5.14: Der Ordnungsparameter θ als Funktion der (a) relativen Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeit, (b) Bindungsrate β der regulatorischen Moleküle, (c) Bindungsrate v_0 der Substratmoleküle und (d) Dissoziationsrate κ der regulatorischen Moleküle in Modifikation 2. Die jeweils festgehaltenen Parameter sind $\sigma = 0.03125/\tau^2$ ($\xi = 0.2$), $\beta\tau = 20$, $v_0\tau = 100$, $\chi = 10^4$ und $\kappa\tau = 20$. Weitere Parameter sind $\gamma\tau = 25$, $\tau_1 = 0.55\tau$, $\nu\tau = 1$ und $N = 400$.

werte dieses modifizierten Modells Spiking in der Zahl der Reaktionsprodukte noch für $\pm 40\%$. Ein Beispiel, wie die Zeitserie der Zahl Produktmoleküle unter diesen Bedingungen aussieht, ist in Abb. 5.15 dargestellt.

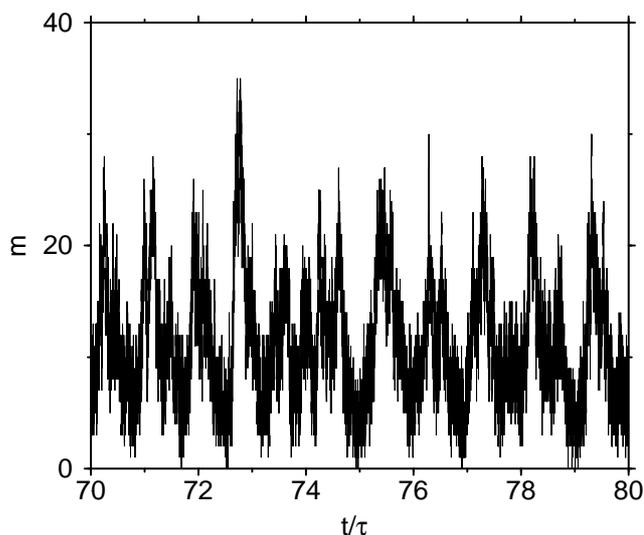


Abb. 5.15: Spiking in der Zahl der Produktmoleküle im Fall einer hohen Rauschintensität $\sigma = 0.08/\tau^2$ ($\xi = 0.4$) der intramolekularen Fluktuationen in Modifikation 2. Weitere Parameter sind $v_0\tau = 30$, $\chi = 10^4$, $\beta\tau = 30$, $\gamma\tau = 25$, $\kappa\tau = 20$, $\tau_1 = 0.55\tau$ und $N = 400$.

Trotz der vorhandenen Fluktuationen ist das Spiking deutlich erkennbar. Diese Modifikation des stochastischen Modells erhöht also drastisch die Robustheit des Synchronisationseffekts in Hinsicht auf Fluktuationen in der Turnover-Zeit. Abb. 5.14b, c und d zeigen den Ordnungsparameter θ als Funktion von β , v_0 und κ . Diese sind ähnlich zu den entsprechenden Funktionen in den anderen beiden Modellen. Es ist jedoch zu beachten, daß diese Abhängigkeiten jetzt für viel höhere Intensitäten ($\xi = 0.2$) der relativen Schwankungsbreite der Turnover-Zeit erhalten wurden.

5.5 Vergleich zwischen den Meanfield-Modellen für das produktinhibierte und produktaktivierte Reaktionssystem

In Kapitel 3, 4 und 5 wurde die Kinetik chemischer Reaktionen untersucht, die durch allosterische Enzyme in Mikroreaktoren katalysiert werden. Durch die Einbeziehung der dynamischen Prozesse wie z.B. Konformationsänderungen in die

Modellbildung entstanden kinetische Modelle, die, zur Beschreibung der Kinetik von Enzymreaktionen von Scheinbein und Gruler [41] in ähnlicher Form verwendet wurden. Dabei handelte es sich um die Erklärung der in Abschnitt 2.2 vorgestellten Experimente mit dem P-450 Enzymsystem. Beim zuerst untersuchten zeitdiskreten stochastischen Modell wurde die interne Dynamik durch stochastische Übergänge zwischen diskreten Zuständen beschrieben. Um das betrachtete Modell einer allosterischen Enzymreaktion mit Produktaktivierung einfach zu halten, war die Substratbindungsrate der Enzyme einfach eine Funktion der freien Produktmoleküle. Das nächste untersuchte Enzymmodell benutzte diese stark vereinfachte Sichtweise ebenfalls und beschrieb die Dynamik im Verlauf des Enzymzyklus durch eine stochastische Differentialgleichung für die Phasenkoordinate.

Im nächsten Schritt wurde in diesem Kapitel der Regulationsmechanismus genauer modelliert. Dieses Modell ist schematisch in Abb 5.1 dargestellt und wurde eingehend für den Fall der Produktinhibition sowohl als stochastisches Modell als auch in der Meanfield-Näherung studiert. Die wichtigste Erweiterung zu den vorher betrachteten einfachen Modellen der Produktaktivierung war die Einbeziehung der Bindung und Dissoziation der regulatorischen Produktmoleküle. Falls ein Produktmolekül an der regulatorischen Bindungsstelle des Enzyms gebunden hat, ändert sich die Substratbindungsrate zu v_1 , um nach der Dissoziation des Produktmoleküls wieder den Ausgangswert v_0 anzunehmen.

Im Fall von Inhibition gilt $v_1 \ll v_0$. Soll das Modell hingegen den Fall allosterischer Produktaktivierung beschreiben, gilt $v_1 \gg v_0$. Das in Abschnitt 5.1 entwickelte stochastische Modell einer allosterischen Enzymreaktion beschreibt bei Verwendung der entsprechenden Parameter also auch den Fall der Produktaktivierung. Das gilt ebenfalls für die in Abschnitt 5.3 hergeleitete Meanfield-Näherung und die Ergebnisse der linearen Stabilitätsanalyse. Es ist deshalb möglich, ohne großen Aufwand die Ergebnisse der linearen Stabilitätsanalyse zu benutzen, um das Verhalten des stark vereinfachten Modells der allosterischen Produktaktivierung aus Kapitel 3 mit dem detaillierten Modell dieses Kapitels für den Fall der Produktaktivierung zu vergleichen. Gleichzeitig sollen die Ergebnisse der linearen Stabilitätsanalyse des detaillierten Modells für den Fall der Produktinhibition mit einbezogen werden³.

Zuerst wird die Abhängigkeit der Bifurkationsgrenzen (im detaillierten Modell mit Produktaktivierung) vom Punkt k_p , an dem die Reaktionsprodukte freigesetzt werden, in Abb. 5.16 dargestellt. Diese Abbildung kann direkt mit dem Bifurkationsdiagramm 4.2 in Kapitel 4 für das stark vereinfachte Modell mit allosterischer Produktaktivierung verglichen werden.

Der Vergleich zeigt, daß in beiden Modellen Synchronisation in ein, zwei, drei

³Die Modifikationen des Bindungsmechanismus aus dem letzten Abschnitt bleiben unberücksichtigt.

oder noch mehr Enzymgruppen möglich ist. Der wichtigste Unterschied ist jedoch die zweite obere Bifurkationslinie in Abb. 5.16 des komplexeren Modells. Diese ist im einfachen Modell nicht vorhanden. Dort ist für beliebig hohe Werte von v_1 das System der linearen Stabilitätsanalyse zufolge instabil. Im Gegensatz dazu wird das komplexere Reaktionssystem beim vertikalen Kreuzen dieser oberen Bifurkationslinie von unten nach oben wieder stabil.

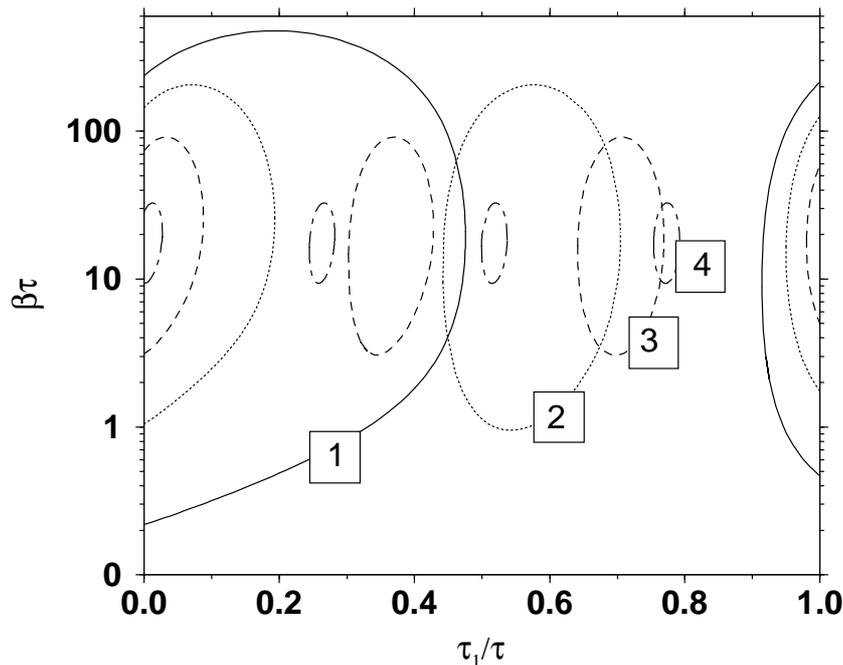


Abb. 5.16: Das Bifurkationsdiagramm für Produktaktivierung in der Parameterebene (β, τ_1). Der stabile Fixpunkt wird instabil und Oszillationen, hervorgerufen durch k Enzymgruppen, setzen ein, wenn eine der durch "k" bezeichneten Kurve in der vertikalen Richtung von unten nach oben gekreuzt wird. Die Reaktionsparameter sind $v_0\tau = 0.01$, $\chi = 10^4$, $\gamma\tau = 20$, $\kappa\tau = 20$ und $N = 200$. Nur die ersten vier Instabilitätsgrenzen, die zu $\omega = 1 \cdot 2\pi/\tau, \dots, 4 \cdot 2\pi/\tau$ gehören, sind eingezeichnet.

Ähnliche Ergebnisse ergibt der Vergleich der Abhängigkeit beider allosterischer Modelle mit Produktaktivierung bei Variation der Produktmolekülabbaurate γ . Während im einfachen Modell Abb. 4.6 nur eine Bifurkationslinie existiert, oberhalb der das System instabil wird und zu oszillieren beginnt, gibt es in Abb. 5.17 eine Zone, in der Oszillationen möglich sind. Oberhalb und unterhalb der diesen Bereich einschließenden Linien ist das Reaktionssystem stabil. In Abb. 5.17 wurde dieser Bereich einmal für $k_p = 0.2$ d.h. eine Enzymgruppe (durchgezogene Linie) und für $k_p = 0.55$ d.h. zwei Enzymgruppen (gepunktete Linie) bestimmt. Im Fall von zwei Enzymgruppen ist die Instabilitätsregion deutlich kleiner als für eine Enzymgruppe. Die Tendenz, daß Synchronisation in zwei

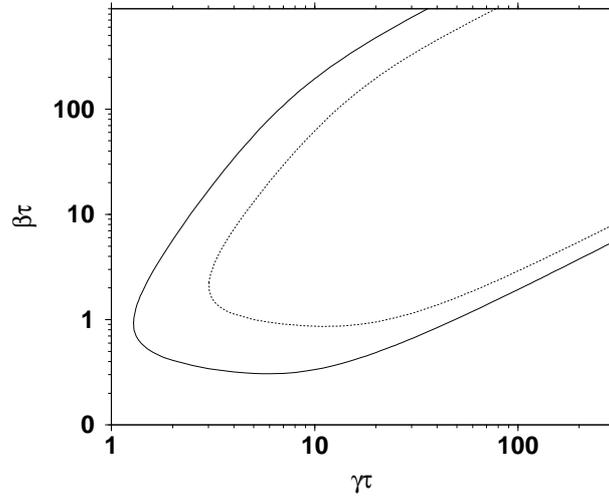


Abb. 5.17: Bifurkationsdiagramm für Produktaktivierung in der Parameterebene (β, γ) . Die durchgezogene Linie ist die Bifurkationsgrenze für eine Enzymgruppe ($k_p = 0.2$), die gepunktete für zwei Enzymgruppen ($k_p = 0.55$), die anderen Parameter sind $v_0\tau = 0.01$, $\chi = 10^4$, $\kappa\tau = 20$ und $N = 200$.

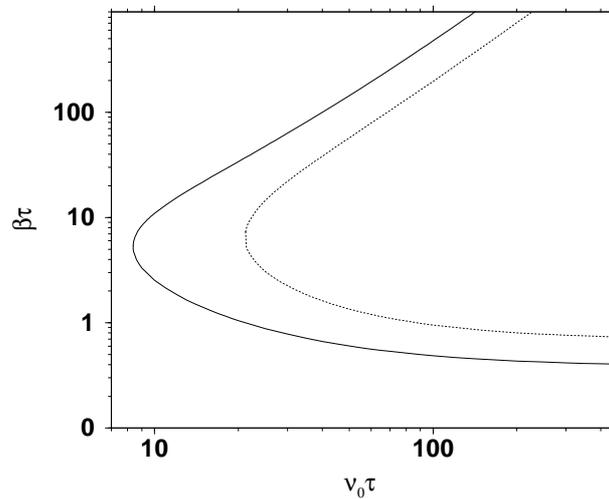


Abb. 5.18: Bifurkationsdiagramm für Produktaktivierung in der Parameterebene (β, v_0) . Die durchgezogene Linie ist die Bifurkationsgrenze für eine Enzymgruppe ($\tau_1 = 0.2\tau$), die gepunktete für zwei Enzymgruppen ($\tau = 0.55\tau$), die anderen Parameter sind $\gamma\tau = 20$, $\kappa\tau = 20$, $v_0\tau = 0.01$, $\chi = 10^4$ und $N = 200$.

oder noch größerer Zahl von Enzymgruppen nur in kleineren Parameterbereichen möglich ist, gilt also auch hier.

Zum Abschluß soll in Abb. 5.18 die Abhängigkeit der Bifurkationslinien von der Bindungsrate v_0 betrachtet werden. Deren Verlauf weist eine Ähnlichkeit mit dem Bifurkationsdiagramm in Abb. 5.11 für den Fall der Produktinhibierung auf. Vergleicht man jedoch ein typisches Beispiel für den Verlauf der Bifurkationslinien im Fall des einfachen Modells allosterischer Produktaktivierung in Abb. 4.5, so sind nur geringe Ähnlichkeiten erkennbar.

Kapitel 6

Reaktionsketten chemischer Reaktionen und synchronisierte Enzymzyklen

In allen bisherigen Untersuchungen wurde die katalytische Aktivität der Enzyme durch die Reaktionsprodukte beeinflusst. Es wurden Enzymreaktionen betrachtet, bei denen die allosterische Bindung eines Produktmoleküls entweder zu einer starken Erhöhung (siehe Kap. 3) oder Verringerung der Aktivität führte (Kap. 5). Wie in Kapitel 2.1 diskutiert wurde, gibt es in der Natur jedoch viele Enzyme, die keine allosterische Produktregulationsmechanismen besitzen. Es stellt sich nun die Frage, ob in kleinen Reaktionsvolumina, bei denen wieder die Bedingungen für die Existenz eines molekularen Netzwerkes gegeben ist, auch dann Synchronisationseffekte der enzymatischen Zyklen beobachtet werden können [191].

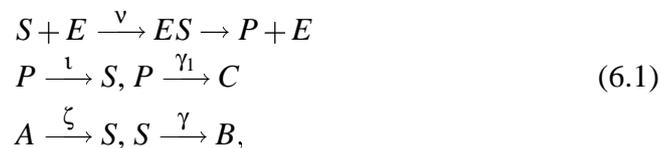
Die Untersuchungsergebnisse eines Modells gekoppelter chemischer Reaktionen, bei denen mindestens ein Reaktionsschritt enzymatisch katalysiert wird, beantworten diese Frage positiv. Im nächsten Abschnitt beschreibe ich zunächst ein stochastisches Modell, bestehend aus einer Folge chemischer Reaktionen, die in ein größeres Netzwerk von Reaktionsschritten eingebunden sind. Die Ergebnisse dieses Modells werden im Abschnitt 6.2 diskutiert. Um die wesentlichen Mechanismen, die zu den beobachteten Synchronisationseffekten führen, zu verstehen, wird das Modell vereinfacht.

Für dieses vereinfachte Modell analysieren wir im dritten Teil dieses Kapitels die Meanfield-Gleichungen und führen eine lineare Stabilitätsanalyse durch.

6.1 Stochastisches Modell

Metabolische Wege in lebenden Zellen bestehen aus einer großen Zahl von nacheinander ablaufenden chemischen Reaktionen, die durch Enzyme katalysiert werden. Ein einzelner Reaktionsschritt ist direkt mit der vorherigen und nachfolgenden Reaktion verbunden. Die Reaktionsprodukte der vorherigen Reaktion dienen als Ausgangsstoff, und die entstehenden Reaktionsprodukte werden von der nachfolgenden Reaktion als Substrate verwendet. Zusätzlich können zwischen verschiedenen Stoffwechselzyklen Verbindungen durch die Verwendung gemeinsamer Zwischenprodukte bestehen. Die Struktur solcher Reaktionsketten und Wechselwirkungen zwischen diesen weist eine enorme Vielfalt auf.

Es wird die folgende einfache Reaktionskette betrachtet



um die wesentlichen Aspekte einer Kette von chemischen Reaktionen zu erfassen. In Abb. 6.1 werden diese Prozesse noch einmal schematisch dargestellt.

Die Bindung eines Substratmoleküls S startet den molekularen Enzymzyklus, in dessen Verlauf ein Reaktionsprodukt entsteht. In einer zweiten Reaktion, die nicht notwendigerweise enzymatisch katalysiert sein muß, wird ein Teil der freien Produktmoleküle wieder in Substratmoleküle umgewandelt. Sowohl die Substrat- als auch Produktmoleküle werden zusätzlich von anderen Reaktionen benutzt, die neue Moleküle vom Typ B und C erzeugen. Die Ausgangsstoffe S werden dauernd durch chemische Umwandlung aus einem Reservoir A von anderen Molekülen erzeugt. Die Konzentrationen der verschiedenen Stoffe A , B und C werden konstant gehalten. Nach der Dissoziation der Reaktionsprodukte kehrt das Enzym wieder in den Grundzustand zurück. Es soll betont werden, daß die an dem Reaktionssystem vorhandenen Moleküle keinerlei regulatorischen Einfluß auf die Enzyme ausüben. Darüberhinaus zeigt der Reaktionsmechanismus (6.1) keine klassischen kinetischen Oszillationen.

Wie für die vorangegangenen Modelle wird wieder angenommen, daß die Reaktion in kleinen Raumbereichen ablaufen und die Bedingungen für die Existenz eines "molekularen Netzwerkes" erfüllt sind. Ähnlich wie in Abschnitt 3.3 wird die Dynamik eines einzelnen Enzyms während des katalytischen Prozesses als diffusive Bewegung entlang einer Reaktionskoordinate modelliert. Zusätzlich zu diesem Diffusionsprozeß beinhaltet der katalytische Zyklus auch stochastische Ereignisse wie die Bindung und Dissoziation der Substrat- und Produktmoleküle (siehe Abb. 6.1).

Für jedes Enzym i wird eine binäre Zustandsvariable u_i definiert, so daß $u_i = 0$ ist, falls sich das Enzym im Grundzustand, bereit zur Bindung eines Substratmoleküls, befindet. Die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes ES mit der Rate v wird dann als Übergang in den Zustand $u_i = 1$ beschrieben. Dieser Übergang initiiert den Turnover-Zyklus, in dessen Verlauf das Substratmolekül in ein Reaktionsprodukt umgewandelt wird. Nach der Freisetzung des Reaktionsproduktes kehrt das Enzym im Verlauf eines Relaxationsprozesses wieder in den Grundzustand zurück.

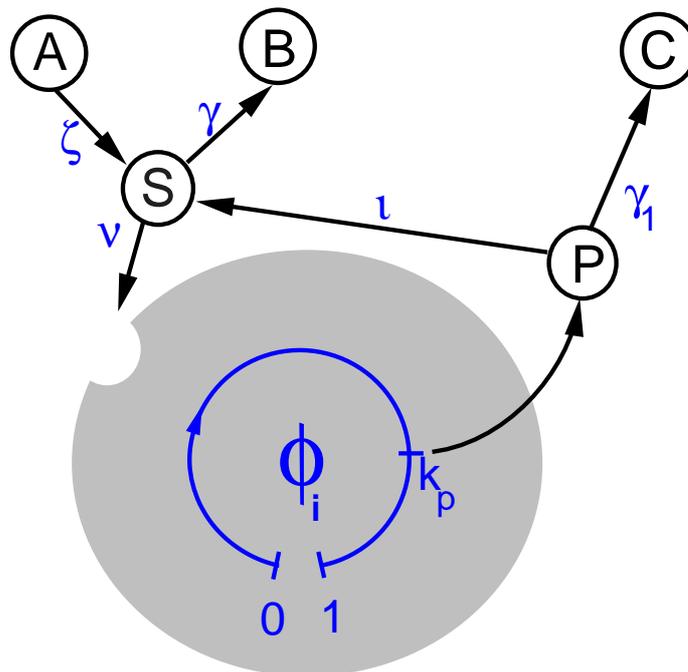


Abb. 6.1: Schematische Darstellung des molekularen Enzymzyklus, des Enzyms i entlang der Reaktionskoordinate ϕ_i . Der Enzymzyklus startet durch die Bindung eines Substratmoleküls mit der Rate v . Innerhalb des Enzymzyklus wird am Phasenpunkt $\phi = k_p$ ein Produktmolekül freigesetzt, das anschließend mit der Rate γ_1 in ein Molekül von Typ C umgewandelt oder mit der Rate τ zurück in ein Substratmolekül transformiert wird. Die Substratmoleküle werden dauernd durch Umwandlung von Molekülen A mit der Rate ζ zugeführt. Die Substratmoleküle werden zusätzlich mit der Rate γ in Moleküle vom Typ B umgewandelt.

Dieser Prozeß wird wie bereits in den Modellen der beiden vorherigen Kapitel als Diffusions-Drift-Prozeß entlang der Reaktionskoordinaten ϕ_i modelliert. Analog wie dort bezeichnet der Punkt $\phi_i = 0$ den Beginn des enzymatischen Zyklus und $\phi_i = 1$ das Ende, nach dessen Erreichen das Enzym wieder in den Grundzustand mit $u_i = 0$ zurückkehrt. Am Punkt $\phi_i = k_p$ wird das Reaktionsprodukt freigesetzt. Daher trennt dieser Punkt k_p zwei verschiedene Prozesse. Im Intervall

$0 < \phi_i < k_p$ besteht der Enzym-Substrat-Komplex, während zwischen $k_p < \phi_i < 1$ Relaxationsprozesse ablaufen, die das Enzym in den Grundzustand bringen. Hinsichtlich der mathematischen Beschreibung des Diffusionsprozesses gibt es keine Unterschiede zu dem Modell, das in Abschnitt 3.3 untersucht wurde. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung $p(\phi_i, t)$ der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Enzyms entlang der Reaktionskoordinaten erfüllt die Fokker-Planck-Gleichung

$$\frac{\partial p}{\partial t} = -v \frac{\partial p}{\partial \phi_i} + \sigma \frac{\partial^2 p}{\partial \phi_i^2}.$$

Die zugehörige stochastische Differentialgleichung

$$\frac{d\phi_i}{dt} = v + \eta_i(t)$$

mit der Driftgeschwindigkeit v und Gaußschem weißen Rauschen $\eta_i(t)$, für das die Korrelationsfunktion

$$\langle \eta_i(t) \eta_j(t') \rangle = 2\sigma \delta_{ij} \delta(t - t') \quad (6.2)$$

gilt, bestimmt diesen Prozeß für jedes einzelne Enzym.

Der Parameter σ bestimmt die Rauschintensität. Die Geschwindigkeit v hängt vom Potential des Energieprofils der freien Energie ab. Dieses Profil ist eine spezifische Eigenschaft des jeweiligen Enzymtyps und kann möglicherweise eine komplizierte Form besitzen.

Mit dieser Driftgeschwindigkeit können die beiden charakteristischen Zeiten $\tau_1 = k_p/v$ und $\tau = 1/v$ definiert werden. Deren Bedeutung ist dieselbe wie in den beiden letzten Kapiteln. $\tilde{\tau}_1$ ist die Zeit zwischen Beginn des Zyklus und Freisetzung des Reaktionsprodukts und $\tilde{\tau}$ ist die Dauer des gesamten Enzymzyklus. Die statistischen Eigenschaften wie z.B. der Mittelwert τ und die relative Schwankungsbreite ξ wurden in Abschnitt 3.3 hergeleitet. Für kleine Werte der Rauschintensität σ gelten (siehe Gl. (3.33), (3.3) und (3.35), S. 60) die Näherungen $\langle \tau \rangle \approx 1/v$, $\Delta\tau \approx \sqrt{2\sigma/v^3}$ und $\xi \approx \sqrt{2\sigma/v}$.

Der erste Schritt der enzymatischen Reaktion (6.1) ist die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes ES mit der Ratenkonstante v . Wenn das Enzym den Phasen-zustand k_p erreicht, wird ein Produktmolekül freigesetzt, wodurch sich die Zahl der freien Reaktionsprodukte um 1 erhöht. Nachfolgende Relaxationsprozesse führen das Enzym i wieder in den Grundzustand, charakterisiert durch $u_i = 0$, zurück.

Die Zahl der freien Reaktionsprodukte verringert sich mit der Ratenkonstante τ durch deren Umwandlung in Ausgangsstoffe. Zusätzlich werden die Produktmoleküle mit der Rate γ_1 in Moleküle vom Typ C umgewandelt, die nicht weiter an der Reaktion beteiligt sind (siehe Abb. 6.1). Es wird angenommen, daß

$\tau \leq \gamma_1 \ll \tau^{-1}$, so daß die Lebensdauer der freien Reaktionsprodukte kurz im Vergleich zur Turnover-Zeit ist.

Neben der Abnahme der Zahl der Substratmoleküle mit der Rate ν durch die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes gibt es einen zweiten Prozeß, der mit der Rate γ Substratmoleküle in Moleküle vom Typ B umwandelt, die nicht weiter an der Reaktion teilnehmen. Die Zahl der Substrate wird durch die Umwandlung mit der Rate ζ von Molekülen A aus einem Reservoir erhöht.

Zusammenfassend wird nun für die oben bereits verbal beschriebenen Prozesse der numerische Algorithmus des stochastischen Modells des Reaktionsmechanismus (6.1) angegeben. Die Zeit wird in kleine gleich große Zeitintervalle Δt unterteilt. Die stochastische Differentialgleichung (3.11) wird durch

$$\phi_i(t + \Delta t) = \phi_i(t) + \nu \Delta t + \sigma \zeta_i \sqrt{\Delta t} \quad (6.3)$$

dargestellt. Dabei sind ζ_i unabhängige Gaussche Zufallszahlen, so daß

$$\langle \zeta_i \zeta_j \rangle = 2\delta_{ij}.$$

Falls nach dem Beginn des Enzymzyklus der rechte Teil von Gl. (6.27) kleiner als 0 wird, wird dieser durch $\nu \Delta t$ ersetzt. Das heißt, das Enzym kann im Grundzustand nur durch den rechten und nicht durch den linken Rand der Reaktionskoordinate zurückkehren.

Wenn $\phi_i > k_p$ gilt, darf der Phasenzustand ϕ_i nicht mehr kleiner als k_p werden. Ein mehrfaches Überqueren des Phasenpunktes k_p würde jedesmal zur Freisetzung eines Produktmoleküls führen. Falls durch Zufall die rechte Seite von Gl. (6.3) kleiner als k_p ist, wird diese deshalb durch $k_p + \nu \Delta t$ ersetzt. Diese Bedingung ist notwendig, um nacheinanderfolgende Freisetzungen von Reaktionsprodukten, verursacht durch statistische Fluktuationen, zu verhindern. Der Algorithmus für die Dynamik der binären Zustandsvariablen u_i , die angibt, ob ein ES -Komplex vorliegt oder nicht, ist

$$u_i(t + \Delta t) = \begin{cases} 1, & \text{falls } u_i(t) = 0, \text{ mit WS } \nu s \Delta t \\ 0, & \text{falls } u_i(t) = 0, \text{ mit WS } 1 - \nu s \Delta t \\ 0, & \text{falls } u_i(t) = 1, \text{ und } \phi_i(t) \leq 1 \\ 1, & \text{falls } u_i(t) = 1, \text{ und } \phi_i(t) < 1. \end{cases} \quad (6.4)$$

Die Zahl m der Produktmoleküle im Reaktionssystem ergibt sich durch folgenden Algorithmus

$$m(t + \Delta t) = m(t) + \sum_{i=1}^N \Theta(\phi_i(t) - k_p) \Theta(k_p - \phi_i(t - \Delta t)) - \sum_{j=1}^m \Psi_j - \sum_{k=1}^m \Upsilon_k, \quad (6.5)$$

wobei Ψ_j und Υ_k binäre Zufallszahlen sind, die die Werte 1 und 0 mit den Wahrscheinlichkeiten $\gamma_1 \Delta t$, $1 - \gamma_1 \Delta t$ und $\tau \Delta t$, $1 - \tau \Delta t$ annehmen können. Die Stufenfunktion $\Theta(x)$ ist definiert durch $\Theta(x) = 1$, falls $x \geq 0$ und $\Theta(x) = 0$, falls $x < 0$

ist. Der zweite Term auf der rechten Seite von Gl. (6.5) beschreibt die Freisetzung eines neuen Reaktionsproduktes, wenn das Enzym durch den Punkt k_p geht. Der dritte Term gibt den stochastischen Abbau der freien Reaktionsprodukte mit der kleinen Wahrscheinlichkeit $\gamma\Delta t$ innerhalb des Zeitintervalls Δt an. Der letzte Term der Gleichung beschreibt die Abnahme der freien Reaktionsprodukte durch die Umwandlung dieser in die Ausgangsstoffe mit der Wahrscheinlichkeit $\iota\Delta t$.

Die Zahl der Substratmoleküle im Modell der Reaktion (6.1) ist durch

$$s(t + \Delta t) = s(t) - \sum_{i=1}^N (1 - u_i(t)) u_i(t + \Delta t) - \sum_{j=1}^s \Psi_j + \sum_{k=1}^m \Upsilon_k + Z \quad (6.6)$$

gegeben. Dabei sind Ψ_j und Υ_k binäre Zufallszahlen, die die Werte 1 und 0 mit der Wahrscheinlichkeit $\gamma\Delta t$, $\iota\Delta t$, $\zeta\Delta t$ und $1 - \gamma\Delta t$, $1 - \iota\Delta t$, $1 - \zeta\Delta t$ annehmen. Der zweite Term beschreibt die Abnahme der freien Substratmoleküle durch die Bindung an ein Enzym. Der dritte und vierte Term erfaßt den Abbau der Reaktionsprodukte mit der Rate γ und die Zunahme der Substratmoleküle durch die umgewandelten Produktmoleküle. Der letzte Term bestimmt die permanente Zufuhr von Substrat mit der Rate ζ . Die Variable Z kann dabei Null oder eine positive ganze Zahl sein und unterliegt der Poissonverteilung mit dem Mittelwert $\zeta\Delta t$.

6.2 Synchronisation der Enzymzyklen

Im Folgenden werden die Resultate der numerischen Untersuchungen des im letzten Abschnitt vorgestellten Modells präsentiert. Die Gesamtzahl der Enzyme ist $N = 1000$. Es wird angenommen, daß die Driftgeschwindigkeit in Gl. (3.11) $v\tau = 1$ ist. Als Anfangsbedingung sind die Enzyme hinsichtlich ihrer Zustände zufällig entlang des Phasenzklus verteilt. Simulationen des stochastischen Modells zeigen in Abhängigkeit von den Parametern v , γ_1 , γ , ξ , k_p , ι und ζ die Existenz von zwei qualitativ verschiedenen Verhaltensweisen. Hält man alle Parameter außer die Bindungsrate v der Substratmoleküle und die relative statistische Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeit fest, so findet man für kleine Werte des Parameters v und große Werte der relativen Schwankungsbreite ξ keine Synchronisationseffekte im Reaktionssystem (asynchroner Reaktionsmodus). Die Substrat- und Produktmoleküle sowie die Zahl der Enzyme im Grundzustand sind vielmehr zeitlich unkorreliert und fluktuieren um einen bestimmten Mittelwert. Dieses Verhalten ist in Abb. 6.2a für die Zahl s der Substratmoleküle (schwarz) und die Zahl n der Enzyme im Grundzustand (grau) dargestellt.

Falls die relative Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeit ausreichend klein und die Bindungsrate der Substratmoleküle groß genug ist, zeigt das System schnelle Oszillationen in der Zahl der Substratmoleküle und der Zahl der Enzyme im Grundzustand. Dieses Verhalten ist in Abb. 6.2b gezeigt. Es ist deutlich zu

erkennen, daß zwischen beiden Größen eine Phasenverschiebung existiert. Immer dann, wenn die Zahl der Substratmoleküle ihr Minimum erreicht, ist die Zahl der Enzyme im Grundzustand am größten. Für andere Parameter als in Abb. 6.2b kann die Spikingfrequenz höhere Werte als $\omega \approx 2\pi/\tau$ besitzen. In Abhängigkeit von Parameter k_p findet man Spiking mit doppelter (Abb. 6.2c bei $k_p = 0.55$) oder dreimal so hoher Frequenz (Abb. 6.2d bei $k_p = 0.36$) wie in Abb. 6.2b.

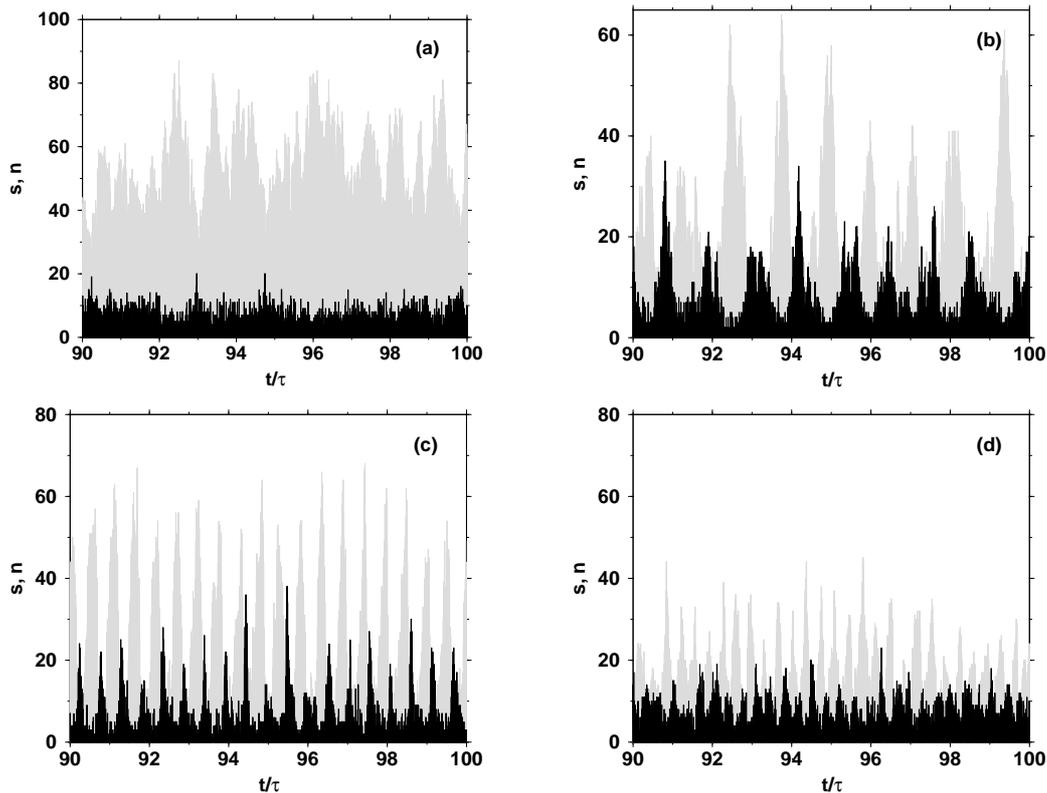


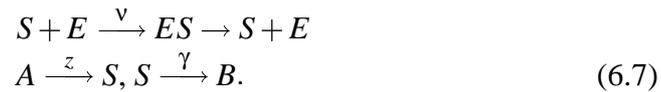
Abb. 6.2: Zeitabhängigkeit der Zahl der Substratmoleküle (schwarz) und Enzyme im Grundzustand (grau) in Abwesenheit von Spiking (a) für $\nu\tau = 3$, $k_p = 0.2$ und $\sigma = 0.08/\tau^2$ ($\xi = 0.4$), (b) Spiking mit $\omega \approx 2\pi/\tau$ für $\nu\tau = 10$, $k_p = 0.2$ und $\sigma = 0.01125/\tau^2$ ($\xi = 0.15$), (c) Spiking mit $\omega \approx 4\pi/\tau$ für $\nu\tau = 10$, $k_p = 0.55$ und $\sigma = 0.0002/\tau^2$ ($\xi = 0.02$) sowie (d) Spiking mit $\omega \approx 6\pi/\tau$ für $\nu\tau = 10$, $k_p = 0.72$ und $\sigma = 0.00005/\tau^2$ ($\xi = 0.01$). Die anderen Parameter sind $N = 1000$, $\iota\tau = 200$, $\zeta\tau = 200$, $\gamma\tau = 25$, $\gamma_1\tau = 5$.

Es soll an dieser Stelle noch einmal betont werden, daß alle Ratenkonstanten der betrachteten Prozesse insbesondere auch die enzymatische Aktivität¹ unabhängig von den Konzentrationen der beteiligten Moleküle sind. Es existieren keine aktivierenden oder inhibierenden Prozesse der enzymatischen Aktivität, die für diese Oszillationen verantwortlich sind. Das oszillatorische Verhalten wird

¹Diese ist im wesentlichen durch die Substratbindungsrate ν und die Turnover-Zeit festgelegt.

ausschließlich durch die parallel ablaufenden unterschiedlichen Reaktionen verursacht. Der Effekt des Spiking ist direkt auf die Existenz eines langsamen enzymatischen Reaktionsschritts in die Vorwärtsrichtung und einer schnellen Rückreaktion zurückzuführen.

Um diesen Punkt besser zu verdeutlichen, kann man das Modell ohne Verlust des qualitativen Verhaltens weiter vereinfachen. Als erstes wird der Abbauprozess der freien Reaktionsprodukte, der mit Ratenkonstante γ_1 abläuft, vernachlässigt. Zweitens wird angenommen, daß die Ratenkonstante τ der Rückreaktion viel höher als das Inverse τ^{-1} der Turnover-Zeit ist. Die Freisetzung eines Produktmoleküls durch das Enzym i führt unter diesen Bedingungen sofort zur Erhöhung der Zahl der Substratmoleküle um 1. In diesem Fall ist die Zahl der freien Produktmoleküle sehr klein und geht gegen 0 für $\tau \rightarrow \infty$. Es ist unter diesen Bedingungen deshalb ausreichend, nur die Zahl der Substratmoleküle zu betrachten und die Produktmoleküle nicht explizit in die Systembeschreibung einzubeziehen. Mit diesen Annahmen ändern sich die Reaktionsgleichungen (6.1) zu



Die Substratmoleküle werden enzymatisch wieder direkt in Substratmoleküle umgewandelt. Substrat wird mit der Ratenkonstante ζ permanent dem Reaktionssystem zugeführt. Die Substratmoleküle werden parallel durch eine weitere Reaktion mit der Ratenkonstante γ in die nicht weiter an der Reaktion teilnehmenden Moleküle vom Typ B umgewandelt.

Der numerische Algorithmus, gegeben in den Gl. (6.3) und (6.6), bleibt bis auf Gl. (6.6) unverändert. Die Gl. (6.5), die die Dynamik der freien Reaktionsprodukte angibt, wird nicht weiter benötigt. Die Gl. (6.6), die die zeitliche Änderung der Substrate beschreibt, wird nun durch

$$\begin{aligned} s(t + \Delta t) = s(t) + \sum_{i=1}^N \Theta(\phi_i(t) - k_p) \Theta(k_p - \phi_i(t - \Delta t)) - \sum_{j=1}^s \Psi_j \\ - \sum_{i=1}^N (1 - u_i(t)) u_i(t + \Delta t) + Z \end{aligned} \quad (6.8)$$

ersetzt. Dabei haben Θ und Ψ_j dieselbe Bedeutung wie in Gl. (6.5) und (6.6). Der zweite Term beschreibt ähnlich wie in Gl. (6.5) für die Reaktionsprodukte die Freisetzung der Substratmoleküle durch ein Enzym, wenn dieses durch den Phasenpunkt k_p geht. Der dritte Term bestimmt die Abnahme der Substratmoleküle durch den Umwandlungsprozeß in Moleküle vom Typ B mit der Rate γ . Der vierte Term beschreibt die Abnahme durch Bindung an Enzyme im Grundzustand. Der letzte Term definiert die permanente Substratzufuhr mit der Ratenkonstante

ζ . Dabei ist Z eine positive ganze Zahl oder Null, die der Poissonverteilung mit dem Mittelwert $\zeta\Delta t$ unterliegt. Zusammen mit den Gl. (6.3) und (6.4) beschreibt die Gl. (6.8) das Reaktionsschema (6.7).

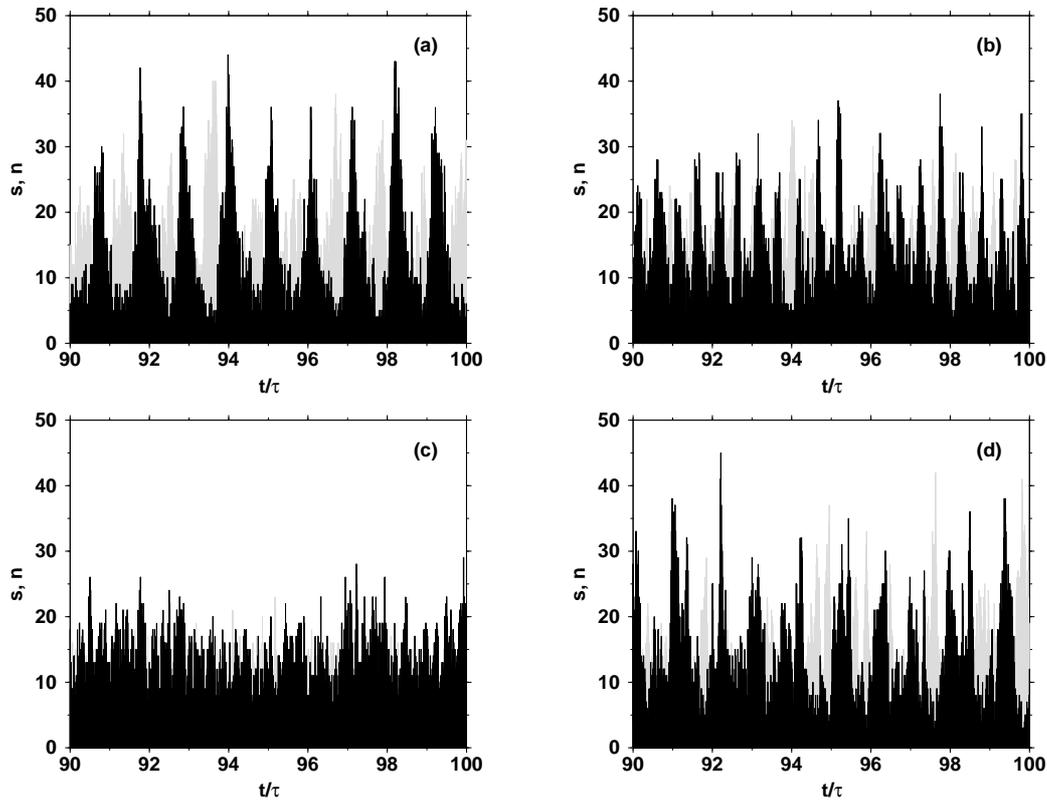


Abb. 6.3: Zeitabhängigkeit der Zahl der Substratmoleküle (schwarz) und Enzyme im Grundzustand (grau) im reduzierten Modell, beschrieben durch Reaktionsgleichung (6.7), (a) für Spiking mit der Frequenz $\omega \approx 2\pi/\tau$ für $k_p = 0.2$ und $\sigma = 0.0002/\tau^2$ ($\xi = 0.02$), (b) Spiking mit $\omega \approx 4\pi/\tau$, für $k_p = 0.55$ und $\sigma = 0.0002/\tau^2$ ($\xi = 0.02$), (c) kein Spiking für $k_p = 0.55$ und $\sigma = 0.00125/\tau^2$ ($\xi = 0.05$) und (d) Spiking mit $\omega \approx 2\pi/\tau$, für $k_p = 0.55$ und $\sigma = 0.018/\tau^2$ ($\xi = 0.019$). Die anderen Parameter sind $N = 1000$, $\zeta\tau = 200$, $\gamma\tau = 15$ und $\nu\tau = 10$.

Ergebnisse der numerischen Simulationen dieses vereinfachten Modells sind in Abb. 6.3 dargestellt. Es zeigt sich, daß sowohl Spiking als auch Zufallsfluktuationen in der Zahl der Substratmoleküle und Enzyme im Grundzustand um einen bestimmten Mittelwert möglich sind. In ihren Eigenschaften ähnelt das Systemverhalten stark dem in Abb. 6.2 gezeigten für das erweiterte System. In den vier Beispielen der Abb. 6.3 sind die Bindungsrate, Abbaurate und Substratzufuhr durch $\nu = 10/\tau$, $\gamma = 15/\tau$ und $z = 200/\tau$ festgelegt. Die Gesamtzahl der Enzyme ist wieder in allen Simulationen $N = 1000$.

In Abb. 6.3a ist die zeitabhängige Zahl der Substratmoleküle (schwarz) und Enzyme im Grundzustand (grau) im Fall von Spiking dargestellt. Für die gewählten Parameter $k_p = 0.2$ und $\xi = 0.02$ ist die Periode des Spiking mit der Turnover-Zeit vergleichbar. Dieser Fall ist also ähnlich zu dem Verhalten des erweiterten Reaktionssystems, das in Abb. 6.3b gezeigt wurde. Genauso wie im erweiterten System kann durch Variation des Parameters k_p , der den Punkt der Freisetzung des Substratmoleküls innerhalb des Enzymzyklus festlegt, Spiking mit kürzeren Perioden gefunden werden. Wie aus Abb. 6.3b erkennbar ist, liegt die Spiking Periode für $k_p = 0.55$ und $\xi = 0.02$ ungefähr bei 0.5τ der Turnover-Zeit. Detaillierte Untersuchungen dieses reduzierten Modells ergaben, daß ebenfalls höhere Spiking Frequenzen möglich sind. Der Übergang des Systemverhaltens zum Spiking wird in diesen Fällen jedoch nur für extrem kleine Werte der relativen Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeit erreicht. In den weiteren Untersuchungen konzentriere ich mich jedoch hauptsächlich auf Spiking mit Perioden, die nahe bei τ und 0.5τ liegen und robuster gegen Fluktuationen in der Turnover-Zeit sind.

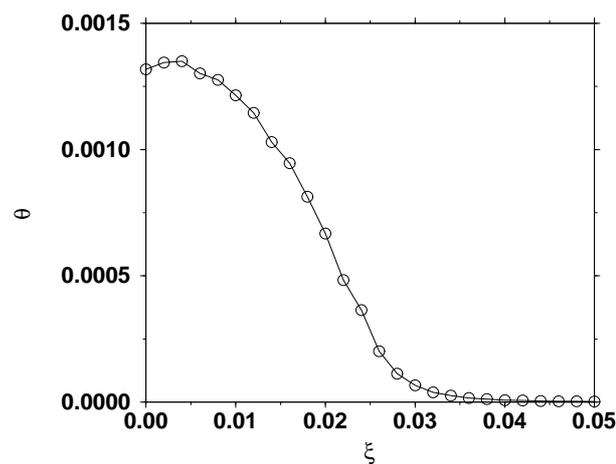


Abb. 6.4: Abhängigkeit des Ordnungsparameters θ von der relativen statistischen Schwankungsbreite ξ für $N = 1000$, $\nu\tau = 10$, $\gamma\tau = 15$, $\zeta\tau = 200$ und $k_p = 0.55$ (Parameter wie in Abb. 6.3b-d).

Wenn man den Parameter $k_p = 0.55$ wählt und die relative statistische Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeit erhöht, wird das synchrone Spiking mit der Periode 0.5τ schwächer und verrauschter und verschwindet für ausreichend große Werte von ξ . Diese Situation ist in Abb. 6.3c für $\xi = 0.05$ dargestellt. Überraschenderweise führt eine weitere Erhöhung von ξ erneut zu Spiking, jedoch mit der doppelt so großen Periode τ , die mit der Turnover-Zeit vergleichbar ist. Spiking mit dieser Frequenz wurde bisher nur für Werte des Parameters $k_p \approx 0.3$ gefunden. Ein Beispiel für diese Art von Synchronisation ist in Abb. 6.3d gezeigt. Die Auswertung von Abb. 6.3 ergibt somit, daß für $k_p = 0.55$ das Reaktionssystem

drei verschiedene dynamische Verhaltensweisen zeigt. Für kleine Fluktuationen in der Turnover-Zeit findet man Spiking mit der Periode 0.5τ . Innerhalb eines Zwischenbereichs des Parameters ξ ist Spiking nahezu nicht nachweisbar, um für höhere Werte von ξ mit der Periode τ wieder zu entstehen.

Bei der Untersuchung des Verhaltens der stochastischen Modelle in Kapitel 3 und 5 wurde der Ordnungsparameter θ zur Charakterisierung der Phasensynchronisation eingeführt (siehe Gl. (3.38), S. 62). Es wird nun zuerst θ als Funktion der relativen Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeit für $k_p = 0.55$ untersucht, d.h., falls die Enzyme zwei Gruppen entlang der Phasenkoordinate bilden. Wie bereits im Fall der Modelle mit allosterischer Produktaktivierung und -inhibierung ist θ für kleine Werte von ξ maximal und verringert sich sukzessive mit wachsendem ξ (Abb. 6.4). Es ist interessant, daß bereits für $\xi \approx 0.04$ praktisch keine Synchronisation der Enzymzustände vorhanden ist. Das ist deshalb überraschend, weil unter sonst gleichen Bedingungen in Abb. 6.3d noch deutlich periodisches Spiking in der Zahl der Substratmoleküle erkennbar ist.

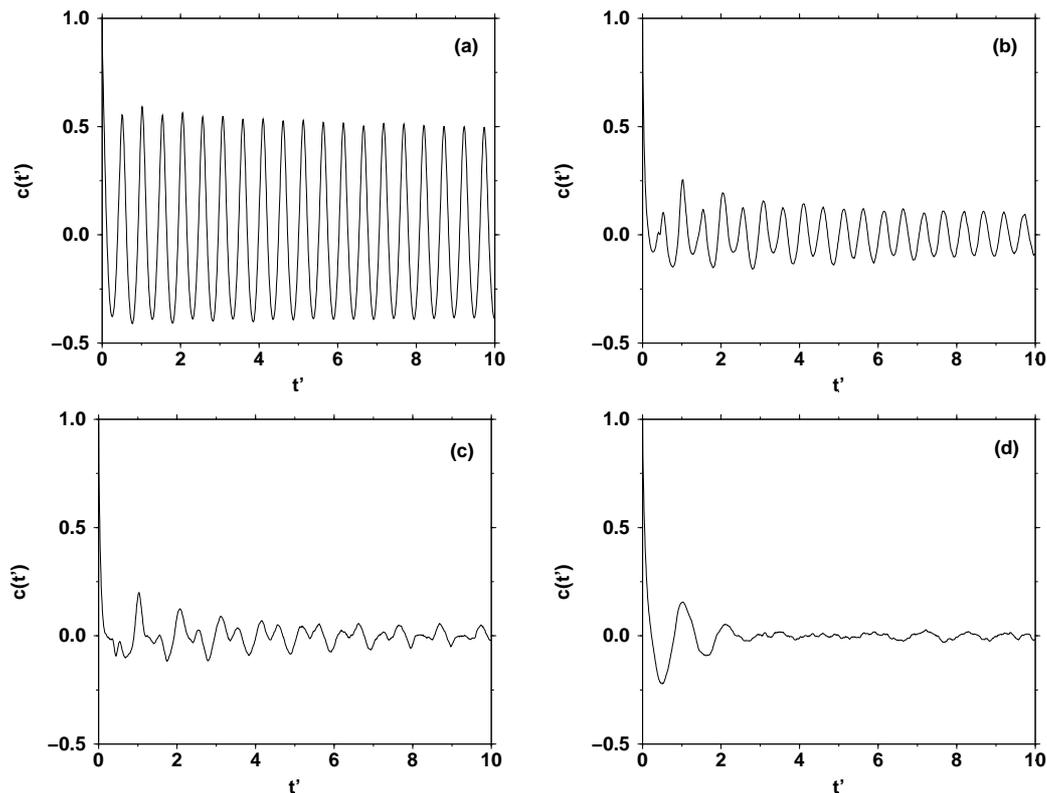


Abb. 6.5: Autokorrelationsfunktion für (a) $\sigma = 0.0002/\tau^2$ ($\xi = 0.02$), (b) $\sigma = 0.0006125/\tau^2$ ($\xi = 0.035$), (c) $\sigma = 0.00125/\tau^2$ ($\xi = 0.05$) und (d) $\sigma = 0.018/\tau^2$ ($\xi = 0.19$) für $k_p = 0.55$, sonstige Parameter wie in Abb. 6.3.

Der Effekt der Frequenzänderung bei Erhöhung der relativen Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeit läßt sich sehr gut anhand der Autokorrelationsfunktion

$$c(t') = \frac{\langle y(t)y(t+t') \rangle}{\langle y^2(t) \rangle}, y = s(t) - \langle s(t) \rangle \quad (6.9)$$

für Zeitserien der Substratmoleküle zeigen. In Abb. 6.5 sind die Autokorrelationsfunktionen der Zeitserien $s(t)$ für vier verschiedene Werte von ξ gezeigt. Im Fall von Spiking ($\xi = 0.02$) ist die Autokorrelationsfunktion in Abb. 6.5a dargestellt. Diese zeigt gedämpfte periodische Oszillationen mit der Periode $\tau/2$. Für $\xi = 0.035$ ergibt sich bereits eine deutliche Verringerung der Amplitude dieser Oszillationen bei gleichzeitig gesteigerter Dämpfungsrate. Eine weitere Erhöhung von ξ führt zu einer Autokorrelationsfunktion mit mehreren Frequenzanteilen. Dieser Fall ist in Abb. 6.5c für $\xi = 0.05$ abgebildet. Für noch höhere Werte von ξ wie in Abb. 6.5d für $\xi = 0.19$, führt die Korrelationsfunktion gedämpfte Oszillationen mit der Periode τ aus.

Obwohl Simulationen des stochastischen Modells, gegeben durch Gl. (6.3), (6.4) und (6.8), bereits viele Informationen über das Verhalten des betrachteten Systems liefern, sind weitere analytische Untersuchungen angebracht, um die Parameterbereiche zu bestimmen, innerhalb derer Oszillationen gefunden werden können. Außerdem liefern tiefergehende Untersuchungen ein besseres Verständnis der gefundenen Synchronisationseffekte und deren Abhängigkeit von der relativen Schwankungsbreite der Turnover-Zeit.

6.3 Die Untersuchung der Gleichungen der Meanfield-Näherung

Wie bereits in Kapitel 3 und 5 werden nun für das Modell enzymatischer Reaktionsketten unter den im letzten Abschnitt getroffenen Vereinfachungen die Mastergleichungen untersucht. Wie bereits in den vorhergehenden Kapiteln ausführlich diskutiert wurde, kann der Enzymzyklus in zwei Bereiche unterteilt werden. Einmal in den Bereich, der nach der ES -Bildung beginnt und durch einen Diffusions-Driftprozeß entlang der Reaktionskoordinate ϕ beschrieben wird, und zum anderen im Aufenthalt des Enzyms im Grundzustand, der durch die Bindung eines Substratmoleküls mit der Rate v beendet wird. Durch die Bindung des Substratmoleküls verringert sich die Zahl der freien Substratmoleküle um 1.

Die Substratmoleküle werden aus Molekülen vom Typ A (siehe Abb. 6.1, S. 126), deren Zahl als konstant angenommen wird und im Vergleich zur Zahl N der Enzyme sehr groß ist, mit der Rate ζ permanent erzeugt. Gleichzeitig erfolgt ein Abbau der Substratmoleküle mit der Rate γ in Moleküle vom Typ B . Die Moleküle A und B nehmen nicht weiter an der Reaktion teil. Entsprechend

gilt für die Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung $P(\phi, s, t)$ der Enzyme entlang der Reaktionskoordinate die folgende Mastergleichung

$$\frac{\partial P(\phi, s)}{\partial t} = -v \frac{\partial P(\phi, s)}{\partial \phi} + \sigma \frac{\partial^2 P(\phi, s)}{\partial \phi^2} + \gamma[(s+1)P(\phi, s+1) - sP(\phi, s)] + \zeta[P(\phi, s-1) - P(\phi, s)]. \quad (6.10)$$

Zur Vereinfachung der Schreibweise wurde der Fluß der Wahrscheinlichkeitsdichte durch einen beliebigen Phasenpunkt ϕ wie bereits in den vorherigen Kapiteln mit

$$F(\phi, s) = vP(\phi, s) - \sigma \frac{\partial P(\phi, s)}{\partial \phi}$$

abgekürzt.

Am Phasenpunkt k_p wird ein Produktmolekül freigesetzt, das sofort in ein Substratmolekül umgewandelt wird. Da angenommen wird, daß die Umwandlungsrate τ der Produkte in Substrate sehr hoch ist im Vergleich zu allen anderen Reaktionsraten in diesem Reaktionsschema, wird das System so behandelt, als wenn am Phasenpunkt k_p direkt ein Substratmolekül freigesetzt wird, wodurch sich die Zahl der freien Substratmoleküle um 1 erhöht. Eine Umkehrung dieses Prozesses ist nicht möglich. Sobald $\phi \geq k_p$ erreicht wird, kann die Phase während dieses enzymatischen Zyklus nicht mehr kleiner als k_p werden. Der Punkt $k_p - \epsilon$ stellt daher einen absorbierenden Rand für Gl. (6.10) im Intervall $(0, k_p - \epsilon]$ und einen reflektierenden Rand innerhalb des Intervalls $(k_p, 1]$ dar. Zusammenfassend kann man feststellen: die linken Ränder in beiden Intervallen $(0, k_p - \epsilon]$ und $(k_p, 1]$ sind reflektierend, die rechten Ränder hingegen absorbierend. Damit ergeben sich folgende Randbedingungen

$$F(k_p, s+1) = F(k_p - \epsilon, s) \quad (6.11)$$

$$P(k_p - \epsilon, s) = 0 \quad (6.12)$$

$$P(1, s) = 0. \quad (6.13)$$

Zusätzlich wird zur vollständigen Beschreibung des Gesamtsystems noch die Gleichung für die zeitliche Änderung der Wahrscheinlichkeit $Q(s, t)$ benötigt. Diese gibt die Wahrscheinlichkeit an, das Enzym im Grundzustand, bei gleichzeitiger Anwesenheit von s freien Substratmolekülen vorzufinden. Die Wahrscheinlichkeit $Q(s)$ definiert demnach den ersten Teil des enzymatischen Prozesses (die Wartezeit im Grundzustand), während $P(\phi, s)$ den zweiten Teil, den eigentlichen enzymatischen Zyklus, beschreibt. Die Wahrscheinlichkeit $Q(s)$ erhöht sich durch den Wahrscheinlichkeitsfluß $F(1, s)$, der die Rückkehr des Enzyms zum Zeitpunkt

t in den Grundzustand beschreibt und verringert sich mit der Rate v durch die Bindung eines Substratmoleküls. Die Mastergleichung für $Q(s, t)$ lautet demnach

$$\begin{aligned} \frac{\partial Q(s)}{\partial t} = & F(\phi, 1) - vQ(s) + \gamma[(s+1)Q(s+1) - sQ(s)] \\ & + \zeta[Q(s-1) - Q(s)]. \end{aligned} \quad (6.14)$$

Vergleicht man diese Mastergleichungen (6.10) und (6.14) mit den Mastergleichungen (4.1) und (4.7) für das einfache Reaktionssystem mit allosterischer Produktaktivierung in Kapitel 4, so fällt die große Ähnlichkeit dieser Gleichungen auf. In den Mastergleichungen (6.10) und (6.14) ist nur der Term $\zeta[P(\phi, s-1) - P(\phi, s)]$ hinzugekommen, der die permanente Zufuhr der Substratmoleküle beschreibt. Die freien Produktmoleküle m in den Gl. (4.1) und (4.7) wurden durch freie Substratmoleküle ersetzt. Allerdings ist die Bindungsrate v in den Gl. (6.10) und (6.14) nun unabhängig von der Zahl der Substratmoleküle, da die Enzyme keinerlei regulatorische Eigenschaften besitzen.

Befindet sich die Phasenvariable ϕ eines Enzyms innerhalb des Intervalls $[0, k_p - \epsilon]$, so hat dieses Enzym durch Bindung eines Substratmoleküls einen Enzym-Substrat-Komplex ES gebildet. Dieses Ereignis erfolgt mit der Wahrscheinlichkeitsrate $v(s)Q(s)$. Da angenommen wird, daß die Bildung eines ES -Komplexes nicht rückgängig gemacht werden kann, darf die Phasenvariable ϕ nicht kleiner als 0 werden. Der Punkt $\phi = 0$ bildet deshalb einen reflektierenden Rand. Daraus ergibt sich folgende Randbedingung für die Mastergleichungen (6.10) und (6.14)

$$\left[vP(\phi, s) - \sigma \frac{\partial P(\phi, s)}{\partial \phi} \right]_{\phi=0} = v(s)Q(s). \quad (6.15)$$

Wegen der großen Ähnlichkeit zwischen den Mastergleichungen in Kapitel 4 und den Gl. (6.10) und (6.14) wird auf die Beschreibung der Herleitung der Meanfield-Gleichungen aus diesen beiden Mastergleichungen verzichtet und auf die hinsichtlich der Herangehensweise ähnliche Herleitung in Abschnitt 4.1 verwiesen. Im Folgenden wird die Struktur und Bedeutung der Meanfield-Gleichungen, die aus den Mastergleichungen (6.10) und (6.14) hergeleitet wurden, eingehend diskutiert.

Im Limit $N \rightarrow \infty$ kann das System durch die Einführung von Dichtefunktionen $\tilde{n}(\phi, t)$ beschrieben werden, so daß $\tilde{n}(\phi, t)\Delta\phi$ den Mittelwert der Enzyme im Phasenzustand zwischen ϕ und $\phi + \Delta\phi$ zur Zeit t ergibt. Weiterhin ist $s(t)$ der Mittelwert der freien Substratmoleküle zur Zeit t . Die Gleichung zur Beschreibung der Zeitentwicklung von $\tilde{n}(\phi, t)$ ist

$$\frac{\partial \tilde{n}}{\partial t} = -v \frac{\partial \tilde{n}}{\partial \phi} + \sigma \frac{\partial^2 \tilde{n}}{\partial \phi^2}. \quad (6.16)$$

Die zeitliche Entwicklung der Dichtefunktion $\tilde{n}(\phi, t)$ besteht aus der Drift mit konstanter Geschwindigkeit v und gleichzeitiger Diffusion entlang der Reaktionskoordinate ϕ . Diese Diffusion wird durch intramolekulare Fluktuationen der Intensität σ verursacht.

Am Phasenpunkt $\phi = k_p$ innerhalb des Enzymzyklus wird ein Substratmolekül irreversibel freigesetzt. Eine Umkehrung dieses Prozesses ist nicht möglich. Sobald $\phi \geq k_p$ erreicht wird, kann die Phase während dieses enzymatischen Zyklus nicht mehr kleiner als k_p werden. Innerhalb des Intervalls $(k_p, 1]$ befindet sich das Enzym in der Relaxationsphase, um danach in den Grundzustand zurückzukehren. Der Fluß durch den linken Rand $\phi = k_p$ des Intervalls $(k_p, 1]$ muß gleich dem Fluß durch den rechten Rand des Intervalls $(0, k_p - \varepsilon]$ sein. Die Gl. (6.16) wird deshalb mit den Randbedingungen

$$v\tilde{n}(0) - \sigma \frac{\partial \tilde{n}}{\partial \phi} \Big|_{\phi=0} = vsn, \quad (6.17)$$

$$\tilde{n}(k_p - \varepsilon) = 0, \quad (6.18)$$

$$v\tilde{n}(k_p) - \sigma \frac{\partial \tilde{n}}{\partial \phi} \Big|_{\phi=k_p} = \sigma \frac{\partial \tilde{n}}{\partial \phi} \Big|_{\phi=k_p - \varepsilon} \quad (6.19)$$

und

$$\tilde{n}(1) = 0 \quad (6.20)$$

für beide Teilintervalle gelöst.

Die Gleichung für die zeitliche Entwicklung des Mittelwerts der freien Enzyme hat die Form

$$\frac{dn}{dt} = -vsn + \left[v\tilde{n} - \sigma \frac{\partial \tilde{n}}{\partial \phi} \right]_{\phi=1}. \quad (6.21)$$

Der erste Term auf der rechten Seite dieser Gleichung gibt an, daß die Konzentration n von Enzymen im Grundzustand durch die Bindung eines Substratmoleküls und die damit verbundene Bildung eines ES -Komplexes abnimmt. Der zweite Term beschreibt die Zunahme von n durch Enzyme, die ihren Zyklus beendet haben und in den Grundzustand zurückgekehrt sind.

Die nun noch benötigte Gleichung für die zeitliche Entwicklung des Mittelwerts der Substratmoleküle ist durch

$$\frac{ds}{dt} = -vsn + \left[v\tilde{n} - \sigma \frac{\partial \tilde{n}}{\partial \phi} \right]_{\phi=k_p} - \gamma s + \zeta \quad (6.22)$$

gegeben. Der erste Term auf der rechten Seite beschreibt die Abnahme der Substratkonzentration durch die Bindung an Enzyme im Grundzustand. Der zweite Term beschreibt die Erhöhung der Substratkonzentration durch die Freisetzung

von Substratmolekülen, wenn Enzyme den Phasenpunkt $\phi = k_p$ passieren. Der dritte und vierte Term erfassen den Abbau und die Zufuhr von Substrat.

Die Gesamtzahl N aller Enzyme im System ist zeitunabhängig und bleibt konstant. Sie ist durch

$$N = n(t) + \int_0^1 \tilde{n}(\phi, t) d\phi \quad (6.23)$$

gegeben und kann als eine Erhaltungsgröße der Entwicklung des Reaktionssystems betrachtet werden. Dabei ist N zu jedem Zeitpunkt gleich der Summe aller Enzyme im Grundzustand plus der Enzyme, die sich innerhalb des Phasenzyklus befinden.

Die Gl. (6.16)-(6.23) bilden die makroskopische Näherung, die aus der Mastergleichung hergeleitet wurde. Nun werden diese Gleichungen numerisch integriert und deren Lösungen mit den Ergebnissen des stochastischen Modells verglichen. Anschließend wird die lineare Stabilitätsanalyse für dieses dynamische System durchgeführt.

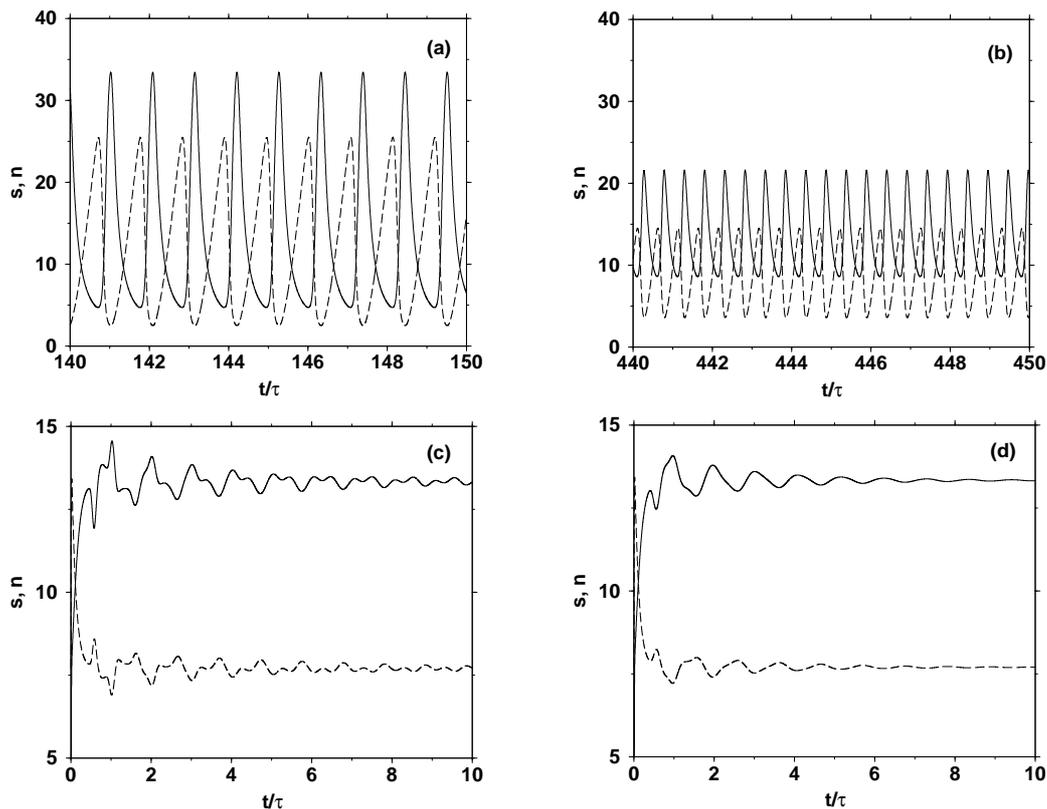


Abb. 6.6: Zeitabhängigkeit der Substratkonzentration (durchgezogen) und Konzentration der Enzyme im Grundzustand (gestrichelt) aus der numerischen Lösung des makroskopischen Modells. Die Parameter stimmen mit den Parametern aus Abb 6.3a-d überein.

Abb. 6.6a zeigt die Zeitabhängigkeit der Substratmolekülkonzentration (schwarz) und der Enzymkonzentration im Grundzustand (grau) der numerischen Lösung der makroskopischen Gleichungen (6.16)-(6.23) für die gleichen Parameterwerte wie in Abb. 6.3a. In diesem Fall zeigt das Reaktionssystem bei $k_p = 0.2$ Oszillation mit der Frequenz $\omega \approx 2\pi/\tau$. Der Vergleich von Abb. 6.6a mit Abb. 6.3a offenbart die hohe Übereinstimmung sowohl in Hinsicht auf die Oszillationsfrequenz als auch bezüglich der Amplitude für beide mathematische Beschreibungsweisen.

Wählt man als Parameter $k_p = 0.55$, zeigt das System Spiking mit der Frequenz $\omega \approx 2\pi/\tau$. Wie ein Vergleich von Abb. 6.6b mit Abb. 6.3b erweist, ist die Übereinstimmung zwischen dem stochastischen Modell und den makroskopischen Gleichungen wieder sehr hoch. Erhöht man die Diffusionskonstante σ und damit die relative statistische Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeit, verschwinden die stabilen Oszillationen. Bei Festhalten aller anderen Parameter zeigt Abb. 6.6 die Zeitentwicklung der Substratkonzentration und der Enzymkonzentration im Grundzustand für $\xi = 0.05$ nach einer kleinen Störung des Systems von seinem Fixpunkt. Die beiden Konzentrationen zeigen gedämpfte Oszillationen mit der Frequenz $\omega \approx 4\pi/\tau$ und kehren in den stabilen Fixpunkt zurück. Unter entsprechenden Parameterbedingungen ergaben sich im stochastischen Modell (siehe Abb. 6.3c) unkorrelierte Fluktuationen um den Fixpunkt.

Wenn man den Parameter σ und damit die relative Schwankungsbreite ξ der Turnover-Zeit weiter erhöht, zeigt das Reaktionssystem nach einer kleinen Störung um den Fixpunkt ebenfalls gedämpfte Oszillationen. Jedoch ist die Frequenz nun $\omega \approx 2\pi/\tau$. Ein Beispiel dafür ist in Abb. 6.6d für $\xi = 0.19$ gegeben. Diese Frequenzänderung wurde ebenfalls im stochastischen Modell gefunden (siehe Abb. 6.3d).

In den Gleichungen der Meanfield-Näherung entspricht das im stochastischen Modell gefundene Spiking einer Hopf-Bifurkation des stationären Zustands (Fixpunkt) und führt zu einem stabilen Grenzzyklus. Die Grenzen des oszillatorischen Bereichs im Parameterraum können durch eine lineare Stabilitätsanalyse bestimmt werden. In Abwesenheit von Oszillationen in der makroskopischen Näherung befindet sich das System in einem stationären Zustand, dem Fixpunkt des Systems. Durch die Analyse der Auswirkung kleiner Störungen auf diesen Zustand können die Synchronisationsgrenzen herausgefunden werden.

Zuerst wird der Fixpunkt der Gl. (6.16)-(6.23) bestimmt. Der stationäre Zustand ist durch die stationäre Lösung der Diffusionsgleichung (6.16) mit den Randbedingungen (6.17)-(6.20) und den Gl. (6.21), (6.22) gegeben. Der Mittelwert der Substratmoleküle \bar{s} im stationären Zustand ist

$$\bar{s} = \frac{\zeta}{\gamma}. \quad (6.24)$$

Die Gesamtzahl der Enzyme wird durch Gl. (6.23) festgelegt. Unter Verwendung

der Lösung von Gl. (6.16) im stationären Zustand, bei dem sich das System im Fixpunkt befindet, ergibt sich \bar{n} aus Gl. (6.23)

$$N = \bar{n} + \frac{v\bar{s}\bar{n}}{v} \left\{ 1 - \frac{2\sigma}{v} \left[1 - \exp\left(-\frac{vk_p}{\sigma}\right) - \exp\left(-\frac{v(1-k_p)}{\sigma}\right) \right] \right\} \quad (6.25)$$

oder umgestellt nach \bar{n}

$$\bar{n} = \frac{N}{1 + \frac{v\bar{s}}{v} \left\{ 1 - \frac{2\sigma}{v} \left[1 - \exp\left(-\frac{vk_p}{\sigma}\right) - \exp\left(-\frac{v(1-k_p)}{\sigma}\right) \right] \right\}}. \quad (6.26)$$

Die Stabilität dieser stationären Lösung kann durch die Untersuchung des Effekts kleiner Störungen $s = \bar{s} + \delta s(t)$, $n = \bar{n} + \delta n(t)$ und $\tilde{n} = \bar{\tilde{n}} + \delta\tilde{n}(\phi, t)$ bestimmt werden. Setzt man diese Störungen in die Gl. (6.21), (6.22) und die Randbedingungen (6.17) von (6.16) ein und linearisiert dieses Gleichungssystem, erhält man

$$\frac{d\delta n}{dt} = -v\bar{s}\delta n - v\bar{n}\delta s + \left[v\delta\tilde{n}(1, t) - \sigma \frac{\partial\delta\tilde{n}(1, t)}{\partial\phi} \right], \quad (6.27)$$

$$\frac{d\delta s}{dt} = -v\bar{s}\delta n - v\bar{n}\delta s + \left[v\delta\tilde{n}(k_p, t) - \sigma \frac{\partial\delta\tilde{n}(k_p, t)}{\partial\phi} \right] - \gamma\delta s, \quad (6.28)$$

$$\frac{\partial\delta\tilde{n}}{\partial t} = -v \frac{\partial\delta\tilde{n}}{\partial\phi} + \sigma \frac{\partial^2\delta\tilde{n}}{\partial\phi^2}. \quad (6.29)$$

Die Lösungen dieser Gleichungen müssen die linearisierten Randbedingungen

$$\left[v\tilde{n} - \sigma \frac{\partial\tilde{n}}{\partial\phi} \right]_{\phi=0+\epsilon} = v\bar{s}\delta n + v\bar{n}\delta s, \quad (6.30)$$

$$\left[v\tilde{n} - \sigma \frac{\partial\tilde{n}}{\partial\phi} \right]_{\phi=k_p+\epsilon} = \sigma \frac{\partial\tilde{n}}{\partial\phi} \Big|_{\phi=k_p} \quad (6.31)$$

und

$$\delta\tilde{n}(k_p) = 0, \quad \delta\tilde{n}(1) = 0 \quad (6.32)$$

erfüllen.

Die Suche nach der Lösung von Gl. (6.27)-(6.32) kann stark vereinfacht werden, wenn man die Untersuchungen auf kleine Werte der Diffusionskonstante σ beschränkt. Die charakteristische Zeit der ersten instabilen Mode liegt in der Größenordnung von τ . Für derartige Prozesse erstreckt sich der Einfluß der Randbedingung (6.32) auf ein kleines Intervall der Länge $\sqrt{\sigma\tau}$ nach links von dem entsprechenden Rand entfernt. Außerhalb dieses schmalen Bereichs hat die Diffusionsgleichung (6.29) dieselbe Lösung wie ohne diese Randbedingung.

Betrachtet man Gl. (6.27) und (6.28), so ist erkennbar, daß die Flüsse $v\delta\bar{n} - \sigma\partial_\phi\delta\bar{n}$ bei $\phi = k_p$ und $\phi = 1$ benötigt werden. Man erhält nur eine kleine Abweichung, falls die Flüsse nicht an den Punkten $\phi = k_p$ und $\phi = 1$, sondern links von diesen Punkten im Abstand $\sqrt{\sigma\tau}$ verwendet werden. Um diese Flüsse zu bestimmen, kann die Lösung des vereinfachten Problems, bei dem die Ränder an den Punkten $\phi = k_p$ und $\phi = 1$ eliminiert sind, verwendet werden. In diesem Fall ist die Diffusions-Drift-Gleichung (6.29) formal für das Intervall von $\phi = 0$ bis unendlich definiert und nur die Randbedingungen (6.30) gefordert. Diese Randbedingung gibt den Fluß in das betrachtete Intervall an. Der geringe Einfluß der absorbierenden Randbedingungen (6.32) kann leicht numerisch gezeigt werden.

Die Lösung der linearen Differentialgleichungen (6.16) und (6.28)-(6.30) wird in der Form $\delta\bar{n}(\phi, t) = A \exp(\lambda t + k\phi)$, $\delta s = B \exp(\lambda t)$ und $\delta n = C \exp(\lambda t)$ angenommen. Setzt man diesen Ansatz in Gl. (6.16) und (6.28)-(6.30) ein, erhält man die Dispersionsrelation

$$k = \frac{v}{2\sigma} - \sqrt{\frac{v^2}{4\sigma} + \frac{\lambda}{\sigma}} \quad (6.33)$$

und ein homogenes System linearer Gleichungen

$$\hat{\mathbf{D}} \begin{pmatrix} A \\ B \\ C \end{pmatrix} = \lambda \begin{pmatrix} A \\ B \\ C \end{pmatrix} \quad (6.34)$$

mit der Koeffizientenmatrix

$$\hat{\mathbf{D}} = \begin{pmatrix} v - \sigma k(\lambda) & -v\bar{n} & -v\bar{s} \\ (\sigma k(\lambda) - v)e^{k(\lambda)} & \lambda + \gamma + v\bar{n} & v\bar{s} \\ (\sigma k(\lambda) - v)e^{k(\lambda)k_p} & v\bar{n} & \lambda + v\bar{s} \end{pmatrix}. \quad (6.35)$$

Die Lösbarkeitsbedingung dieses linearen Gleichungssystems ist durch die charakteristische Gleichung

$$\det(\hat{\mathbf{D}} - \lambda\mathbf{I}) = 0 \quad (6.36)$$

gegeben.

Die Wurzeln dieses Quasi-Polynoms bilden im allgemeinen eine unendliche Menge von komplexen Zahlen $\lambda_j = \Gamma_j + i\omega_j$. Falls für einen gewählten Satz von Parametern die Realteile Γ aller Eigenwerte λ_j kleiner sind, so ist der Fixpunkt stabil. Falls jedoch wenigstens ein Eigenwert einen positiven Realteil besitzt, so wird das Gleichungssystem instabil und beginnt mit der Frequenz ω_j des Imaginärteils dieses Eigenwertes zu oszillieren. Die Instabilitätsgrenze ist deshalb durch $\Gamma_i = 0$ für wenigstens eine Eigenmode bestimmt. Um die kritischen Parameterwerte zu finden, für die eine Bifurkation existiert, setzt man $\Gamma_j = 0$ bei $j = 1$

und berechnet in der Umgebung von $\omega_1 \approx 2\pi/\tau$ durch Variieren des entsprechenden Bifurkationsparameters das absolute Minimum von

$$|\det(\hat{\mathbf{D}} - \lambda \mathbf{I})|. \quad (6.37)$$

Falls dieses Minimum kleiner als 10^{-7} ist, wird angenommen, daß der entsprechende Bifurkationsparameter eine Bifurkationsgrenze angibt. Als nächstes wird diese Methode für $j = 2, 3$ und so weiter angewendet. Es ergibt sich, daß bei $\sigma > 10^{-4}$ nur für $j = 1, 2$ und 3 Bifurkationen möglich sind.

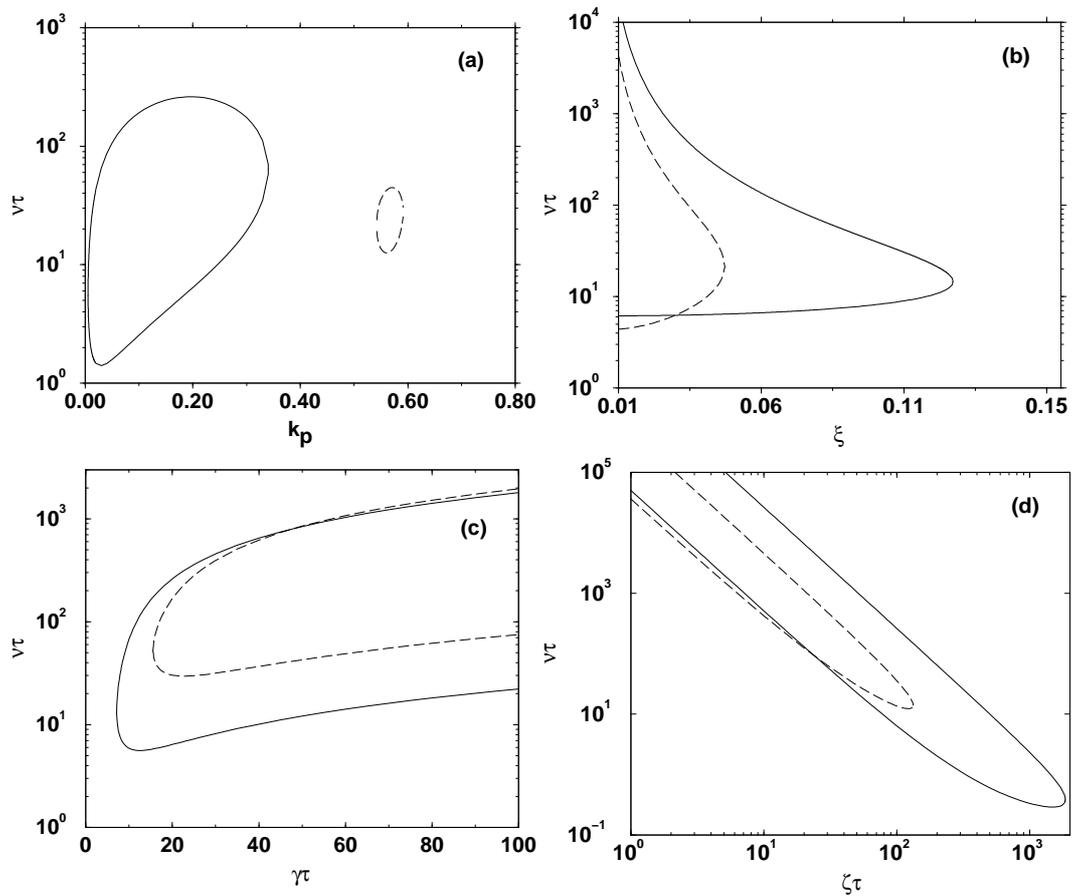


Abb. 6.7: Bifurkationsdiagramme (a) in der Parameterebene (v, k_p) , (b) in der Parameterebene (v, ξ) , (c) in der Parameterebene (v, γ) , (d) in der Parameterebene (v, ζ) als Ergebnis der Stabilitätsanalyse des Fixpunktes in der makroskopischen Näherung für jeweils zwei verschiedene Werte von ω . Die durchgezogenen Linien bezeichnen die Bifurkationsgrenzen für $\omega \approx 2\pi/\tau$ und die gestrichelte Kurve für $\omega \approx 4\pi/\tau$. Die anderen Parameter sind $\sigma = 0.0008/\tau^2$ ($\xi = 0.04$), $k_p = 0.55$, $\gamma\tau = 20$, $\zeta\tau = 100$ und $N = 1000$.

Abb. 6.7 zeigt das Bifurkationsdiagramm in der Parameterebene (k_p, v) aus der numerischen Lösung von Gl. (6.36). Innerhalb der geschlossenen Bereiche ist

das Reaktionssystem instabil, und es entwickelt sich spontan Spiking. Auf den Bifurkationsgrenzen verschwindet der Realteil von λ , der Imaginärteil hingegen ist ungleich 0. Der Wert dieses Imaginärteils bestimmt die Frequenz der Oszillationen, die sich nach dem Verlust der Stabilität herausbilden. Für die gewählten Parameter in Abb. 6.7 geschieht das mit den Frequenzen $\omega \approx 2\pi/\tau$ und $\omega \approx 4\pi/\tau$, dargestellt durch die durchgezogene und gestrichelte Linie der zugehörigen Bifurkationsgrenze. Hält man deshalb k_p fest und erhöht die Ratenkonstante v , die die Bindung der Substratmoleküle bestimmt, wird der stationäre Zustand instabil und Oszillationen entwickeln sich. Erhöht man v noch weiter und überschreitet die obere Bifurkationsgrenze, verschwinden die Oszillationen wieder und das System wird stabil. Das bedeutet, daß oszillatorisches Verhalten nur innerhalb eines bestimmten "Fensters" des Parameters v erwartet werden kann.

In Abb. 6.7b werden die Bifurkationsgrenzen in der Parameterebene (v, k_p) für zwei verschiedene Werte von k_p für ansonsten dieselben Parameter wie in Abb. 6.7a gezeigt. Die durchgezogene Linie in Abb. 6.7 ist die Instabilitätsgrenze. Innerhalb des Bereichs, der durch diese Grenze eingeschlossen wird, oszilliert das Reaktionssystem mit der Frequenz $\omega \approx 2\pi/\tau$. Die gestrichelte Linie begrenzt den Bereich, innerhalb dessen Oszillationen mit höherer Frequenz $\omega \approx 4\pi/\tau$ vorgefunden werden. Es ergibt sich für die Frequenz $\omega \approx 4\pi/\tau$, daß der größte Wert ξ der relativen Schwankungsbreite kleiner ist als bei $\omega \approx 2\pi/\tau$. Das bedeutet, daß das System für Parameterwerte k_p , bei denen Spiking mit höheren Frequenzen gefunden wird, stabiler zu sein scheint als bei niedrigen Frequenzen. Andererseits verläuft bei $\xi < 0.025$ die Bifurkationsgrenze für $\omega \approx 4\pi/\tau$ unterhalb der Bifurkationsgrenze für $\omega \approx 2\pi/\tau$. Am Punkt $\xi \approx 0.025$ schneiden sich beide Grenzen.

Unter Benutzung derselben Bezeichnungen für die Bifurkationsgrenzen wie in Abb. 6.7a und b ist in Abb. 6.7c das Bifurkationsdiagramm in der Parameterebene (v, γ) für $\omega \approx 2\pi/\tau$ und $\omega \approx 4\pi/\tau$ dargestellt. Unterhalb von $\gamma\tau = 7$ ist das System stabil. Zwischen $7 \leq \gamma\tau \leq 15.5$ kann das System nur Oszillationen mit der Frequenz $\omega \approx 2\pi/\tau$ zeigen. Oberhalb von $\gamma\tau = 15.5\tau$ können sich in Abhängigkeit von k_p auch Oszillationen mit $\omega \approx 2\pi/\tau$ und $\omega \approx 4\pi/\tau$ entwickeln.

Im letzten Bifurkationsdiagramm in Abb. 6.7d ist die Abhängigkeit der Synchronisationsgrenze vom Parameter ζ , der die permanente Produktion von Substrat festlegt, dargestellt. Wieder bezeichnet die durchgezogene Linie die Bifurkationsgrenze für Spiking mit der Frequenz $\omega \approx 2\pi/\tau$ und die gestrichelte Linie für $\omega \approx 4\pi/\tau$. Wie bereits in den vorherigen Bifurkationsdiagrammen ist der Instabilitätsbereich im zweiten Fall kleiner. Für $\omega \approx 4\pi/\tau$ erstreckt sich dieser Bereich über drei und für $\omega \approx 2\pi/\tau$ über vier Größenordnungen. In beiden Fällen liegt dieser instabile Bereich für kleine Werte von ζ , bei höheren Werten von v . Eine Erhöhung von ζ senkt die Synchronisationsschwelle hinsichtlich des Bifurkationsparameters v .

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die theoretische Untersuchung von Synchronisationsphänomenen molekularer Enzymzyklen in mikroskopischen Raumbereichen. Wie im ersten Kapitel diskutiert wurde, können diese Synchronisationsprozesse als mikroskopische Selbstorganisationseffekte verstanden werden, bei denen sich das Reaktionssystem auch lokal fernab vom thermodynamischen Gleichgewicht befindet. Sie haben deshalb Ähnlichkeit mit dem Laser, der ebenfalls ein Phänomen mikroskopischer Selbstorganisation ist.

Eine wesentliche Bedingung für das Auftreten dieser Synchronisationseffekte ist die Existenz von Wechselwirkungsmechanismen zwischen den Enzymen. In Kapitel 2 wurden deshalb die verschiedenen Regulationsmechanismen der Aktivierung und Inhibierung diskutiert. Oftmals können die an der Reaktion beteiligten Reaktanden die enzymatische Aktivität ändern, so daß sich Rückkopplungsmechanismen herausbilden.

Die Ergebnisse der in Abschnitt 2.2 diskutierten Experimente zeigen, daß es Enzyme gibt, bei denen die Dauer eines enzymatischen Zyklus nur geringen Schwankungen unterliegt. Wie die Abschätzungen in Abschnitt 2.3 ergaben, kann die diffusionsbestimmte Durchmischungs- und Transitzeit in mikroskopischen Raumbereichen viel kleiner sein als die Dauer eines enzymatischen Zyklus. Diese Situation unterscheidet sich grundsätzlich von der in makroskopischen Reaktionssystemen und wurde als molekulares Netzwerk bezeichnet. Beide Eigenschaften, die relativ geringe Schwankungsbreite der Enzymzyklen und die Verhältnisse der charakteristischen Zeiten, bilden die wesentlichen Annahmen für die in dieser Arbeit untersuchten Modelle.

Im Kapitel 3 wurde unter den oben genannten Bedingungen der Effekt der allosterischen Produktaktivierung anhand einer einfachen Enzymreaktion betrachtet. Für diese Reaktion wurde ein stochastisches Modell mit diskreter Phasendynamik entwickelt und untersucht. Für geringe allosterische Aktivierung der Enzyme durch die Reaktionsprodukte folgte deren Verteilung entlang der Reaktionskoordinate und die der Enzyme im Grundzustand einer Poissonverteilung. Eine Erhöhung der allosterischen Aktivierung führte zur Bildung von Enzymgruppen entlang des Phasenzklus. Infolgedessen ergaben sich schnelle zeitliche Änderungen in der Anzahl der Reaktionsprodukte, die als Spiking bezeichnet wurden.

Die Zahl dieser Enzymgruppen ist von der Lage des Phasenpunktes im Reaktionszyklus, an dem die Reaktionsprodukte freigesetzt werden, abhängig.

Um von der Zahl der diskreten Phasenzustände unabhängig zu werden, wurde in Abschnitt 3.3 ein Modell mit kontinuierlichen Phasenvariablen entwickelt. In diesem Modell wird die Dynamik der Phase eines jeden Enzyms durch eine Langevin-Gleichung beschrieben. Unter Verwendung der zugehörigen Fokker-Planck-Gleichung wurde anschließend die mittlere Turnover-Zeit und relative statistische Schwankungsbreite der Turnover-Zeit bestimmt. Aus den Simulationsergebnissen des kontinuierlichen Enzymmodells wurden zur Beschreibung der Phasensynchronisation die Wahrscheinlichkeitsdichte der Verteilung der Phasendifferenzen für verschiedene Enzymgruppen berechnet. Aus der Wahrscheinlichkeitsdichte wiederum kann ein Ordnungsparameter θ zur Charakterisierung der Synchronisationsstärke abgeleitet werden. Unter Verwendung dieses Ordnungsparameters wurden anschließend in numerischen Simulationen die Bereiche, in denen Phasensynchronisation auftritt, bestimmt. Es zeigte sich, daß mit wachsender Intensität der Fluktuationen der molekularen Turnover-Zeit die Synchronisationsstärke, charakterisiert durch den Ordnungsparameter θ , stetig abnimmt. Für Werte größer als $\pm 20\%$ der Schwankungsbreite konnte kein synchrones Verhalten der Enzyme gefunden werden. Ein wichtiges Resultat dieser Untersuchungen war die Entdeckung der Existenz eines bestimmten Bereichs des Parameters v_1 , der die Bindung der regulatorischen Moleküle beschreibt, innerhalb dessen Synchronisation der Enzymzyklen auftritt. Ist dieser Parameter zu klein oder zu groß, operieren die Enzyme im Reaktionssystem asynchron.

Für das in Kapitel 3 untersuchte Modellsystem wurde in Kapitel 4 die Mastergleichung aufgestellt, um daraus die Differentialgleichungen für die Mittelwerte der Konzentration der Reaktionsprodukte und Phasenzustände der Enzyme herzuleiten. Aus den Gleichungen für die zeitliche Entwicklung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Grundzustand und die Aufenthaltswahrscheinlichkeitsdichte der Enzyme im Phasenzyklus, sowie den dazugehörigen Randbedingungen ergaben sich durch Mittelwertbildung drei Gleichungen. Diese beschreiben die Dynamik der Mittelwerte der Produktmoleküle, Enzyme im Grundzustand und während des Enzymzyklus. Im Spezialfall verschwindender Fluktuationen innerhalb des Enzymzyklus folgten daraus zwei einfache Funktionaldifferentialgleichungen (Delay-Gleichungen), für die eine lineare Stabilitätsanalyse durchgeführt wurde. Unter Verwendung dieser Ergebnisse wurden die Bifurkationsdiagramme für die Parameter des Enzymmodells berechnet. Sowohl die numerischen Lösungen der zwei Delay-Gleichungen als auch die Ergebnisse der Stabilitätsanalyse bestätigten eindrucksvoll die Resultate des stochastischen Modells.

In Kapitel 5 wurde, aufbauend auf dem einfachen stochastischen Modell von Kapitel 3, ein komplexeres Modell der allosterischen Produktinhibierung eingeführt. Darin wurden explizit die Bindungs- und Dissoziationsprozesse der regu-

latorischen Moleküle betrachtet und deren Einfluß auf die Reaktionskinetik studiert. Ähnlich wie im Fall der Produktaktivierung wurden zwei prinzipiell verschiedene Zustände des Reaktionssystems gefunden. Je nach Wahl der Parameter fanden sich Bereiche asynchronen und synchronen Verhaltens der Enzyme. Ebenso hat die Lage des Punktes im Enzymzyklus, an dem die Reaktionsprodukte freigesetzt werden, einen großen Einfluß auf das Synchronisationsverhalten. Wurden die Reaktionsprodukte etwa in der Mitte des Enzymzyklus freigesetzt, so bildeten die Enzyme eine einzige Gruppe. Die Abstände zwischen den Phasenzuständen der Enzyme waren also klein. Falls hingegen die Produktmoleküle bereits zu Beginn oder erst am Ende des Enzymzyklus freigesetzt wurden, synchronisierten die Enzymzustände nicht. Im Gegensatz zum Modell mit Produktaktivierung zeigte das Reaktionssystem mit Produktinhibierung nur Synchronisation der Enzymzustände in einer Gruppe. Das Studium der Abhängigkeit des Ordnungsparameters θ von den Systemparametern ermöglichte die Bestimmung der Bereiche, innerhalb derer Synchronisation im stochastischen Modell auftrat. Ähnlich wie bereits im Enzymmodell mit Produktaktivierung ergaben sich "Parameterfenster" mit synchronem Systemverhalten.

Die numerische Analyse wurde wieder durch die Untersuchung der Meanfield-Gleichungen, die aus der zugehörigen Mastergleichung hergeleitet wurden, ergänzt. Sowohl die numerische Lösung der Meanfield-Gleichungen als auch die Ergebnisse der linearen Stabilitätsanalyse ergaben eine gute Übereinstimmung mit den Resultaten des stochastischen Modells. In Abschnitt 5.4 wurde der Einfluß von Modifikationen in der Bindungsfähigkeit der regulatorischen Produkte an das Enzym untersucht. Konnten bisher diese Moleküle nur im Grundzustand an das Enzym binden, so wurde nun der Fall betrachtet, bei dem die regulatorischen Moleküle unabhängig vom Enzymzustand (Modifikation 1) oder im Grundzustand und solange ein *ES*-Komplex vorliegt, binden können (Modifikation 2). Es ergaben sich keine qualitativen Änderungen im Systemverhalten im Vergleich zum ursprünglichen Modell. Allerdings fiel auf, daß die Toleranz des Spiking gegenüber Fluktuationen der Turnover-Zeit in der Modifikation 2 stark zunahm. So wurden noch für die relative Schwankungsbreite der Turnover-Zeit von mehr als $\pm 40\%$ starke Korrelationen in den Phasenzuständen der Enzyme festgestellt.

Zum Abschluß der Arbeit wurde in Kapitel 6 untersucht, ob Phasensynchronisation der Enzymzyklen nur für regulatorische Enzyme auftreten kann. Es wurde dazu eine Kette, bestehend aus fünf chemischen Reaktionen, betrachtet. Für dieses Reaktionssystem wurden wieder ein stochastisches Modell gebildet und numerische Simulationen durchgeführt. Interessanterweise ergaben diese Untersuchungen, daß selbst im Fall nichtregulatorischer Enzyme Wechselwirkungen durch solche Parallelreaktionen stark genug sein können, um ähnliche Synchronisationseffekte wie im Fall allosterischer Produktaktivierung hervorzurufen. Ähnlich wie dort können sich Enzymgruppen entlang des Enzymzyklus bilden, deren

Zahl von der Lage des Phasenpunktes, an dem die Reaktionsprodukte gebildet werden, abhängt. Selbst für Schwankungen der Turnover-Zeit von mehr als $\pm 20\%$ fanden sich noch Korrelationen zwischen den Enzymzuständen verschiedener Enzyme.

Darüberhinaus zeigte sich eine Verringerung der Zahl der Enzymgruppen unter sonst gleichen Bedingungen für höhere Werte der Schwankungsbreite der Turnover-Zeit. Um diesen Effekt besser zu verstehen, wurden aus der Mastergleichung für dieses Reaktionssystem wieder Meanfield-Gleichungen hergeleitet. In diesen Gleichungen wurde dann der Einfluß der Diffusion der Enzymzustände entlang der Phase untersucht. Starke Diffusion korrespondiert mit einer hohen Schwankungsbreite der enzymatischen Turnover-Zeit. In den numerischen Lösungen der Meanfield-Gleichungen zeigte sich, daß für höhere Werte der Diffusion der Phasenzustände, gedämpfte Oszillationen mit der halben Frequenz wie im Fall schwacher Diffusion auftraten. Allerdings ergaben sich für große Werte der Phasendiffusion keine stabilen sondern ausschließlich gedämpfte Oszillationen.

Die in der Einleitung aufgeworfene Frage, ob es theoretisch möglich ist, Synchronisation molekularer Enzymzyklen, hervorgerufen durch interne Wechselwirkungen zwischen Enzymen, vorzufinden, wurde durch die Analyse der drei Modelle positiv beantwortet. Sowohl bei den allosterisch regulierten Enzymreaktionen als auch für das nichtregulatorische Enzymsystem kam es zur spontanen Herausbildung einer synchronen, intramolekularen Dynamik, gekennzeichnet durch starke Korrelationen zwischen der zeitlichen Abfolge unterschiedlicher Enzymzyklen.

Anhang A

A.1 Wahrscheinlichkeitsverteilung der Produktmoleküle ohne Kopplung

In diesem Abschnitt soll die stationäre Wahrscheinlichkeitsverteilung der Produktmoleküle für das in Kapitel 3 untersuchte Modell einer Enzymreaktion im Fall vernachlässigbar schwacher Kopplung zwischen den Enzymzuständen berechnet werden. Gleichzeitig werden anhand dieses einfachen Beispiels wichtige Grundbegriffe stochastischer Prozesse vorgestellt.

In Kapitel 3.1 wurde ein zeitdiskretes Modell einer Enzymreaktion mit allosterischer Produktaktivierung betrachtet. In diesem Modell konnte die Anzahl m der freien Produktmoleküle zu jedem diskreten Zeitpunkt $t_j = j\Delta t$ mit $j = 0, 1, 2, 3, \dots$ eine natürliche Zahl größer gleich Null sein¹. Betrachtet man eine konkrete Simulation des stochastischen diskreten Modells, so ergibt sich eine Sequenz von Zufallsvariablen m_1, m_2, \dots, m_j zu den Zeitpunkten t_1, t_2, \dots, t_j ². Die Wahrscheinlichkeit $p(m_j, t_j)$, zum Zeitpunkt t_j , m_j Produktmoleküle zu finden, ist eine Funktion des Zeitpunktes. Eine solche Folge zeitabhängiger Zufallszahlen m_j heißt stochastischer Prozeß [178, 49, 180, 181]. Jedoch ist im allgemeinen m_{j+1} nicht völlig von m_j unabhängig, sondern wird durch die Dynamik des Systems beeinflusst. Betrachtet man die bedingte Wahrscheinlichkeit $p(m_j, t_j | m_{j-1}, t_{j-1}; \dots; m_1, t_1)$, so kann man zur Beschreibung realer Systeme meist Modelle finden, die die Eigenschaft

$$p(m_j, t_j | m_{j-1}, t_{j-1}; \dots; m_1, t_1) = p(m_j, t_j | m_{j-1}, t_{j-1}) \quad (\text{A.1})$$

erfüllen. In diesem Fall ist die Zufallsvariable m_j zum Zeitpunkt t_j nur von m_{j-1} , also vom Wert der Variable zum vorhergehenden Zeitpunkt t_{j-1} abhängig. Zufallsprozesse mit dieser Eigenschaft heißen Markovprozesse. Die rechte Seite in Gl. (A.1) wird auch als Übergangswahrscheinlichkeit bezeichnet.

¹Dieser Wertebereich wird auch als Grundmenge bezeichnet.

²Analog ist das Ergebnis einer solchen Realisierung im kontinuierlichen Modell (Abschnitt 3.3) eine Trajektorie $m(t)$.

Die Wahrscheinlichkeit $p(m_3, t_3; m_2, t_2; m_1, t_1)$, eine bestimmte Realisierung m_1, m_2, m_3 zu drei beliebigen Zeiten t_1, t_2, t_3 vorzufinden, ist für einen Markovprozeß durch die bedingten Wahrscheinlichkeiten

$$p(m_3, t_3 | m_2, t_2), p(m_2, t_2 | m_1, t_1)$$

bestimmt. Es gilt offensichtlich

$$\begin{aligned} p(m_3, t_3; m_2, t_2; m_1, t_1) &= p(m_3, t_3 | m_2, t_2; m_1, t_1) p(m_2, t_2; m_1, t_1) \quad (\text{A.2}) \\ &= p(m_3, t_3 | m_2, t_2) p(m_2, t_2 | m_1, t_1) p(m_1, t_1). \end{aligned}$$

Summiert³ man in Gl. (A.2) über m_2 , ergibt sich

$$\begin{aligned} p(m_3, t_3; m_1, t_1) &= \sum_{m_2=0}^{\infty} p(m_3, t_3; m_2, t_2; m_1, t_1) \quad (\text{A.3}) \\ &= \sum_{m_2=0}^{\infty} p(m_3, t_3 | m_2, t_2) p(m_2, t_2 | m_1, t_1) p(m_1, t_1). \end{aligned}$$

Aus der Eigenschaft der bedingten Wahrscheinlichkeit

$$p(m_3, t_3; m_1, t_1) = p(m_3, t_3 | m_1, t_1) p(m_1, t_1) \quad (\text{A.4})$$

ergibt sich für die Übergangswahrscheinlichkeit sodann

$$p(m_3, t_3 | m_1, t_1) = \sum_{m_2=0}^{\infty} p(m_3, t_3 | m_2, t_2) p(m_2, t_2 | m_1, t_1). \quad (\text{A.5})$$

Die Übergangswahrscheinlichkeiten eines Markovprozesses müssen Gl. (A.5) erfüllen, die auch als Chapman-Kolmogorov-Gleichung bezeichnet wird.

Man kann aus Gl. (A.3) eine zur Chapman-Kolmogorov-Gleichung analoge Beziehung gewinnen. Dazu wird wieder die Beziehung (A.4) ausgenutzt und in Gl. (A.3) über m_1 summiert:

$$\sum_{m_1=0}^{\infty} p(m_3, t_3; m_1, t_1) = \sum_{m_2=0}^{\infty} \left(p(m_3, t_3 | m_2, t_2) \sum_{m_1=0}^{\infty} p(m_2, t_2; m_1, t_1) \right) \quad (\text{A.6})$$

Führt man die Summation durch und wird, um die Allgemeingültigkeit zu betonen, die Indizierung geändert, erhält man

$$p(m, t) = \sum_{m'=0}^{\infty} p(m, t | m', t') p(m', t'). \quad (\text{A.7})$$

³Falls die Zufallsvariable kontinuierlich ist, muß man integrieren.

Aus dieser Gleichung soll im Folgenden eine Differentialgleichung als Bilanzgleichung für die Zeitentwicklung der Wahrscheinlichkeit $p(m, t)$ hergeleitet werden [50].

Für Zeitintervalle $\Delta t = t - t'$ wird in realen Systemen die Übergangswahrscheinlichkeit $p(m, t | m', t')$ von $m' \rightarrow m$ für $\Delta t \rightarrow 0$ verschwinden. Man kann nun die Übergangsraten $w(m, m')$ durch

$$p(m, t | m', t') = w(m, m')\Delta t + \dots, m \neq m' \quad (\text{A.8})$$

eingeführen. Die Übergangswahrscheinlichkeiten beinhalten auch die Wahrscheinlichkeit $p(m', t | m', t')$, daß im System kein Übergang stattfindet. Für $\Delta t \rightarrow 0$ muß diese Wahrscheinlichkeit 1 werden. Es gilt dann

$$p(m', t | m', t') = 1 + w(m', m')\Delta t + \dots \quad (\text{A.9})$$

Da das System innerhalb des Intervalls Δt entweder in einen anderen Zustand übergeht oder im ursprünglichen Zustand bleibt, gilt die Bedingung

$$\sum_{m=0}^{\infty} p(m, t | m', t') = 1. \quad (\text{A.10})$$

Daraus folgt

$$p(m', t | m', t') = 1 - \sum_{m \neq m'}^{\infty} p(m, t | m', t'). \quad (\text{A.11})$$

Setzt man Gl. (A.8) und (A.9) in diese Gleichung ein, erhält man

$$w(m', m') = - \sum_{m \neq m'}^{\infty} w(m, m'). \quad (\text{A.12})$$

Aus Gleichung (A.7) folgt für ein kleines Zeitintervall $[t, t + \Delta t]$

$$p(m, t + \Delta t) = \sum_{m'=0}^{\infty} p(m, t + \Delta t | m', t) p(m', t). \quad (\text{A.13})$$

Unter Verwendung von Gl. (A.8) und (A.9) findet man unter Vernachlässigung der Terme höherer Ordnung als Δt

$$p(m, t + \Delta t) - p(m, t) = \sum_{m'=0}^{\infty} w(m, m') p(m', t) \Delta t. \quad (\text{A.14})$$

Dividiert man Gl. (A.14) durch Δt und führt den Grenzübergang $\Delta t \rightarrow 0$ aus, folgt

$$\dot{p}(m, t) = \sum_{m'=0}^{\infty} w(m, m') p(m', t). \quad (\text{A.15})$$

Unter Benutzung von Gl. (A.12) ergibt sich daraus

$$\dot{p}(m,t) = \sum_{m \neq m'}^{\infty} [w(m,m')p(m',t) - w(m',m)p(m,t)], \quad (\text{A.16})$$

die als Mastergleichung bezeichnet wird und die zeitliche Entwicklung der Wahrscheinlichkeitsverteilung $p(m,t)$ beschreibt. Um für ein konkretes System diese Gleichung aufzustellen, müssen die Übergangsraten $w(m',m)$ und $w(m,m')$ bekannt sein. Die hier vorgestellten Herleitungen können leicht auf mehrdimensionale und kontinuierliche Zufallsvariablen übertragen werden.

Es wird nun die Mastergleichung für eine einfache chemische Reaktion aufgestellt. Mit der Rate ρ werden pro Zeiteinheit Δt Produktmoleküle erzeugt und mit der Rate γ wieder abgebaut. Gesucht ist die Gleichung für die zeitliche Änderung der Wahrscheinlichkeit $q(m)$, m Produktmoleküle vorzufinden. Diese lautet offensichtlich

$$\begin{aligned} \dot{q}(m,t) &= \gamma((m+1)q(m+1,t) - mq(m,t)) \\ &+ \rho(q(m-1,t) - q(m,t)). \end{aligned} \quad (\text{A.17})$$

Der erste Term auf der rechten Seite von Gl. (A.17) gibt die Änderung der Wahrscheinlichkeit $q(m)$ durch den Abbau der Produktmoleküle mit der Rate γ an, während der zweite Term die Änderung von $q(m)$ durch die Erzeugung der Produktmoleküle mit der Rate ρ erfaßt.

Gl. (A.17) beschreibt auch die Verhältnisse für das enzymatische Reaktionssystem aus Kapitel 3. Die Rate ρ ist die Anzahl der je Zeiteinheit Δt durch die Enzyme freigesetzten Produktmoleküle. Die stationäre Lösung dieses Gleichungssystems kann leicht bestimmt werden. Schreibt man Gl. (A.17) für $\dot{q}(m,t) = 0$ explizit aus, so lauten die ersten Gleichungen

$$0 = \gamma q(1) - \rho q(0), \quad (\text{A.18})$$

$$0 = \gamma(2q(2) - q(1)) + \rho(q(0) - q(1)) \quad (\text{A.19})$$

:

$$0 = \gamma((m+1)q(m+1) - mq(m)) + \rho(q(m-1) - q(m)) \quad (\text{A.20})$$

usw. Setzt man Gl. (A.18) in Gl. (A.19) ein und führt diese Prozedur immer weiter durch, ergibt sich schließlich

$$q(m) = (m+1) \frac{\gamma}{\rho} q(m+1). \quad (\text{A.21})$$

Unter Benutzung der ersten $m-1$ Gleichungen (A.21) folgt daraus

$$q(m) = \left(\frac{\rho}{\gamma}\right)^m \frac{1}{m!} q(0). \quad (\text{A.22})$$

Um $q(0)$ zu bestimmen, benutzt man die Normalisierungsbedingung

$$1 = q(0) \sum_{m=0}^{\infty} \frac{1}{m!} \left(\frac{\rho}{\gamma} \right)^m = q(0) \exp \left(\frac{\rho}{\gamma} \right). \quad (\text{A.23})$$

Somit ergibt sich $q(0) = \exp(-\rho/\gamma)$ und daraus unter Verwendung von Gl. (A.22) die Verteilung der Produktmoleküle

$$q(m) = \frac{1}{m!} \left(\frac{\rho}{\gamma} \right)^m \exp \left(-\frac{\rho}{\gamma} \right), \quad (\text{A.24})$$

die eine Poissonverteilung darstellt.

A.2 Zusammenhang zwischen Modellen mit diskreter und kontinuierlicher Phasenvariable

Die Phasendynamik von $\Phi_i(j)$, die durch den Algorithmus (3.2) festgelegt wird, stellt einen Zufallsweg, charakterisiert durch die Übergangswahrscheinlichkeiten $v_+\Delta t$ und $v_-\Delta t$, dar. Diese definieren zu jedem Zeitschritt die Wahrscheinlichkeit der Erhöhung oder Verringerung des Phasenzustandes $\Phi_i(j)$ um ± 1 . Für die Zeitentwicklung der Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(\Phi, j)$ eines einzelnen Enzyms dieses diskreten Markovprozesses gilt die diskrete Mastergleichung

$$P(\Phi, j+1) = v_-(\Phi)\Delta t P(\Phi+1, j) + v_+(\Phi)\Delta t P(\Phi-1, j) + (1 - v_+(\Phi)\Delta t - v_-(\Phi)\Delta t)P(\Phi, j). \quad (\text{A.25})$$

Unter bestimmten weiter unten diskutierten Annahmen kann diese diskrete Mastergleichung durch die Fokker-Planck-Gleichung (3.12) angenähert werden.

Nach der Transformation der ganzzahligen Phasenkoordinate Φ und der Zeit j zur reellen Phase ϕ und Zeit t , definiert durch die Beziehungen $\phi = \Phi/K_e$ und $t = j\Delta t$, wird aus der Mastergleichung (A.25)

$$\begin{aligned} P(\phi, t + \Delta t) &= v_-(\Phi + \Delta\phi)\Delta t P(\phi + \Delta\phi, t) \\ &+ v_+(\phi - \Delta\phi)\Delta t P(\phi - \Delta\phi, t) \\ &+ (1 - v_+(\phi)\Delta t - v_-(\phi)\Delta t)P(\phi, t). \end{aligned} \quad (\text{A.26})$$

Durch Ausführen des Grenzübergangs $\Delta t \rightarrow 0$ nimmt die Mastergleichung (A.26) die Differentialform

$$\begin{aligned} \frac{\partial P(\phi, t)}{\partial t} &= -(v_+(\phi) + v_-(\phi))P(\phi, t) + v_+(\phi - \Delta\phi)P(\phi - \Delta\phi, t) \\ &+ v_-(\phi + \Delta\phi)P(\phi + \Delta\phi, t) \end{aligned} \quad (\text{A.27})$$

an. Im Limit $\Delta\phi \rightarrow 0$ kann eine Taylorentwicklung für

$$P(\phi \pm \Delta\phi, t) = P(\phi, t) \pm \frac{\partial P(\phi, t)}{\partial \phi} \Delta\phi + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 P(\phi, t)}{\partial \phi^2} (\Delta\phi)^2 + \dots \quad (\text{A.28})$$

und

$$v_{\pm}(\phi \mp \Delta\phi) = v_{\pm}(\phi) \mp \frac{\partial v_{\pm}(\phi)}{\partial \phi} \Delta\phi + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 v_{\pm}(\phi)}{\partial \phi^2} (\Delta\phi)^2 + \dots \quad (\text{A.29})$$

durchgeführt werden. Nun werden Gl. (A.28) und (A.29) in die Mastergleichung (A.27) eingesetzt, und man erhält eine unendliche Reihe in $\Delta\phi$. Diese Reihenentwicklung wird Kramers-Moyal-Entwicklung genannt [179]. Vernachlässigt man alle Glieder von höherer Ordnung als zwei, so erhält man nach einigen Umformungen

$$\frac{\partial P(\phi, t)}{\partial t} = - \frac{\partial (v_+(\phi) - v_-(\phi)) P(\phi, t)}{\partial \phi} \Delta\phi + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 (v_+(\phi) + v_-(\phi)) P(\phi, t)}{\partial \phi^2} (\Delta\phi)^2. \quad (\text{A.30})$$

Benutzt man die folgenden Notationen

$$v(\phi) = (v_+(\phi) - v_-(\phi)) \Delta\phi$$

und

$$\sigma(\phi) = \frac{1}{2} (v_+(\phi) + v_-(\phi)) (\Delta\phi)^2$$

und setzt diese in Gl. (A.30) ein, ergibt sich

$$\frac{\partial P(\phi, t)}{\partial t} = - \frac{\partial v(\phi) P(\phi, t)}{\partial \phi} + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \sigma P(\phi, t)}{\partial \phi^2}. \quad (\text{A.31})$$

Diese Fokker-Planck-Gleichung beschreibt die Zeitentwicklung der Wahrscheinlichkeitsdichte für ein einzelnes Enzym. Im Spezialfall, daß v und σ unabhängig von ϕ sind, ergibt sich daraus Gl. (3.12). Ist die Zahl K der diskreten Zustände des Automatenmodells in Gl. (3.2) sehr groß, kann diese durch die kontinuierliche Beschreibungsweise der Gl. (3.11) ersetzt werden.

A.3 Herleitung der Meanfield-Gleichungen für das Modell mit Produktinhibierung

Aus der in Abschnitt 5.3 aufgestellten Mastergleichungen (5.8) und (5.11) sollen in diesem Teil des Anhangs die Meanfield-Gleichungen hergeleitet werden⁴.

⁴Die Herleitung der Meanfield-Gleichungen für das Enzymmodell mit Produktinhibierung erfolgt hier in sehr knapper Form. Eine ausführliche Erklärung der Herleitung ist für das Modell mit Produktaktivierung in Kapitel 4 zu finden.

Die Mastergleichung

Die Mastergleichung für die Wahrscheinlichkeitsdichte $P(\phi, r, m)$ lautet

$$\begin{aligned} \frac{\partial P(\phi, r, m)}{\partial t} &= -v \frac{\partial P(\phi, r, m)}{\partial \phi} + \sigma \frac{\partial^2 P(\phi, r, m)}{\partial \phi^2} \\ &+ \kappa(r+1)P(\phi, r+1, m-1) - \kappa(r)P(\phi, r, m) \\ &+ \gamma[(m+1)P(\phi, r, m+1) - mP(\phi, r, m)]. \end{aligned} \quad (\text{A.32})$$

Die Mastergleichung für die Aufenthaltswahrscheinlichkeit $Q(r, m)$ des Enzyms im Grundzustand, im Zustand r und bei gleichzeitig m vorhandenen Produktmolekülen wurde in Abschnitt 5.3 begründet und ist

$$\begin{aligned} \frac{\partial Q(r, m)}{\partial t} &= F(1, r, m) - v(r)Q(r, m) \\ &+ \gamma[(m+1)Q(r, m+1) - mQ(r, m)] \\ &+ \beta(r-1)(m+1)Q(r-1, m+1) - \beta(r)mQ(r, m) \\ &+ \kappa(r+1)Q(r+1, m-1) - \kappa(r)Q(r, m). \end{aligned} \quad (\text{A.33})$$

Zusätzlich müssen wieder die Randbedingungen an den Punkten $\phi = 0$, $\phi = k_p$ und $\phi = 1$ für die Wahrscheinlichkeitsdichte $P(\phi, r, m)$ berücksichtigt werden. Die Reaktionskoordinate, entlang derer $P(\phi, m)$ definiert ist, erstreckt sich von $\phi = 0$ bis $\phi = 1$. Darüberhinaus gibt es den besonderen Punkt $\phi = k_p$ innerhalb des Enzymzyklus, an dem die Reaktionsprodukte irreversibel freigesetzt werden. Das gesamte Intervall der Reaktionskoordinate wird in zwei Segmente $[0, k_p - \varepsilon]$ und $[k_p, 1]$ eingeteilt, und für beide Teilintervalle werden die Randbedingungen an den Enden benötigt. Diese Randbedingungen lauten

$$F(0, r, m) = \left[vP(\phi, r, m) - \sigma \frac{\partial P(\phi, r, m)}{\partial \phi} \right]_{\phi=0} = v(r)Q(r, m), \quad (\text{A.34})$$

$$P(k_p - \varepsilon, r, m) = 0, \quad (\text{A.35})$$

$$F(k_p, r, m+1) = F(k_p - \varepsilon, r, m) \quad (\text{A.36})$$

und

$$P(1, r, m) = 0. \quad (\text{A.37})$$

Zur Vereinfachung der Schreibweise wurde der Fluß der Wahrscheinlichkeitsdichte durch einen beliebigen Phasenpunkt ϕ wieder mit

$$F(\phi, r, m) = vP(\phi, r, m) - \sigma \frac{\partial P(\phi, r, m)}{\partial \phi}$$

abgekürzt. Die genaue Begründung dieser Randbedingungen erfolgte in Abschnitt 4.1 und ist auch für dieses System gültig.

Herleitung der Meanfield-Gleichung aus der Mastergleichung

Aus den beiden Mastergleichungen (A.32) und (A.33) werden nun die Meanfield-Gleichungen hergeleitet. Die Dichteverteilungsfunktionen $\tilde{n}_0(\phi) = \tilde{n}(\phi, r = 0)$ und $\tilde{n}_1(\phi) = \tilde{n}(\phi, r = 1)$ der Enzyme ohne bzw. mit gebundenem regulatorischen Molekül sind durch

$$\tilde{n}_0 = \tilde{n}(\phi, r = 0) = N \sum_m^{\infty} P(\phi, r = 0, m) \quad (\text{A.38})$$

und

$$\tilde{n}_1 = \tilde{n}(\phi, r = 1) = N \sum_m^{\infty} P(\phi, r = 1, m) \quad (\text{A.39})$$

gegeben. Aus Gl. (A.32) folgt sofort

$$\begin{aligned} \frac{\partial \tilde{n}_0(\phi)}{\partial t} &= -N \sum_m^{\infty} \left\{ v \frac{\partial P(\phi, 0, m)}{\partial \phi} + \sigma \frac{\partial^2 P(\phi, 0, m)}{\partial \phi^2} \right. \\ &\quad + \kappa(1)P(\phi, 1, m-1) - \kappa(0)P(\phi, 0, m) \\ &\quad \left. + \gamma[(m+1)P(\phi, 0, m+1) - mP(\phi, 0, m)] \right\} \end{aligned}$$

und

$$\begin{aligned} \frac{\partial \tilde{n}_1(\phi)}{\partial t} &= -N \sum_m^{\infty} \left\{ v \frac{\partial P(\phi, 1, m)}{\partial \phi} + \sigma \frac{\partial^2 P(\phi, 1, m)}{\partial \phi^2} \right. \\ &\quad + \kappa(2)P(\phi, 2, m-1) - \kappa(1)P(\phi, 1, m) \\ &\quad \left. + \gamma[(m+1)P(\phi, 1, m+1) - mP(\phi, 1, m)] \right\}. \end{aligned}$$

Wie bereits betont wurde, gilt für die Dissoziationskonstante $\kappa(r)$ der Produktmoleküle von der regulatorischen Bindungsstelle $\kappa(r \neq 1) = 0$ und $\kappa(1) = 1$. Weiterhin gilt

$$\begin{aligned} &\sum_{m=0}^{\infty} [(m+1)P(\phi, r, m+1) - mP(\phi, r, m)] \\ &= \sum_{m=1}^{\infty} [mP(\phi, r, m) - mP(\phi, r, m)] = 0 \end{aligned}$$

und

$$\begin{aligned} &\sum_{m=0}^{\infty} [P(\phi, r, m-1) - P(\phi, r, m)] = \sum_{m=1}^{\infty} P(\phi, r, m-1) - \sum_{m=0}^{\infty} P(\phi, r, m) \\ &= \sum_{m=0}^{\infty} P(\phi, r, m) - \sum_{m=0}^{\infty} P(\phi, r, m) = 0. \end{aligned}$$

Unter Berücksichtigung dieser Beziehungen ergeben sich somit

$$\frac{\partial \tilde{n}_0(\phi)}{\partial t} = -v \frac{\partial \tilde{n}_0(\phi)}{\partial \phi} + \sigma \frac{\partial^2 \tilde{n}_0(\phi)}{\partial \phi^2} + \kappa \tilde{n}_1(\phi) \quad (\text{A.40})$$

sowie

$$\frac{\partial \tilde{n}_1(\phi)}{\partial t} = -v \frac{\partial \tilde{n}_1(\phi)}{\partial \phi} + \sigma \frac{\partial^2 \tilde{n}_1(\phi)}{\partial \phi^2} - \kappa \tilde{n}_1(\phi) \quad (\text{A.41})$$

als Gleichungen für die Zeitentwicklung der Verteilung der Mittelwerte \tilde{n}_0, \tilde{n}_1 der Enzymzustände im Zyklus.

Bei Bezeichnung des Flusses der Enzymkonzentrationsdichte mit

$$f_0(\phi) = v \tilde{n}_0(\phi) - \sigma \frac{\partial \tilde{n}_0(\phi)}{\partial \phi}, \quad f_1(\phi) = v \tilde{n}_1(\phi) - \sigma \frac{\partial \tilde{n}_1(\phi)}{\partial \phi}$$

folgen als Randbedingungen für die Gl. (A.40) und (A.41) aus den Randbedingungen der Mastergleichung (A.34)-(A.37)

$$f_0(0) = v(r)n_0(m), \quad f_1(0) = v(r)n_1(m) \quad (\text{A.42})$$

$$\tilde{n}_0(k_p - \varepsilon) = 0, \quad \tilde{n}_1(k_p - \varepsilon) = 0, \quad \text{falls } \sigma > 0, \quad (\text{A.43})$$

$$f_0(k_p) = f_0(k_p - \varepsilon), \quad f_1(k_p) = f_1(k_p - \varepsilon) \quad (\text{A.44})$$

und

$$\tilde{n}_0(1) = 0, \quad \tilde{n}_1(1) = 0. \quad (\text{A.45})$$

Die Meanfield-Gleichungen für die zeitliche Entwicklung der Mittelwerte

$$n_0(t) = N \sum_m^{\infty} Q(r=0, m(t)) \quad \text{und} \quad n_1(t) = N \sum_m^{\infty} Q(r=1, m(t))$$

der Enzyme im Grundzustand, die kein ($r=0$) bzw. ein ($r=1$) regulatorisches Molekül gebunden haben, erhält man aus Gl. (A.33) durch Summation über m :

$$\begin{aligned} \frac{\partial n_0}{\partial t} &= N \sum_m^{\infty} \{ F(1, 0, m) - v(0)Q(0, m) + \gamma[(m+1)Q(0, m+1) - mQ(0, m)] \\ &+ \beta(-1)(m+1)Q(-1, m+1) - \beta(0)mQ(0, m) \\ &+ \kappa(1)Q(1, m-1) - \kappa(0)Q(0, m) \} \end{aligned} \quad (\text{A.46})$$

und

$$\begin{aligned} \frac{\partial n_1}{\partial t} &= N \sum_m^{\infty} \{ F(1, 1, m) - v(1)Q(1, m) + \gamma[(m+1)Q(1, m+1) - mQ(1, m)] \\ &+ \beta(0)(m+1)Q(0, m+1) - \beta(1)mQ(1, m) \\ &+ \kappa(2)Q(2, m-1) - \kappa(1)Q(1, m) \}. \end{aligned} \quad (\text{A.47})$$

Für die Dissoziationsrate gilt wieder $\kappa(1) = \kappa$ und $\kappa(r \neq 1) = 0$. Die Bindung der regulatorischen Produktmoleküle ist nur möglich, wenn noch kein Produktmolekül an die entsprechende Bindungsstelle des Enzyms gebunden hat, also für $r = 0$. Daher ist $\beta(0) = \beta$ und $\beta(r \neq 0) = 0$. Mit

$$\begin{aligned} & \sum_{m=0}^{\infty} [(m+1)Q(r, m+1) - mQ(r, m)] \\ &= \sum_{m=1}^{\infty} [mQ(r, m) - mQ(r, m)] = 0 \end{aligned}$$

folgen dann aus den Gl. (A.46) und (A.47) mit $f_0(\phi)$ und $f_1(\phi)$, als dem Fluß der Enzymdichte der Enzyme ohne bzw. mit regulatorischem Produktmolekül, die gesuchten Gleichungen

$$\frac{\partial n_0}{\partial t} = f_0(1) - v_0 n_0 - \beta \langle m \rangle n_0 + \kappa n_1 \quad (\text{A.48})$$

und

$$\frac{\partial n_1}{\partial t} = f_1(1) - v_1 n_1 + \beta \langle m \rangle n_0 - \kappa n_1 \quad (\text{A.49})$$

für die zeitliche Änderung der Mittelwerte der Enzyme im Grundzustand.

Jetzt muß noch die Gleichung für die Mittelwerte der Reaktionsprodukte berechnet werden. Die Wahrscheinlichkeit $G(m)$, m freie Produktmoleküle vorzufinden, ist gleich

$$G(m) = \sum_{r=0}^1 \left(\int_0^{k_p - \varepsilon} P(\phi, r, m) d\phi + \int_{k_p}^1 P(\phi, r, m) d\phi + Q(r, m) \right). \quad (\text{A.50})$$

Die Zeitableitung ist dann

$$\frac{dG(m)}{dt} = \sum_{r=0}^1 \left(\int_0^{k_p - \varepsilon} \partial_t P(\phi, r, m) d\phi + \int_{k_p}^1 \partial_t P(\phi, r, m) d\phi + \partial_t Q(r, m) \right).$$

Unter Verwendung der Mastergleichungen (A.32) und (A.33) ergibt sich daraus

$$\begin{aligned} \frac{dG(m)}{dt} &= \sum_{r=0}^1 \left\{ -v [P(k_p - \varepsilon, r, m) - P(0, r, m)] \right. \\ &+ \sigma \left[\frac{\partial P(\phi, r, m)}{\partial \phi} \Big|_{\phi=k_p - \varepsilon} - \frac{\partial P(\phi, r, m)}{\partial \phi} \Big|_{\phi=0} \right] \\ &- v [P(1, r, m) - P(k_p, r, m)] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& + \sigma \left[\frac{\partial P(\phi, r, m)}{\partial \phi} \Big|_{\phi=1} - \frac{\partial P(\phi, r, m)}{\partial \phi} \Big|_{\phi=k_p} \right] \\
& + F(1, r, m) - v(r)Q(r, m) \\
& + \beta(r-1)(m+1)Q(r-1, m+1) - \beta(r)mQ(r, m) \\
& + \gamma[(m+1)G(r, m+1) - mG(r, m)] \\
& + \int_0^1 [\kappa(r+1)P(\phi, r+1, m-1) - \kappa(r)P(\phi, r, m)] d\phi \\
& + \kappa(r+1)Q(r+1, m-1) - \kappa(r)Q(r, m) \}.
\end{aligned} \tag{A.51}$$

Wegen der Randbedingungen (A.36) kann $P(k_p - \varepsilon, r, m)$ durch $P(k_p, r, m+1)$ ersetzt werden. Darüberhinaus erlaubt die Ausnutzung der Randbedingung (A.34) die Eliminierung von $v(r)Q(r, m)$ durch $F(0, r, m)$ in Gl. (A.51). Mit

$$F(\phi, r, m) = vP(\phi, r, m) - \sigma \frac{\partial P(\phi, r, m)}{\partial \phi}$$

ergibt sich somit

$$\begin{aligned}
\frac{dG(m)}{dt} & = \sum_{r=0}^1 \{ F(0, r, m) - F(k_p, r, m+1) + F(k_p, r, m) - F(1, r, m) \\
& + F(1, r, m) - F(0, r, m) \\
& + \beta(r-1)(m+1)Q(r-1, m+1) - \beta(r)mQ(r, m) \\
& + \gamma[(m+1)G(r, m+1) - mG(r, m)] \\
& + \int_0^1 [\kappa(r+1)P(\phi, r+1, m-1) - \kappa(r)P(\phi, r, m)] d\phi \\
& + \kappa(r+1)Q(r+1, m-1) - \kappa(r)Q(r, m) \}
\end{aligned} \tag{A.52}$$

oder

$$\begin{aligned}
\frac{dG(m)}{dt} & = \sum_{r=0}^1 \{ F(k_p, r, m) - F(k_p, r, m+1) \\
& + \beta(r-1)(m+1)Q(r-1, m+1) - \beta(r)mQ(r, m) \\
& + \gamma[(m+1)G(m+1) - mG(m)] \\
& + \int_0^1 [\kappa(r+1)P(\phi, r+1, m-1) - \kappa(r)P(\phi, r, m)] d\phi \\
& + \kappa(r+1)Q(r+1, m-1) - \kappa(r)Q(r, m) \}.
\end{aligned} \tag{A.53}$$

Der Mittelwert der freien Produktmoleküle ist durch

$$\langle m \rangle = \sum_m^{\infty} mG(m) \tag{A.54}$$

gegeben. Multipliziert man Gl. (A.53) mit m und summiert über alle m , erhält man aus Gl. (A.53)

$$\begin{aligned}
\frac{d \langle m \rangle}{dt} &= \sum_{r=0}^1 \sum_{m=0}^{\infty} [mF(k_p, r, m) - (m-1)F(k_p, r, m)] \\
&+ \sum_{r=0}^1 \sum_{m=0}^{\infty} \{ \beta(r-1)m(m-1)Q(r-1, m) - \beta(r)m^2Q(r, m) \} \\
&+ \gamma \sum_{m=0}^{\infty} [m(m-1)G(m) - m^2G(m)] \\
&+ \sum_{r=0}^1 \int_0^1 \sum_{m=0}^{\infty} [m\kappa(r+1)P(\phi, r+1, m-1) - m\kappa(r)P(\phi, r, m)] d\phi \\
&+ \sum_{r=0}^1 \sum_{m=0}^{\infty} \{ m\kappa(r+1)Q(r+1, m-1) - m\kappa(r)Q(r, m) \}.
\end{aligned}$$

Nun wird die Summation über r von $r = 0$ bis $r = 1$ ausgeführt. Zur Erinnerung sei bemerkt, daß die Variable den Wert $r = 1$ hat, falls ein regulatorisches Produktmolekül an das Enzym gebunden ist und $r = 0$, falls das nicht gilt. Deshalb ist die Dissoziationsrate $\kappa(r)$ nur für $r = 1$ von Null verschieden. Umgekehrt kann ein regulatorisches Produktmolekül nur dann an das Enzym binden, falls noch keins gebunden ist, also $r = 0$ gilt. Weiterhin wird im Folgenden noch die Schreibweise $F_0(\phi, m) = F(\phi, r = 0, m)$ bzw. $F_1(\phi, m) = F(\phi, r = 1, m)$ verwendet. Aus Gl. (A.53) ergibt sich dann

$$\begin{aligned}
\frac{d \langle m \rangle}{dt} &= \sum_{m=0}^{\infty} [mF_0(k_p, m) - (m-1)F_0(k_p, m)] \\
&+ \sum_{m=0}^{\infty} [mF_1(k_p, m) - (m-1)F_1(k_p, m)] \\
&+ \beta \sum_{m=0}^{\infty} \{ m(m-1)Q(0, m) - m^2Q(0, m) \} \\
&+ \gamma \sum_{m=0}^{\infty} [m(m-1)G(m) - m^2G(m)] \\
&+ \kappa \int_0^1 \sum_{m=0}^{\infty} [mP(\phi, r+1, m-1) - mP(\phi, r, m)] d\phi \\
&+ \kappa \sum_{m=0}^{\infty} \{ mQ(r+1, m-1) - mQ(r, m) \}.
\end{aligned}$$

Nach der Mittelwertbildung folgt daraus bei Bezeichnung des Flusses

$$f_0(\phi) = v\tilde{n}_0(\phi) - \sigma \frac{\partial \tilde{n}_0(\phi)}{\partial \phi}, \quad f_1(\phi) = v\tilde{n}_1(\phi) - \sigma \frac{\partial \tilde{n}_1(\phi)}{\partial \phi}$$

der Konzentrationsdichten \tilde{n}_0 und \tilde{n}_1 der Enzyme ohne bzw. mit gebundenem Produktmolekül die folgende Gleichung

$$\frac{d \langle m \rangle}{dt} = f_0(k_p) + f_1(k_p) - \beta \langle m \rangle n_0 - \gamma \langle m \rangle + \kappa \int_0^1 \tilde{n}_1 d\phi + \kappa n_1. \quad (\text{A.55})$$

Die Gleichungen (A.40), (A.41), (A.48), (A.49) und (A.55) bilden zusammen mit den zugehörigen Randbedingungen (A.42)-(A.45) die gesuchte Meanfield-Näherung.

Literaturverzeichnis

- [1] I.M. Lifshitz, A.Yu. Grosberg, und Khokhlov A.R. Some problems of the statistical physics of polymer chains with volume interaction. *Rev. Mod. Phys.*, 50:683, 1978.
- [2] B. Alberts. The cell as a collection of protein machines: Preparing the next generation of molecular biologists. *Cell*, 92:291, 1998.
- [3] R.F. Service. Exploring the system of life. *Science*, 284:80, 1999.
- [4] J.S. Nicolis. *Dynamics of Hierarchical Systems*. Springer-Verlag, 1986.
- [5] E. Schrödinger. *What is Life?* Cambridge University Press, 1944.
- [6] H. Haken. *Laser Theory*. Springer-Verlag, 1970.
- [7] H. Haken. Cooperative phenomena in systems far from thermal equilibrium and in nonphysical systems. *Rev. Mod. Phys.*, 47:67, 1975.
- [8] H. Bénard. Les tourbillons cellulaires dans une nappe liquide transportent de la chaleur par convection en regime permanent. *Ann. Chim. Phys.*, 23:62, 1902.
- [9] S. Chandrasekhar. *Hydrodynamic and Hydromagnetic Stability*. Oxford University Press, 1961.
- [10] A.N. Zaikin und A.M. Zhabotinsky. Concentration wave propagation in two-dimensional liquid-phase self-oscillating system. *Nature*, 225:535, 1970.
- [11] A.M. Zhabotinsky und A.N. Zaikin. Autowave processes in a distributed chemical system. *J. theor. Biol.*, 40:45, 1973.
- [12] W. Ebeling. *Strukturbildung bei irreversiblen Prozessen*. BSB B.G. Teubner Verlagsges., 1976.

-
- [13] P. Glansdorff und I. Prigogine. *Thermodynamic Theory of Structure, Stability, and Fluctuations*. Wiley, 1971.
- [14] H. Haken. *Advanced Synergetics*. Springer-Verlag, 1983.
- [15] J.S. Nicolis und I. Prigogine. *Self-Organization in Nonequilibrium Systems*. Wiley, 1977.
- [16] W. Ebeling und Feistel R. *Physik der Selbstorganisation und Evolution*. Akademie-Verlag, 1982.
- [17] L.F. Jaffe. The path of calcium in cytosolic calcium oscillations: a unifying hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9883, 1991.
- [18] J. Lechleiter, S. Girard, E. Peralta, und D. Clapham. Spiral calcium wave propagation and annihilation in *xenopus laevis* oocytes. *Science*, 252:123, 1991.
- [19] B. Chance, R.W. Estabrook, und Gosh A. Damped sinusoidal oscillations of cytoplasmatic reduced pyridine nucleotide in yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 51:175, 1964.
- [20] B. Hess. Periodic patterns in biochemical reactions. *Quart. Rev. Biophys.*, 30:121, 1997.
- [21] A. Goldbeter. *Biochemical Oscillations and Cellular Rhythms*. Cambridge University Press, 1996.
- [22] B. Hess und A.S. Mikhailov. Self-organisation in living cells. *Science*, 264:223, 1994.
- [23] B. Hess und A.S. Mikhailov. Self-organisation in living cells. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 98:1198, 1994.
- [24] B. Hess und A.S. Mikhailov. Microscopic self-organisation in living cells: a study of time matching. *J. theor. Biol.*, 176:181, 1995.
- [25] A.S. Mikhailov. *Foundations of Synergetics I*. Springer-Verlag, 1990.
- [26] A.S. Mikhailov und B. Hess. Microscopic self-organization of enzymatic reactions in small volumes. *J. Phys. Chem.*, 100:19059, 1996.
- [27] D. Bray. Protein molecules as computational elements in living cells. *Nature*, 376:307, 1995.

- [28] M.B. Elowitz und S. Leibler. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 403:335, 2000.
- [29] L.A. Blumenfeld und A.N. Tikhonov. *Biophysical thermodynamics of intracellular processes*. Springer-Verlag, 1994.
- [30] S. Subbiah. *Protein Motions*. Springer-Verlag, 1996.
- [31] M. Eigen und R. Rigler. Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:5740, 1994.
- [32] G.A. Petsko. The little big bang. *Nature*, 371:740, 1994.
- [33] I. Schlichting, J. Berendzen, G.N. Phillips, und R.M. Sweet. Crystal structure of photolyzed carbonmonoxy-myoglobin. *Nature*, 371:808, 1994.
- [34] S. Weiss. Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science*, 283:5408, 1999.
- [35] A. Ishijima, H. Kojima, T. Funatsu, M. Tokunaga, H. Higuchi, M. Tanaka, und T. Yanagida. Simultaneous observation of individual atpase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin. *Cell*, 92:161, 1998.
- [36] H.P. Lu, X. Luying, und X.S. Xie. Single-molecule enzymatic dynamics. *Science*, 282:1877, 1998.
- [37] D.T. Chiu, F.W. Clyde, F. Ryttsen, und et al. Chemical transformations in individual ultrasmall biomimetic containers. *Science*, 283:1892, 1999.
- [38] M. Whitaker. Fluorescent tags of protein function in living cells. *Bioessays*, 22:180, 2000.
- [39] H. Gruler und D. Müller-Enoch. Slaving the cytochrome p-450 dependent monooxygenase system by periodically applied light pulses. *Eur. Biophys. J.*, 19:217, 1991.
- [40] W. Häberle, H. Gruler, Ph. Dutkowski, und D. Müller-Enoch. The activation of the cytochrome p-450 dependent monooxygenase system by light. *Z. Naturforsch.*, 45:237, 1990.
- [41] H. Schienbein M., Gruler. Enzyme kinetics, self-organized molecular machines, and parametric resonance. *Phys. Rev. E*, 56:7116, 1997.

-
- [42] I. Derenyi und Astumian D.R. Spontaneous onset of coherence and energy storage by membrane transporters in an rlc electric circuit. *Phys. Rev. L*, 80:4602, 1998.
- [43] H. Malchow und L. Schimansky-Geier. *Noise and Diffusion in Bistable Nonequilibrium Systems*. Teubner, 1985.
- [44] M. Markus, S.C. Müller, und G. Nicolis. *From Chemical to Biological Organization*. Springer-Verlag, 1988.
- [45] S.C. Müller und T. Plesser. Spiral wave dynamics. In R. Kapral und K. Showalter, editors, *Chemical Waves and Patterns*, pages 57–92. Kluwer, 1995.
- [46] L. Rayleigh. On the dynamics of evolving fluids. *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, 93:148, 1916.
- [47] H.L. Swinney und J.P. Gollub. *Hydrodynamic Instabilities and the Transition to Turbulence*. Springer, 1981.
- [48] M. Sargent, M. O. Scully, und Jr. Lamb, W.E. *Laser Physics*. Addison-Wesley, 1974.
- [49] H. Haken. *Synergetics: An Introduction*. Springer-Verlag, 1978.
- [50] A.S. Mikhailov und A. Yu. Loskutov. *Foundations of Synergetics II*. Springer-Verlag, 1991.
- [51] B. Hess und A. Boiteux. Oscillatory phenomena in biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.*, 40:237, 1971.
- [52] T. Mair und S. C. Müller. Traveling NADH and proton waves during oscillatory glycolysis in vitro. *J. Biol. Chem.*, 271:627, 1996.
- [53] L.F. Olsen und H. Degn. Chaos in an enzyme reaction. *Nature*, 267:177, 1977.
- [54] L.F. Olsen und H. Degn. Oscillatory kinetics of the peroxidase-oxidase reaction in an open system. experimental and theoretical studies. *Biochim. Biophys. Acta*, 523:165, 1978.
- [55] V.I. Arnol'd. *Mathematische Methoden der klassischen Mechanik*. Birkhäuser Verlag, 1988.
- [56] W. Thirring. *Lehrbuch der mathematischen Physik Band 1: Klassische Dynamische Systeme*. Springer Verlag, 1988.

- [57] J. Guckenheimer und P. Holmes. *Nonlinear Oscillations, Dynamical Systems, and Bifurcations of Vector Fields*. Springer Verlag, 1983.
- [58] G. Jetschke. *Mathematik der Selbstorganisation*. Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1989.
- [59] H.G. Schuster. *Deterministic Chaos: An Introduction*. VCH, 1989.
- [60] W. Ebeling, H. Engel, und H. Herzel. *Selbstorganisation in der Zeit*. Akademie-Verlag, 1990.
- [61] M.C Cross und Hohenberg P.C. Pattern formation outside of equilibrium. *Rev. Mod. Phys.*, 65:851, 1993.
- [62] J.P. Gollub und J.S. Langer. Pattern formation in nonequilibrium physics. *Rev. Mod. Phys.*, 71:S396, 1999.
- [63] D. Walgraef. *Spatio-Temporal Pattern Formation*. Springer-Verlag, 1996.
- [64] P.C. Matthews, R.E. Mirollo, und S.H. Strogatz. Dynamics of a large system of coupled nonlinear oscillators. *Physica D*, 52:293, 1991.
- [65] O.A. Druzhinin und A.S. Mikhailov. Chaos and synchronization in an ensemble of probabilistic cellular automata. *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii, Radiofizika*, 32:444, 1989.
- [66] S. Wolfram. Universality and complexity in cellular automata. *Physica D*, 10:1, 1984.
- [67] K. Kaneko. Chaotic but regular posi-nega switch among coded attractors by cluster-size variation. *Phys. Rev. Lett.*, 63:219, 1989.
- [68] K. Kaneko. Clustering, coding, switching, hierarchical ordering, and control in a network of chaotic elements. *Physica D*, 41:137, 1990.
- [69] S.C Manrubia und A.S. Mikhailov. Mutual synchronization and clustering in randomly coupled chaotic dynamical networks. *Phys. Rev. E*, 60:1579, 1999.
- [70] J.A. Acebron und R. Spigler. Adaptive frequency model for phase-frequency synchronisation in large populations of globally coupled nonlinear oscillators. *Phys. Rev. Lett.*, 81:2229, 1998.
- [71] S. Bottani. Synchronization of integrate and fire oscillators with global coupling. *Phys. Rev. E*, 54:2334, 1996.

-
- [72] J.D. Crawford und K.T.R. Davies. Synchronization of globally coupled phase oscillators: singularities and scaling for general couplings. *Physica D*, 125:1, 1999.
- [73] D. Golomb, D. Hansel, B. Shraiman, und H. Sompolinsky. Clustering in globally coupled phase oscillators. *Phys. Rev. A*, 45:3516, 1992.
- [74] P.C. Matthews und S.H. Strogatz. Phase diagram for the collective behavior of limit-cycle oscillators. *Phys. Rev. Lett.*, 65:1701, 1990.
- [75] S.H. Strogatz, R.E. Mirollo, und P.C. Matthews. Coupled nonlinear oscillators below the synchronization threshold: Relaxation by generalized Landau damping. *Phys. Rev. Lett.*, 68:2730, 1992.
- [76] J.W. Swift, S.H. Strogatz, und K. Wiesenfeld. Averaging of globally coupled oscillators. *Physics D*, 55:239, 1992.
- [77] P. Tass. Phase and frequency shifts in a population of phase oscillators. *Phys. Rev. E*, 56:2043, 1997.
- [78] K.Y. Tsang und K.L. Ngai. Relaxation in interacting arrays of oscillators. *Phys. Rev. E*, 54:R3067, 1996.
- [79] S. Watanabe und S.H. Strogatz. Integrability of a globally coupled oscillator array. *Phys. Rev. Lett.*, 68:2730, 1992.
- [80] M.K.S. Yeung und S.H. Strogatz. Time delay in the Kuramoto model of coupled oscillators. *Phys. Rev. Lett.*, 82:648, 1999.
- [81] H.D.I. Abarbanel, M.I. Rabinovich, A. Selverston, M.V. Bazhenov, R. Huerta, M.M. Sushchik, und L.L. Rubinskii. Synchronisation in neural networks. *Physics-Uspekhi*, 39:337, 1996.
- [82] T. Aonishi, K. Kurata, und M. Okada. Statistical mechanics of an oscillator associative memory with scattered natural frequencies. *Phys. Rev. Lett.*, 82:2800, 1999.
- [83] C. Kurrer und K. Schulten. Noise-induced synchronous neuronal oscillations. *Phys. Rev. E*, 51:6213, 1995.
- [84] H. Treutlein und K. Schulten. Noise-induced neural impulses. *Eur. Biophys. J.*, 13:355, 1986.
- [85] Y. Kuramoto. *Chemical Oscillations, Waves and Turbulence*. Springer-Verlag, 1984.

- [86] A. Andronov, A. Witt, und S. Khaykin. *Theory of Oscillations*. Pergamon Press, 1966.
- [87] L. Glass und M.C. Mackey. *From Clocks to Chaos. The Rhythms of Life*. Princeton Univ. Press, 1988.
- [88] A.T. Winfree. *The Geometry of Biological Time*. Springer-Verlag, 1980.
- [89] I.I. Blekhman. *Synchronization in Science and Technology*. ASME Press, 1988.
- [90] P. Hadley, M.R. Beasley, und K. Wiesenfeld. Phase-locking of josephson-junction series arrays. *Phys. Rev. B*, 38:8712, 1988.
- [91] Y. Soen, N. Cohen, D. Lipson, und E. Braun. Emergence of spontaneous rhythms disorders in self-assembled networks of heart cells. *Phys. Rev. Lett.*, 82:3556, 1999.
- [92] J. Wolf und R. Heinrich. Dynamics of two-component biochemical systems in interacting cells; synchronization and desynchronization of oscillations and multiple steady states. *Biosystems*, 43:1, 1997.
- [93] J. Wolf und R. Heinrich. Effect of cellular interaction on glycolytic oscillations in yeast: theoretical investigation. *Biochemical J.*, 345:321, 2000.
- [94] J. Buck und E. Buck. Synchronous fireflies. *Sci. Am.*, 234:74, 1976.
- [95] R.L. Stratonovich. *Topics in the Theory of Random Noise. Vol. 2*. Gordon and Breach, 1967.
- [96] R.W. Tegeder. Large assemblies of stochastic oscillators. *Proc. R. Lond. A*, 452:1, 1996.
- [97] P. Tass, M.G. Rosenblum, Weule J., J. Kurths, A. Pikovsky, J. Volkman, A. Schnitzler, und H.J. Freund. Detection of n:m phase locking from noisy data: Applications to magnetoencephalography. *Phys. Rev. Lett.*, 81:3291, 1998.
- [98] C. Schäfer, M. Rosenblum, J. Kurths, und H. Abel. Heartbeat synchronized with ventilation. *Nature*, 392:239, 1998.
- [99] A. Neiman, A. Silchenko, V. Anishchenko, und L. Schimansky-Geier. Stochastic resonance: Noise-enhanced phase coherence. *Phys. Rev. E*, 58:7118, 1998.

-
- [100] L. Gammaitoni, P. Hänggi, und P. Jung. Stochastic resonance. *Rev. Mod. Phys.*, 70:223, 1998.
- [101] A. Neiman, L. Schimansky-Geier, und F. Moss. Linear response theory applied to stochastic resonance in models of ensembles of oscillators. *Phys. Rev. E*, 56:R9, 1997.
- [102] A. Neiman, L. Schimansky-Geier, F. Moss, B. Shulgin, und Collins J.J. Synchronization of noisy systems by stochastic signals. *Phys. Rev. E*, 60:284, 1999.
- [103] U. Siewert und L. Schimansky-Geier. Analytical study of coupled two-state stochastic resonators. *Phys. Rev. E*, 58:2843, 1998.
- [104] B. Lindner und L. Schimansky-Geier. Analytical approach to the stochastic fitzhugh-nagumo system and coherence resonance. *Phys. Rev. E*, 60:7270, 1999.
- [105] A. Neiman, L. Schimansky-Geier, A. Cornell-Bell, und F. Moss. Noise-enhanced phase synchronization in excitable media. *Phys. Rev. Lett.*, 83:4896, 1999.
- [106] J. Pikovsky, A.S. Kurths. Coherence resonance in a noise-driven excitable system. *Phys. Rev. Lett.*, 78:775, 1997.
- [107] S. Kim, Park S.H., und Ryu C.S. Noise-induced transitions in coupled oscillator systems with a pinning force. *Phys. Rev. E*, 54:6042, 1996.
- [108] S. Kim, Park S.H., und Pyo H.B. Stochastic resonance in coupled oscillator systems with time delay. *Phys. Rev. Lett.*, 82:1620, 1999.
- [109] S.H. Park und S. Kim. Noise-induced phase transitions in globally coupled active rotators. *Phys. Rev. E*, 53:3425, 1996.
- [110] W.J. Rappel und S.H. Strogatz. Stochastic resonance in an autonomous system with nonuniform limit cycle. *Phys. Rev. E*, 50:3249, 1994.
- [111] U. Ernst, K. Pawelzik, und T. Geisel. Synchronization induced by temporal delays in pulse-coupled oscillators. *Phys. Rev. Lett.*, 74:1570, 1995.
- [112] U. Ernst, K. Pawelzik, und T. Geisel. Delay-induced multistable synchronization of biological oscillators. *Phys. Rev. E*, 57:2150, 1998.
- [113] D.V.R. Reddy, A. Sen, und G.L. Johnston. Time delay induced death in coupled limit cycle oscillators. *Phys. Rev. Lett.*, 80:5109, 1998.

- [114] S.H. Strogatz. Death by delay. *Nature*, 394:316, 1998.
- [115] L. Stryer. *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, 1995.
- [116] R.A. Van Santen und J.W. Niemantsvedriet. *Chemical Kinetics and Catalysis*. Plenum Pub Corp, 1995.
- [117] T. Ackermann. *Physikalische Biochemie*. Springer Verlag, 1992.
- [118] K.D. Janda, L.C. Lo, M.M. Sim, R. Wang, C.H. Wong, und R.A. Lerner. Chemical selection for catalysis in combinatorial antibody libraries. *Science*, 275:945, 1997.
- [119] T.S. Wade, H. Scanlan. The structural and functional basis of antibody catalysis. *Annu. Rev. of Biophys. Biomol. Struct.*, 26:461, 1997.
- [120] R. Kleemann, R. Mischke, A. Kapurniotu, H. Brunner, und J. Bernhagen. Specific reduction of insulin disulfides by macrophage migration inhibitory factor (mif) with glutathione and dihydrolipoamide: potential role in redox processes. *FEBS LETTERS*, 430:191, 1998.
- [121] E. Gawlita I. Auzat und J.-R. Garel. Slow ligand-induced transitions in the allosteric pfk from e-coli. *J. Mol. Biol.*, 249:478, 1995.
- [122] Römpp. *Lexikon Chemie*. Georg-Thieme Verlag, 1999.
- [123] P.H. Albertus, J. Schening, Jeffrey H., und et.al. A supramolecular cytochrome p450 mimic. *Chem. Eur. J.*, 5:871, 1998.
- [124] P.H. Albertus, J. Schening, H. Jeffrey, und et.al. Enzyme mimic displaying oscillatory behavior. Oscillating reduction of manganese (iii) porphyrin in a membrane-bound cytochrome p-450 model system. *J. Am. Chem. Soc.*, 117:12655, 1995.
- [125] A Fersht. *Enzyme Structure and Mechanism*. Freeman, 1985.
- [126] A.A Frost und R.G. Pearson. *Kinetics and mechanism*. Wiley, 1961.
- [127] H.P. Kleber und Schlee D. *Teil 1. Allgemeine und funktionelle Biochemie*. Gustav Fischer Verlag, 1987.
- [128] J.D. Bryngelson, J.N. Onuchic, N.D. Socci, und P.G. Wolynes. Funnels, pathways, and energy landscape of protein-folding - a synthesis. *Proteins*, 21:167, 1995.

-
- [129] T.E. Creighton. *Proteins, Structure and Molecular Properties*. Freeman, 1984.
- [130] P.E. Leopold, M. Montal, und Onuchic J.N. Protein folding funnels - a kinetic approach to the sequence structure relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:8721, 1992.
- [131] J.J Portman, S. Takada, und P.G. Wolynes. Variational theory for site resolved protein folding free energy surfaces. *Phys. Rev. Lett.*, 81:5237, 1998.
- [132] M. Karplus und J.A. McCammon. Dynamics of proteins - elements and function. *Ann. Rev. Biochem.*, 53:263, 1983.
- [133] V. Reat, H. Patzelt, M. Ferrand, C. Pfister, D. Oesterhelt, und G. Zaccai. Dynamics of different functional parts of bacteriorhodopsin: H-h-2 labeling and neutron scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:4970, 1998.
- [134] H. Frauenfelder und B. McMahon. Dynamics and function of proteins: The search for general concepts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:4795, 1998.
- [135] T. Lazaridis, D.J. Tobias, Brooks C.L., und Paulaitis M.E. Reaction paths and free energy profiles of conformational transitions: An internal coordinate approach. *J. Chem. Phys.*, 95:7612, 1991.
- [136] N.D. Socci, J.N. Onuchic, und P.G. Wolynes. Diffusive dynamics of the reaction coordinate for protein folding funnels. *J. Chem. Phys.*, 104:5860, 1996.
- [137] M. Kurzynski. A synthetic picture of intramolecular dynamics of proteins. towards a contemporary statistical theory of biochemical processes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 69:23, 1998.
- [138] M. Cieplak, M. Henkel, J. Karbowski, und J.R. Banavar. Master equation approach to protein folding and kinetics traps. *Phys. Rev. Lett.*, 80:3654, 1998.
- [139] C. Micheletti, J.R. Banavar, A. Maritan, und F. Seno. Protein structures and optimal folding from a geometrical variational principle. *Phys. Rev. Lett.*, 82:3372, 1999.
- [140] L.A. Blumenfeld. The physical aspects of enzyme functioning. *J. Theor. Biol.*, 58:269, 1976.
- [141] L.A. Blumenfeld. *Probleme der molekularen Biophysik*. Akademie-Verlag, 1977.

- [142] N.P. Sidorenko und V.I. Descherevsky. Generalized form of kinetic equations of enzymatic catalysis from the calculation of protein macromolecular relaxation. *Biofizika*, 15:785, 1970.
- [143] J.P. Changeux. The nicotinic acetylcholine receptor: A model of allosteric membrane protein. Implications in cognitive learning and reward. *Talk at the 33rd Winter Seminar on Molecular Biology and biophysical Chemistry of the Cell*, 1998.
- [144] J. Monod, J. Wyman, und J.P. Changeux. On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.*, 12:88, 1965.
- [145] J. Lasch. *Enzymkinetik*. Springer Verlag, 1987.
- [146] A. Schellenberger (Hrsg.). *Enzymkatalyse*. Springer-Verlag, 1989.
- [147] Y. Shirakihara und P.R. Evans. Crystal structure of the complex of phosphofructokinase from escherichia coli with its reaction products. *J. Mol. Biol.*, 204:973, 1988.
- [148] T. Schirmer und P.R. Evans. Structural basis of the allosteric behaviour of phosphofructokinase. *Nature*, 343:140, 1990.
- [149] Jr. Koshland, D.E. Nemethy, und D. Filmer. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry*, 5:365, 1966.
- [150] M. Eigen. *Nobel Symp.*, 5:333, 1967.
- [151] M.F. Perutz. Cooperativity and allosteric regulation in proteins. *Quart. Rev. Biophys.*, 22:139, 1989.
- [152] H. Gutfreund. *Kinetics for the live sciences*. Cambridge University Press, 1995.
- [153] L.A. Blumenfeld und P.G. Pleshanov. Study of single cycles of the direct and back enzyme reactions catalyzed by malatedehydrogenase. In A. Ehrenberg, A. Graslund, und L. Nilsson, editors, *Structure, Dynamics, and Function of Biomolecules*, pages 171–175. Springer, 1986.
- [154] L.A. Blumenfeld und P.G. Pleshanov. Single cycles of the forward and back enzymatic reaction as illustrated by malic dehydrogenase. *Biophysics*, 31:826, 1986.

-
- [155] V.B. Polyakov, N.N. Kharlashina, und E.M. Galimov. Similarity of the states of an enzyme complex in forward and back reactions and the duration of the intrinsic fluorescence of protein. *Biophysics*, 35:161, 1990.
- [156] L.A. Blumenfeld und P.G. Pleshanov. Concordance of the states of the enzymatic complex in forward and back reactions and the duration of the intrinsic fluorescence of protein. *Biophysics*, 35:167, 1990.
- [157] D. Müller-Enoch und H. Gruler. The activation of the cytochrome p-450 dependent monooxygenase system by light. *Z. Naturforschung*, 41:604, 1986.
- [158] H. Frauenfelder, S.G. Sligar, und P.G. Wolynes. The energy landscapes and motions of proteins. *Science*, 254:1588, 1991.
- [159] H. Frauenfelder, P.G. Wolynes, und R.H. Austin. Biological physics. *Rev. Mod. Physics*, 71:S419, 1999.
- [160] C.D. Sfatos und E.I. Shakhnovich. Statistical mechanics of random heteropolymers. *Physics Reports*, 288:77, 1997.
- [161] J. Wang, J. Onuchic, und P. G. Wolynes. Statistics of kinetic pathways on biased rough energy landscapes with applications to protein folding. *Phys. Rev. Lett.*, 76:4861, 1996.
- [162] C. Levinthal. How to fold graciously. In D. Debrunner, J.C.M. Tsibris, und E. Münck, editors, *Mössbauer Spectroscopy in Biological Systems*. University of Illinois Press, 1969.
- [163] V.S. Pande, A.Yu. Grosberg, und T. Tanaka. Heteropolymer freezing and design: Towards physical models of protein folding. *Rev. Mod. Phys.*, 72:259, 2000.
- [164] J.D. Bryngelson und P.G. Wolynes. Spin glasses and the statistical mechanics of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7524, 1987.
- [165] Fersht. Nucleation mechanism in protein-folding. *Current Opinion in Structural Biology*, 7:3, 1997.
- [166] L.A. Lehninger. *Biochemie*. Verlag Chemie, 1977.
- [167] H.C. Berg. *Random Walks in Biology*. Princeton Univ. Press, 1983.
- [168] M. v. Smoluchovski. Drei Vorträge über Diffusion, Brownsche Molekularbewegung und Koagulation von Kolloidteilchen. *Phys Z.*, 17:557, 1916.

- [169] P. Stange, D.H. Zanette, A.S. Mikhailov, und B. Hess. Self-organizing molecular networks. *Biophysical Chemistry*, 72:73, 1998.
- [170] P. Stange, A.S. Mikhailov, und B. Hess. Mutual synchronisation of molecular turnover cycles in allosteric enzymes. *J. Phys. Chem.*, 102:6273, 1998.
- [171] G.E. Briggs und J.B. Haldane. A note on the kinetics of enzyme action. *Biochem. J.*, 19:338, 1925.
- [172] A.J. Brown. Enzyme action. *J. Chem. Soc.*, 81:373, 1902.
- [173] L. Michaelis und M.L. Menten. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.*, 49:333, 1913.
- [174] D.D. van Slyke und G.E. Cullen. The mode of action of urease and of enzymes in general. *J. Biol. Chem.*, 19:141, 1914.
- [175] S. Wolfram. Automata theory. *Rev. Mod. Phys.*, 55:601, 1983.
- [176] N. Wiener und A. Rosenblueth. The mathematical formulation of the problem of conduction of impulses in a network of connected excitable elements, specifically in cardiac muscle. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.*, 16:205, 1946.
- [177] M. Markus und B. Hess. Isotropic cellular automaton for modeling excitable media. *Nature*, 347:56, 1990.
- [178] C.W. Gardiner. *Handbook of stochastic methods*. Springer-Verlag, 1983.
- [179] H. Risken. *The Fokker-Planck equation*. Springer-Verlag, 1989.
- [180] J. Honerkamp. *Stochastische Dynamische Systeme*. VCH Verlagsgesellschaft, 1990.
- [181] N.G. van Kampen. *Stochastic processes in physics and chemistry*. North-Holland Publishing Company, 1981.
- [182] C.R. Garibotti, M.L. Martiarena, und D.H. Zanette. Singularities in the nonisotropic Boltzmann equation. *Physica A*, 165:361, 1990.
- [183] J. Hale und V. Lunel. *Introduction to Functional Differential Equations*. Springer-Verlag, 1993.
- [184] R.D. Driver. *Ordinary and Delay Differential Equations*. Springer, 1977.
- [185] V.B. Kolmanovskii und V.R. Nosov. *Stability of Functional Differential Equations*. Academic Press, 1986.

- [186] V.B. Kolmanovskii und A. Myshkis. *Applied Theoriy of Functional Differential Equations*. Kluwer Academic Publishers, 1992.
- [187] C. Mariott, R. Vallee, und C. Delisle. Analysis of a first-order delay differential-delay equation containing two delays. *Phys. Rev. E*, 40:3420, 1989.
- [188] J.D. Murray. *Mathematical Biology*. Springer, 1990.
- [189] R. Valley und C. C. Marriott. Analysis of an nth-order nonlinear differential-delay equation. *Phys. Rev. A*, 39:197, 1989.
- [190] P. Stange, A.S. Mikhailov, und B. Hess. Mutual synchronisation of molecular turnover cycles in allosteric enzmes ii. inhibition. *J. Phys. Chem.*, 103:6111, 1999.
- [191] P. Stange, A.S. Mikhailov, und B. Hess. Coherent intramolecular dynamics of enzymic reaction loops in small volumes. *J. Phys. Chem.*, 104:1844, 2000.

Index

- α -Chymotrypsin, 18
- Acetylcholinesterase, 18
- Adlergleichung, 56, 57
- Aktivierung, 19, 22, 42, 93, 121
 - allosterische, 23–25, 47, 48, 50, 51, 55, 86, 89, 120
 - kovalente Modifikation, 23
- Algorithmus
 - kontinuierliches Modell Produktinhibierung, 95–97
 - kontinuierliches Modell Reaktionsketten, 128–129, 131
 - kontinuierliches Modell, Produktaktivierung, 56
 - numerische Lösung Mean-field-Gl., 83, 109
 - zeitdiskretes Modell, 43
- Alles-oder-Nichts-Modell, *siehe* Symmetriemodell
- Allosterie, 22, 25
 - heterotrope Regulation, 24
 - homotrope Regulation, 24
- Antikörper
 - katalytische, 17
- Archaea, 31
- Automaten, 13, 42
- Automatenmodell, 39, 44, 53, 56, 61, 83
- Belousov-Zhabotinsky-Reaktion, 6, 8, 9
- Bindungsrate, 64, 65, 89, 132
- Bindungsstelle
 - enzymatische, 33
- Brownsche Molekularbewegung, 8, 32, 33
- Carboanhydrase, 18
- Chapman-Kolmogorov-Gleichung, 150
- charakteristische Gleichung, 86, 111, 142
- Cytochrom-P-450-System, 7, 28–30
- Differentialgleichung
 - mit Zeit-delay, 82, 107
 - stochastische, 55
- Diffusions-Drift-Prozeß, 21, 26, 30, 41, 54
- diskrete Abbildungen, 13
- Dissoziation, 125
 - des *ES*-Komplexes, 20
 - Reaktionsprodukt, 40
 - regulatorisches Molekül, 44, 92, 93, 101–107, 112, 113, 115, 116, 118, 120
 - Substratmolekül, 95
- Durchmischung, 26
 - diffusive, 6, 8, 31, 80
- Durchmischungszeit, 31–33
- dynamische Systeme, 12
- Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie, 6
- Enzym-Substrat-Komplex, 20, 42
- Enzymanzahl
 - Erhaltungsgröße, 107
- Enzyme

- allosterische, 23
- Masse, 17
- regulatorische, 22–25
- Spezifität, 19
- synthetische, 19
- Temperatur, 18
- Wechselzahl, 18
- Enzymgruppen, 44, 48–52, 62, 63, 65, 66, 68, 69, 87–91, 121–123, 134
- Enzymzyklus
 - molekularer, 6, 7, 9, 20, 43, 45, 51, 94, 125, 126
- Eukaryonten, 31
- Fixpunkt, 83, 90, 91, 110, 121, 140–143
- Fluktuationen, 7, 14, 40, 47, 52–54, 61, 63, 70, 80, 81, 95, 100, 106, 109, 116, 119, 128, 129, 132–134, 138, 140
- Fokker-Planck-Gleichung, 32, 55, 127, 153, 154
 - adjungierte, 58
- Funktionaldifferentialgleichung, 82
- Glykolyse, 12
- Grundzustand, 13, 19, 20, 43, 45, 62, 155
- Hopf-Bifurkation, 86, 91, 140
 - subkritische, 90
 - superkritische, 90
- HR-Peroxidasereaktionen, 12
- Hysterese, 90
- Hämoglobin, 24
- Inhibierung, 19, 22
 - allosterische, 22–25
 - irreversible, 22
 - kompetitive, 22, 23
 - nicht-kompetitive, 22
 - reversible, 22
 - unkompetitive, 22
- Katalyse
 - heterogene, 17
 - homogene, 17
 - mikroheterogene, 17
- Koagulationsprozeß, 33
- Koeffizientenmatrix, 142
- Kohärenz, 12
- Konformation
 - stabile, 23
- Konformationsänderungen, 6, 16, 21, 25–28, 30, 40, 41, 119
- Konvektionsinstabilitäten, 6, 9
- Kopplung, 39, 47, 57, 75, 92, 149
 - globale, 56, 57
 - mit Zeitverzögerung, 15
- Korrelationsfunktion, 127
- Korrelationslänge, 36, 40
- Kuramoto-Modell, 56
- Lactat-Dehydrogenase, 18
- Laser, 6, 10–12
- Levinthal-Paradoxon, 30
- Lysozym, 18
- Malatdehydrogenase, 26
- Markovprozeß, 149
- Mastergleichung, 70, 152
 - N* Enzyme, 74
 - einzelnes Enzym, 70
 - Produktinhibierung, 103
- mean-first-passage time, 58
- Meanfield-Gleichungen, 75
 - Produktaktivierung, 73, 76, 79, 80
 - Produktinhibierung, 92, 103, 105, 107, 115, 120, 154, 156, 157, 161
 - Reaktionsketten, 124, 137, 140
- Mikroreaktor, 6, 31, 36

- Mikroreaktoren, 119
 Mikroreaktors, 16, 31, 40
 Multienzymkomplexe, 18
 Musterbildung, 8, 13, 31
- Netzwerk
 molekulares, 9, 17, 36–38, 42,
 45, 51, 92, 124
- Neuronale Netze, 13, 42
- Ordnungsparameter
 Synchronisationsstärke, 62, 67–
 69, 100–102, 116–119, 133,
 134, 146, 147
- Oszillatoren, 12
 gekoppelte, 13
- Penicillinase, 18
- Phasendifferenz
 Diffusion der, 14
 Wahrscheinlichkeitsverteilung,
 14, 61–63, 98, 100
- Phasenoszillatoren, 12, 14
- Phosphofruktokinase, 18, 24
- Poissonverteilung, 47, 153
- principle of minimal frustration, 30
- Produktmolekül, 42
 Abbau, 43
 Abbaurrate, 65
 Bindung, 42, 75, 124, 125
 Freisetzung, 43, 51
 mittlere Lebensdauer, 46
- Prokaryonten, 31
- Quasi-Polynom, 86, 142
- R-Zustand, 23–25
- Rauschen
 Gaussches, 57
- Rauschintensität, 64
- Reaktions-Diffusions-System, 31
- Reaktionsketten, 124
- Reaktionskoordinate, 19, 41, 51, 54
- Reaktionsmodus
 asynchroner, 46, 47, 50, 98, 129
 synchroner, 49, 50, 98, 133
- Relaxationskinetik, 26
- Relaxationskonzept, 21
- Relaxationsprozeß, 45, 94, 104, 126,
 127, 138
- Ribonuklease, 17
- Ribozyme, 17
- Ribulose 1,5-
 bisphosphat carboxylase,
 17
- Röntgenspektroskopie
 zeitaufgeloste, 6
- Röntgenspektroskopie, 30
- Selbstorganisation
 dispersive, 9
 dissipative, 9
 konservative, 9
 makroskopische, 7–12
 mikroskopische, 7–12
 Prinzipien der, 9
- sequentiellles Modell, 25
- Skaleninvarianz, 67, 91
- Spiking, 48, 51, 98, 102, 109–112,
 117, 119, 130–133, 140, 144
 Schwankungsbreite der
 Turnover-Zeit, 133
- Stabilitätsanalyse, 85
- Substratmolekül
 Abbau, 132
 Bindung, 40, 43, 45, 55, 57, 65,
 71–73, 87, 125, 126, 129,
 131, 135, 137, 138, 144
 Zufuhr, 132
- Symmetriemodell, 24
- Synchronisation, 7, 9, 44, 61
 deterministische Systeme, 14
 Enzymzustände, 15
 externe, 28

- interne, 39
- stochastische Systeme, 14
- Stärke der, 61

- T-Zustand, 23–25
- thermodynamische Zustandsgrößen,
10
- thermodynamisches Gleichgewicht,
5, 10
- lokal, 10
- Traffic-Zeit, 33
- Transient, 49, 50
- Transit-Zeit, 31
- transition state theory, 19
- Tryptophan-Synthetase, 18
- Turnover-Zahl, 18
- Turnover-Zeit, 18, 26, 57
 - Schwankungsbreite, 29, 58, 60,
66, 68, 69, 98, 100, 101,
116–119, 127, 129, 133–
135, 140, 144

- Van-der-Pol-Oszillators, 57

- Wahrscheinlichkeitsverteilung
 - stationäre, 47, 149
- Wechselzahl, *siehe* Turnover-Zahl
- Weglänge
 - mittlere freie, 8

- Zellkompartiment, 31
- Zytokine, 17

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Mikhailov und Herrn Prof. Dr. Hess für die ausgezeichnete wissenschaftliche Förderung und Betreuung während der letzten Jahre bedanken. Besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Ertl und Herrn Prof. Dr. Müller für deren Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt der „Peter und Traudl Engelhorn-Stiftung zur Förderung der Biotechnologie und Gentechnik“ als deren Stipendiat ich die Möglichkeit hatte, diese Arbeit durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Holzwarth und Herrn Dr. Kositzka danke ich für die tatkräftige Hilfe bei den experimentellen Arbeiten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei den jetzigen und früheren Mitgliedern der Arbeitsgruppe “Complex Systems” Dorjsuren Battogtokh, Michael Hildebrand, Hans-Philip-Lerch, Susanna Manrubia, Michael Stich, Florian Ulmar und Damian Zanette für die schöne Zeit und die vielen interessanten Diskussionen.

Für die große Hilfe beim Korrekturlesen bedanke ich mich vor allem bei Hans-Philip-Lerch, Kathrin Schroeder und Michael Stich.

Bei Kathrin möchte ich mich für die große Unterstützung während der letzten Jahre bedanken.

Lebenslauf

| | |
|---------------|--|
| Name | Pedro Stange |
| Geburtsdatum | 7. März 1968 |
| Geburtsort | Sebnitz |
| Familienstand | ledig, ein Kind |
| Nationalität | deutsch |
| 1974 - 1984 | Polytechnische Oberschule in Neustadt |
| 1984 - 1987 | Lehre „Fa. f. Fertigungsmittel“, VEB Dresdner Silberwaren |
| 1987 | externe Abiturprüfung an der Volkshochschule Dresden |
| 1987 - 1990 | Werkzeugmacher, VEB Dresdner Silberwaren |
| 08/88 - 01/90 | Wehrdienst |
| 09/90 - 09/91 | Philosophiestudium an der Martin - Luther - Universität Halle |
| 10/91 - 09/93 | Physikstudium an der Martin - Luther - Universität Halle |
| 08/93 | Vordiplomprüfung |
| 10/93 - 09/96 | Physikstudium an der Technischen Universität Berlin |
| 10/95 - 09/96 | Diplomarbeit am Fritz-Haber-Institut der MPG bei Prof. Dr. A.S. Mikhailov |
| 09/96 | Diplom-Hauptprüfung Physik |
| 10/96 - 08/99 | Doktorand am Fritz-Haber-Institut der MPG bei Prof. Dr. A.S. Mikhailov |
| 02/97 - 08/99 | Stipendium der „Peter und Traudl Engelhorn-Stiftung zur Förderung der Biotechnologie und Gentechnik“ |
| 09/99- | Projektleiter Applied Research and Services, Braun GmbH, Kronberg |

Eppstein, 25.6.2000