
BAYERISCHE JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
LEHRSTUHL FÜR BIOINFORMATIK

**Bioinformatische Identifikation von Domänen-
unterschieden bei Parasit und Wirt
am Beispiel der Malaria**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Helge Bertram

Rinteln, 2005

Eingereicht am: 10.10.2005

Mitglieder der Prüfungskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin J. Müller (Dekan)

1. Gutacher: Prof. Dr. Thomas Dandekar

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Heiner Schirmer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Erforschung tropischer Infektionskrankheiten	1
1.2	Malaria	1
1.3	Regulation von Netzwerken	4
1.3.1	Regulation durch RNA	4
1.3.2	Proteinklassifikation	5
1.3.3	Metabolische Netzwerke und Elementarmodenanalyse	5
1.3.4	Glutathionreduktasekristalle als Redoxsensor in Zellen	6
	Problemstellung	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Datenbanken	11
2.1.1	Sequenzdatenbanken	11
2.1.2	Domänen- und Motivdatenbanken	12
2.1.3	Strukturdatenbanken	13
2.1.4	Sonstige Datenbanken	14
2.2	Datenbank-Suchalgorithmen	15
2.3	Programme zur Alignierung von Sequenzen	17
2.4	Software zur Identifikation von Iron Responsive Elements (IREs)	18
2.5	Programmiersprachen und Textmustersuche	18
2.6	Elementarmodenanalyse	19
2.7	Glutathionreduktasekristalle als Redoxsensor	21

3	Ergebnisse	25
3.1	Werkzeuge zur Identifizierung von regulatorischen Elementen und Domänen	25
3.1.1	Iron Responsive Elements in der mRNA von <i>Staphylococcus aureus</i>	25
3.1.2	Suche eines Biotintransporters in <i>Plasmodium falciparum</i>	30
3.2	Experimentelle Untersuchung eines zentralen eukaryontischen Redoxenzym: Kristalle der Glutathionreduktase	33
3.3	Analyse der metabolischen Flüsse der Glutathionreduktase als Mitglied eines komplexen Redoxnetzwerkes	38
3.4	Weitere biomedizinische und informatische Herausforderungen bei der Analyse von Domänenunterschieden zwischen Mensch und Malaria-Parasit	54
3.4.1	Automatische Klassifikation von Proteindomänen	54
3.4.2	Pathogenomik	61
3.5	Analyse der Rolle der Glutathionreduktase in Redoxnetzwerken von Anopheles, Mensch und Plasmodium	62
4	Diskussion	71
4.1	Identifizierung von regulatorischen Elementen und Domänen	71
4.2	Glutathionreduktase als Redoxsensor	72
4.3	Glutathion als zentrales Molekül in metabolischen Netzwerken	73
4.4	Verallgemeinerung der Methode für die Analyse von Domänenunterschieden zwischen Mensch und Malaria-Parasit	78
4.5	Glutathion in verschiedenen Redoxnetzwerken im Vergleich	81
5	Ausblick	85
6	Zusammenfassung	87
	Summary	89
7	Literatur	91
8	Anhang	111

1 Einleitung

1.1 Erforschung tropischer Infektionskrankheiten

In der vorliegenden Arbeit geht es einerseits um die Suche nach Unterschieden in den Redoxnetzwerken des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*, der Stechmücke *Anopheles gambiae* und des Menschen, andererseits geht es um die Entwicklung eines Messwerkzeugs zur Bestimmung des Redoxzustandes in lebenden Zellen. Der größte Teil dieser Untersuchungen zur Beziehung von menschlichem Wirt und Parasit fand statt im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 544 „Kontrolle tropischer Infektionskrankheiten“ der Universität Heidelberg, ein weiterer Teil wurde im Fachbereich Bioinformatik der Universität Würzburg erstellt. Die Erforschung von tropischen Infektionskrankheiten innerhalb des Sonderforschungsbereichs umfasst unter anderem den Redoxmetabolismus von *Trypanosoma brucei* (Hillebrand et al., 2003), das Problem der Bezahlbarkeit von Medikamenten im Gesundheitswesen (Sommerfeld et al., 2002) und eine Impfstoffentwicklung zur Behandlung von AIDS (Marcus et al., 2002).

In unserem Teilprojekt B2 des Sonderforschungsbereichs geht es um das Proteinnetzwerk mit Thioredoxin und der Glutathionreduktase im Zentrum, das in *Plasmodium falciparum* die Redoxhomöostase aufrecht erhält (Kanzok et al., 2000). Gelingt es, Unterschiede in der Regulation dieser Netzwerke bei Wirt und Parasit oder Unterschiede bei Domänen von Proteinen zu identifizieren, so ist dies ein guter Ansatzpunkt für die Entwicklung von wirksamen Medikamenten. Solche Medikamente könnten den Schutz des Parasiten durchbrechen, ohne den der menschlichen Zelle zu schwächen.

1.2 Malaria

Malaria ist die wichtigste durch Parasiten ausgelöste Krankheit in den Tropen. Sie wird durch Protozoen der Gattung *Plasmodium* verursacht und durch Anopheles-Mücken übertragen. Malaria ist in 91 Ländern endemisch, und es gibt ungefähr 500 Mio Fälle von Malaria weltweit (Warrell et al., 2002). Das führt zu geschätzten 1,5 bis 2,7 Mio Todesfällen pro Jahr (WHO, 1998). Mehr als 90% der Malariaerkrankungen und -todesfälle treten in Afrika südlich der Sahara auf. In Gebieten, in denen die Übertragungsrate hoch ist, sind meist Kinder, die jünger als fünf Jahre sind, und Schwangere, die zum ersten Mal gebären, betroffen (Breman et al., 2001). Dagegen sind in Gebieten mit einer geringen

Übertragungsrate junge Erwachsene, die unbebautes Land wirtschaftlich erschließen, dem größten Risiko einer Infektion ausgesetzt. Überhaupt trifft Malaria die ärmsten Länder und die unter den schlechtesten Bedingungen lebenden Menschen am härtesten. Sie tritt häufig dann auf, wenn die Menschen wirtschaftlich aktiv sein müssten wie zu Zeiten der Ernte (Trigg et al., 1998). So kommen zu den Kosten der Behandlung der Malaria, die häufig nur ein Drittel der Gesamtkosten ausmachen, noch die Kosten der fehlenden Arbeitskraft des Erkrankten und der Menschen hinzu, die ihn pflegen (Bonilla et al., 1993). Dies hat zur Folge, dass Länder, in denen Malaria auftritt, gemessen am kaufkraftbereinigten Bruttoinlandsprodukt pro Kopf um den Faktor fünf schlechter abschneiden und die zu erreichenden Wachstumsraten weit niedriger liegen als in malariafreien Ländern (Gallup et al., 2001).

Es gibt vier Arten von Malariaparasiten, die beim Menschen Malaria auslösen: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae*. Für die meisten Krankheits- und Todesfälle ist die maligne Malaria, die durch *P. falciparum* ausgelöst wird, verantwortlich. Aber auch die gutartige Malaria, die durch *P. vivax* ausgelöst wird, ist in manchen Teilen Asiens und Lateinamerikas ein bedeutender Krankheitserreger. Der Infektionszyklus beginnt, indem die Plasmodien in Form von Sporozoiten aus den Speicheldrüsen der Anopheles-Mücke in die Blutbahn des Menschen gelangen. Die Sporozoiten dringen in Leberzellen (Hepatozyten) ein und, nachdem sie sich stark vermehrt haben, verlassen sie diese als Merozoiten. Die Merozoiten dringen in rote Blutkörperchen ein, vermehren sich dort, und nach deren Zerstörung befallen die Schizonten neue Erythrozyten. Bei diesem Zyklus innerhalb der roten Blutkörperchen entstehen auch die Gametozyten als geschlechtliche Stadien der Plasmodien. Diese werden bei einer Blutmahlzeit von einer anderen Anopheles-Mücke aufgenommen. Mikro- und Makrogameten (männliche und weibliche Gametozyten) verschmelzen zur Ookinete und wandern durch die Wand des Darmes der Anopheles-Mücke. Innerhalb der Oozyste entwickeln sich die Sporozoiten, die dann in die Speicheldrüsen wandern und von dort eine weitere Infektion auslösen können.

Das gesamte Krankheitsbild der Malaria wird durch die ungeschlechtlichen Stadien von *Plasmodium* ausgelöst, die die Erythrozyten zerstören. Die geschlechtlichen Parasiten (Gametozyten) und die Plasmodien, die in die Leberzellen eindringen (Sporozoiten), lösen keine Organfehlfunktion aus. Die Zerstörung der roten Blutkörperchen führt zur Freisetzung von neuen Parasiten und dem Inhalt der Erythrozyten. Die Reaktion des Wirtes auf diese Ereignisse löst die Symptome der Malariaerkrankung aus. Die Symptome einer schweren Malariainfektion sind Frösteln, Fieber, Anämie, Nierenversagen, Fehlfunktion der Leber und Plazenta, Unterzuckerung und Milchsäureazidose. Weitere negative gesundheitliche Auswirkungen entstehen durch die Möglichkeit, dass sich von Plas-

modien befallene Erythrozyten an die Innenwände kleiner Blutgefäße (Kapillaren) binden. So können sich die parasitierten roten Blutkörperchen festsetzen und eine Passage durch die Milz vermeiden, wo sie herausgefiltert würden. Es kann auch ein befallener Erythrozyt von gesunden Erythrozyten umgeben werden. Diese Form der Bindung wird als Rosettenbildung bezeichnet, und beides führt dazu, dass die Kapillaren verstopfen. Das bedeutet, dass es zu einer Unterversorgung der Organe mit Sauerstoff kommt (Anoxie), was unter anderem zu tiefem Koma führen kann (Sherman, 2002).

Zu dem Krankheitsbild, das durch die aufgelösten Erythrozyten auftritt, gehört am Ende auch die Blutarmut. Das ist im Besonderen bei Infektionen durch *Plasmodium falciparum* und *P. malariae* der Fall, weil diese reife Erythrozyten befallen, von denen es sehr viele gibt. Die durch *P. vivax* und *P. ovale* ausgelösten Formen der Malaria verlaufen nicht so schwer, weil diese Parasiten relativ selten vorkommende junge Erythrozyten befallen. Dadurch wird die Belastung eingeschränkt, und es kann auch nicht so schnell zu Anämie kommen (Mehlhorn et al., 2001). Die Einordnung der Plasmodienarten in die phylogenetische Systematik erfolgt in die Taxa Alveolata, Apicomplexa, Haematozoa und Haemosporida (Westheide et al., 2004). Es lassen sich über 100 verschiedene Parasitenarten finden, die denen, die im Menschen Malaria auslösen, ähnlich sind. Das Wirbeltierwirtsspektrum reicht von Reptilien über Vögel bis zu höheren Affen. Von diesen Plasmodienarten lassen sich aber - bis auf wenige, die auch Affen infizieren - keine auf den Menschen übertragen. Auf der einen Seite deutet diese hohe Wirtsspezifität auf eine lange bestehende Verbindung des Menschen mit den Parasiten hin (Gilles, 2002). Auf der anderen Seite ergaben Untersuchungen der vier Plasmodienarten, die Menschen infizieren, große Unterschiede in den DNA-Sequenzen. Sie unterscheiden sich so stark, dass sich die Entwicklung dieser vier Arten schon vor der Entstehung der Spezies *Homo sapiens* vor ungefähr acht Millionen Jahren getrennt haben muss. Eine große Ähnlichkeit verschiedener Isolate einer Art lässt sich damit erklären, dass erst vor kurzem ein Parasitenstamm den Wirtsorganismus gewechselt hat. Dadurch ergibt sich zum Beispiel für *Plasmodium falciparum* nur eine geringe Entwicklungszeit im Menschen (Ayala et al., 1999).

Eine Möglichkeit, die Ausbreitung von Malaria zu kontrollieren, besteht darin, gegen die erwachsene Anopheles-Mücke vorzugehen. Dies wird zum Beispiel durch die Ausbringung von Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) in Wohnräumen gemacht. Dort bildet das DDT einen Film auf den Wänden, der monatelang toxisch genug bleibt, um Mücken, die dort landen, zu vergiften. DDT war optimal für diesen Zweck, weil es vergleichsweise ungiftig für den Menschen ist. Es ist billig herzustellen und im Vergleich mit Pyrethroiden bei ähnlich geringer Toxizität für Warmblüter viel länger wirksam (Beales et al., 2002a). Leider werden die Anopheles-Mücken sehr schnell resistent gegen DDT. Es gilt weiter als umstritten, ob sich nicht gerade DDT sehr schnell in der Umwelt abbaut, und ob

nicht andere chlororganische Verbindungen und eben nicht DDT zu einem verminderten Bruterfolg bei Raubvögeln führen (Coulston, 1985). Trotzdem wird DDT zum sogenannten „schmutzigen Dutzend“ (dirty dozen) der persistenten organischen Schadstoffe (persistent organic pollutants, POPs) gezählt, und seine Produktion ist bis auf wenige Tonnen pro Jahr zur Bekämpfung von Anopheles verboten (Kaiser et al., 2000). Die verantwortungsvolle Kontrolle des Vektors ist sicher eine der geschicktesten Arten, ohne Nebenwirkungen für den Menschen Malaria in den Griff zu bekommen. Aus diesem Grund wäre es hilfreich, einen ähnlich gut wirkenden Ersatz für DDT zu finden.

Gerade Versuche, die Malariaübertragung zu unterbrechen, indem man die Mücke als Vektor kontrolliert, sind für den Menschen in der Regel am schonungsvollsten. Auf der einen Seite kann auch heute noch mit stark integrierten ökologischen Methoden die Menge der Mücken stark verringert werden, und zwar durch Reduktion der Zahl der Orte, an denen die Larven leben können, durch Auffüllen oder Entwässern, vielleicht sogar durch Erzeugung unterschiedlicher Wasserstände in den Kanälen und durch Kanäle mit entsprechend geneigten Seiten, die für einen schnellen Wasserabfluss sorgen. Dazu gehören auch: Das Entfernen von Sandbänken und schattenspendender Vegetation bis hin zum Einsatz von larvenfressenden Fischen (Beales et al., 2002b). Auf der anderen Seite sind chemische Kontrollmethoden wie DDT (siehe oben) auf dem Rückzug. Dies erfordert die Entwicklung neuer Methoden, die sowohl den Parasiten als auch den Vektor und den Menschen mit einbeziehen. Ein Beitrag dazu ist diese Arbeit, in der die metabolischen Netzwerke von Plasmodium, Anopheles und Mensch untersucht wurden.

1.3 Regulation von Netzwerken

1.3.1 Regulation durch RNA

Auf der Ebene der mRNA kann eine sehr genaue zeitliche und räumliche Regulation der gewünschten Proteinprodukte realisiert werden. Zum Beispiel wird vorhandenes Eisen im 5' untranslatierten Bereich von mRNAs, deren Produkte auf Eisen angewiesen sind, erkannt. Dies wird durch ein Protein vermittelt, das einerseits das Eisen und andererseits den als Iron Responsive Element (IRE) bezeichneten Bereich der mRNA bindet. Diese IREs sind gut formal zu beschreiben, und so ist es in neu sequenzierten Genomen unkompliziert möglich zu überprüfen, welche Proteine in Anwesenheit von Eisen durch IREs über mRNAs verstärkt translatiert werden. Dies ist bei Krankheitserregern von Interesse, denn Eisen ist Cofaktor vieler Enzyme, und einige Krankheitssyndrome lassen sich durch die

Erschließung von Eisenquellen erklären. Auf der anderen Seite muss Eisen sozusagen gut gesichert in den Zellen gespeichert werden, denn freies Eisen birgt die Gefahr von Redoxschäden. Um diese Schäden zu vermeiden, muss zum Beispiel in Plasmodien Haem beim Abbau von Erythrozyten entgiftet werden.

1.3.2 Proteinklassifikation

Teilt man Proteine in Domänen ein, dann finden sich neben katalytischen auch oft Domänen mit regulatorischer Funktion, und um verschiedene Proteine vergleichen zu können, ist es sinnvoll, sie durch ein automatisiertes Verfahren vorurteilsfrei in Domänen einzuteilen. Auf diese Art und Weise wird man bei der Beschreibung und Beurteilung von Proteinen nicht von einer historischen Einteilung beeinflusst, was zu neuen Einsichten über die Funktionsweise der untersuchten Proteine führen kann. Schließlich kann auch hier die Suche nach Domänen, die spezifisch bei *Plasmodium falciparum*, nicht aber beim Menschen vorkommen, genutzt werden, um den Parasiten zu bekämpfen.

1.3.3 Metabolische Netzwerke und Elementarmodenanalyse

Metabolische Netzwerke bestehen aus Proteinen, die untereinander durch den Fluss umgesetzter Metaboliten stark vernetzt sind. Diese Edukte können innerhalb des metabolischen Netzwerkes zu zahlreichen unterschiedlichen Produkten werden.

Metabolische Netzwerke werden untersucht, um zum Beispiel biotechnologische Fragen wie Steigerung der Produktion eines gewünschten Produktes unter Umgehung eines begrenzenden – kontrollierten – enzymatischen Schrittes zu lösen oder die Frage zu beantworten, wie ein Zwischenprodukt in einen gewünschten Synthese- oder Abbauweg geleitet werden kann (Stelling et al., 2002). Untersuchungen des zellulären Metabolismus unter der Annahme eines quasistationären Gleichgewichts reichen von rein mikrobiologischen Fragestellungen (van Dien et al., 2002) über biotechnologische Fragestellungen (Wiechert, 2001) bis hin zur Analyse von gesamten Organismen (Edwards et al., 2000; Schuster et al., 2000b; Carlson et al., 2002). Zusätzlich kann die Elementarmodenanalyse verwendet werden, um genomische Daten zu rekonstruieren. In dieser Arbeit geht es um den letzten Punkt und dabei im Besonderen um die Frage, welche Enzyme bei *Anopheles gambiae* und *Plasmodium falciparum* besonders angreifbar sind, ohne den Menschen zu schädigen. Um dies zu erreichen, gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten: Enzyme können komplett blockiert oder entfernt werden, oder es können neue Enzyme eingeführt werden. In beiden Fällen ändert sich die Topologie des Netzwerkes.

Die strukturelle, also topologische Analyse von metabolischen Netzwerken verwendet nur zwei Arten von Informationen: Einerseits Informationen über die Stöchiometrie der Metaboliten in den Reaktionen und andererseits Informationen über die Reversibilität der Reaktionen selbst. Es ist eine eher qualitative Vorgehensweise, aber sie ist weit davon entfernt trivial zu sein. Die Elementarmodenanalyse von Netzwerken ist ein eher integrierender Ansatz, weil auf der Seite der Metaboliten nur eine Unterscheidung zwischen Intermediaten und externen Stoffen getroffen wird. So wird das gesamte Potential der grundlegenden Biotransformationen in dem untersuchten System unvoreingenommen dargestellt. Für eine detailgenauere Untersuchung reichen die bisher bekannten kinetischen Daten bei weitem nicht aus. Denn selbst mit den wachsenden Datenbanken über kinetische Parameter der Reaktionen (Schomburg et al., 2002) sind noch nicht annähernd alle Enzyme biochemisch charakterisiert. Gerade wenn man große metabolische Netzwerke untersuchen möchte, ergeben sich viele Ungenauigkeiten, bezieht man die kinetischen Daten mit ein.

Selbst bei vergleichsweise kleinen Netzwerken und lange bekannten Reaktionswegen lohnt sich eine Elementarmodenanalyse, denn die Reaktionswege, wie sie in Lehrbüchern der Biochemie häufig dargestellt werden, geben oft nicht das wirkliche Verhalten eines metabolischen Netzwerkes wieder (Schuster et al., 2000b). Im Gegensatz zu den dort dargestellten Reaktionswegen werden hier durch einen mathematischen Algorithmus alle möglichen Kombinationen aufgezeigt, die dann weiter untersucht werden können. Durch Vergleich der Elementarmoden im vollständigen System mit einem System, dem Reaktionen fehlen, wird untersucht, wie robust ein metabolisches Netzwerk ist und ob es Nebenwege gibt, die doch zu den Produkten führen können, die ein Organismus zum Überleben braucht.

Die Glutathionreduktase ist ein Schlüsselenzym der Zelle, weil sie für den Schutz vor Redoxschäden durch Sauerstoff verantwortlich ist. Der Redoxstatus einer Zelle lässt sich am Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion bestimmen, und bei der Glutathionreduktase kumulieren viele verschiedene Redoxreaktionen. Sie ist damit innerhalb des Redoxstoffwechsels ein stark vernetztes Enzym und deshalb interessant für die Suche nach Medikamenten, die über eine Veränderung des oxidativen Stresses eine Wirkung erzielen wollen.

1.3.4 Glutathionreduktasekristalle als Redoxsensor in Zellen

Die Glutathionreduktasekristalle eignen sich sehr gut, um den Redoxzustand einer Zelle zu messen. Dabei haben Kristalle generell einen Vorteil gegenüber Lösungen mit dem

gleichen Enzym, da es durch den Kristall zu einer Signalverstärkung kommt, die sich besser messen lässt. Seit mehr als 25 Jahren ist es möglich, die Glutathionreduktase zu kristallisieren (Krohne-Ehrich et al., 1977; Schulz et al., 1978). Es liegt mittlerweile eine Kristallstruktur des Moleküls mit einer Auflösung von 1.54 Å vor (Karplus et al., 1987). Wird die Glutathionreduktase reduziert, gibt es einen deutlichen Farbumschlag von Gelb nach Rot. Mit diesem Farbumschlag kann der interne Redoxzustand einer Zelle gemessen werden. Dabei wird nicht nur ein Messwert bestimmt wie zum Beispiel nur der pH-Wert der Zelle, sondern es kommt zu einer Integration aller Signale für den Redoxstatus. Dies ist möglich wegen der zentralen Rolle der Glutathionreduktase.

Problemstellung

Diese Arbeit untersucht zelluläre Netzwerke mit dem Ziel, die so gewonnenen Einsichten medizinisch beziehungsweise biotechnologisch zu nutzen. Hierzu müssen zunächst Proteindomänen und wichtige regulatorische RNA-Elemente erkannt werden. Anschließend wird ihr Zusammenwirken in Netzwerken betrachtet (einschließlich experimenteller Daten). Dies kann einerseits zu allgemeinen Schlussfolgerungen über das Netzwerkverhalten führen, andererseits für konkrete Anwendungen genutzt werden. Als Beispiel wählen wir hier Redoxnetzwerke und die Bekämpfung von Plasmodien als Verursacher der Malaria.

- a) In den Resultaten werden im ersten Teil bioinformatische Wege zum Aufspüren von regulatorischen Elementen in RNA-Molekülen am Beispiel von Iron Responsive Elements (IREs) dargestellt sowie die Identifikation von Proteindomänen durch die Kombination von Sequenzanalyse und Struktur- beziehungsweise Funktionsvorhersagen.
- b) Im Detail werden anschließend die Proteinkomponenten von Redoxnetzwerken betrachtet. Hierbei zeigt sich, dass das zentrale Redoxenzym Glutathionreduktase auch als Messsensor für den Redoxzustand der Zelle genutzt werden kann, etwa durch die Verwendung von Enzymmikrokristallen.
- c) Um komplexe Redoxnetzwerke auch bioinformatisch zu modellieren, werden Verfahren der metabolischen Fluxanalyse vorgestellt und verbessert, um insbesondere ihrer Verzahnung besser gerecht zu werden und solche Netzwerke mit möglichst wenigen elementaren Flussmoden zutreffend beschreiben zu können.
- d) Allgemeiner werden dann Verfahren der Proteindomänenklassifikation sowie neue Strategien gegen mikrobielle Erreger betrachtet.

Letzteres wird unter Nutzung der metabolischen Fluxanalyse zur Bekämpfung von Plasmodien umgesetzt: Eine Darstellung von Stoffwechselwegen und vorhandenen Parallelwegen bei *Plasmodium falciparum*, *Anopheles* und Mensch mit der Glutathionreduktase und Thioredoxin im Zentrum zeigt wichtige Unterschiede auf, die pharmakologisch und zur Targetentwicklung genutzt werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Datenbanken

2.1.1 Sequenzdatenbanken

GenBank (NCBI)

Diese Datenbank (www.ncbi.nih.gov/Genbank) enthält alle bekannten Nukleotid- und Proteinsequenzen einschließlich biologischer Informationen und Referenzen.

SRS (Sequence Retrieval System)

Das Sequence Retrieval System (srs.embl-heidelberg.de:8000/srs5) dient dazu, Nukleotid- und Proteinsequenzen nach unterschiedlichen Kriterien wie Organismenart, katalysierter Reaktion oder Bezeichnung der Sequenz zu finden (Etzold et al., 1993).

TIGR (The Institute for Genomic Research)

Von TIGR aus (www.tigr.org/tdb/edb2/pfa1/htmls) wurden aus der Datenbank "The Plasmodium falciparum Genome Database (PFGD)" Daten des noch nicht vollständig sequenzierten Genoms von *Plasmodium falciparum* heruntergeladen. Auch das Genom (ftp://ftp.tigr.org/private/ufmg/s_aureus_sauser_swingseat/) von *Staphylococcus aureus* war bei TIGR auf einem FTP Server vorhanden.

PlasmoDB

Die Datenbank PlasmoDB (www.plasmodb.org) ist eine umfassende Zusammenstellung von Genomdaten verschiedener Plasmodienarten (Kissinger et al., 2002).

BDGP (Berkley Drosophila Genome Project)

In der BDGP Datenbank (www.fruitfly.org) können annotierte Daten zum Drosophila-Genom durchsucht werden, und es werden verschiedene Verknüpfungen zur Proteinvorhersage und zu physikalischen Karten gemacht (Boutros et al., 2000).

EBI (European Bioinformatics Institute)

Vom EBI (www.ebi.ac.uk/proteome) stammen die vollständig sequenzierten Genome von *Plasmodium falciparum*, *Anopheles gambiae* und *Homo sapiens* zur lokalen Blast-suche. Außerdem wurde vom EBI eine Datenbank genutzt, in der Proteinen von (www.ebi.ac.uk/parasites/PlasGN/FalcipProteome/proteome.html) *Plasmodium falciparum* Funktionen zugeschrieben werden. Hier waren besonders mögliche Transportproteine von Interesse.

2.1.2 Domänen- und Motivdatenbanken

Pfam (Protein Families Database of Alignments and HMMs)

Pfam (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam) ist ein Verzeichnis von Alignierungsergebnissen jeweils mehrerer Sequenzen und daraus erstellter Hidden Markov Models (HMMs) der häufigsten Proteindomänen und -familien. Bei Pfam geschieht die Einteilung in Domänen auf zwei unterschiedliche Arten: In der Klasse A befinden sich manuell erstellte Domänen-Definitionen, während Klasse B die automatisch erstellten Domänen beinhaltet (Bateman et al., 2002).

SMART (Simple Modular Architecture Research Tool)

SMART (smart.embl-heidelberg.de) besteht aus handgefertigten Alignierungen und den zugehörigen Hidden Markov Models (HMMs) für extrazelluläre Domänen, Signaltransduktions- und andere Domänen (Letunic et al., 2002). Auf diese Weise ist eine präzise Vorhersage der modularen Architektur von Proteinen möglich.

AnDOM

Mit AnDOM (wb2x01.biozentrum.uni-wuerzburg.de/AnDom) werden strukturelle Domänen von Proteinen mit Hilfe der Proteinsequenzen bestimmt und nach dem Schema von SCOP klassifiziert (Schmidt et al., 2002).

InterPro

InterPro (www.ebi.ac.uk/interpro) ist mit einer Zusammenstellung von Informationen aus verschiedenen anderen Domänen-, Motiv- und Proteinsequenz-Datenbanken (Mulder et al., 2003) wie das SRS eine so genannte sekundäre Datenbank.

2.1.3 Strukturdatenbanken

PDB (Protein Data Bank)

In dieser Datenbank (www.rcsb.org/pdb) sind Informationen über die dreidimensionale Struktur von Proteinen abgelegt (Berman et al., 2000). Mit den Koordinaten der einzelnen Atome der Proteine, die in der PDB enthalten sind, kann die Lage der Atome im Raum dargestellt werden.

SCOP (Structural Classification of Proteins)

Bei dieser Datenbank (scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop) wird das Ziel verfolgt, Proteindomänen mit bekannter Struktur (aus PDB) zu klassifizieren. Bei diesem Ansatz findet die Einordnung von Hand durch Experten statt. Dabei kommen als Kriterien für die Klassifikation der Domänen die Sekundärstruktur (Klasse), ihre Ähnlichkeit der Struktur (Faltung), ihre eindeutige evolutionäre (Familie) und ihre wahrscheinliche Verwandtschaft (Superfamilie) zum Einsatz (Murzin et al., 1995; Andreeva et al., 2004).

CATH (Class (C), Architecture (A), Topology (T), Homologous Superfamily (H))

CATH (www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath) dient ebenso wie SCOP zur strukturellen Klassifikation von Proteinen. Bei CATH wird aber nur die Architektur (A) manuell erfasst, die restliche Einteilung wird automatisch vorgenommen (Orengo et al., 1997). Sowohl bei CATH als auch bei SCOP findet eine hierarchische Einteilung der Proteine statt.

2.1.4 Sonstige Datenbanken

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

Diese Datenbank (www.genome.ad.jp/kegg) beinhaltet neben Informationen über metabolische und regulative Netzwerke auch deren graphische Darstellung sowie Verknüpfungen zu den angesprochenen Genen oder Metaboliten (Kanehisa et al., 2002).

Ligand (Database of Chemical Compounds and Reactions in Biochemical Pathways)

In der Datenbank LIGAND (www.genome.ad.jp/ligand) sind Enzyme und Metaboliten von enzymatischen Reaktionen beschrieben (Goto et al., 2002). Diese Datenbank ist eng mit der Datenbank KEGG verzahnt.

ENZYME (The Enzyme Data Bank)

In der Datenbank ENZYME (www.expasy.org/cgi-bin/enzyme-search-de) kann unter anderem nach der offiziellen Bezeichnung, der EC Nummer (Enzyme Commission) und der Umsatzgleichung für jedes Enzym gesucht werden (Bairoch, 2000). Die Datenbank ENZYME basiert auf den Empfehlungen der IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology).

IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology)

Unter www.chem.qmul.ac.uk/iubmb ist die Originaldatenbank des IUBMB zu finden. Diese Datenbank basiert mit Erweiterungen auf den Nomenklaturempfehlungen von 1992 (Liäbecq et al., 1992).

Brenda (Braunschweiger Enzym Datenbank)

In der Datenbank Brenda (www.brenda.uni-koeln.de) wird zu enzymatischen Reaktionen gespeichert, was in der Literatur über diese Reaktionen bekannt ist (Schomburg et al., 2002). Mit diesen Informationen konnte in Zweifelsfällen bewertet werden, ob eine Reaktion als reversibel oder irreversibel einzustufen war.

2.2 Datenbank-Suchalgorithmen

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Mit diesem Programmpaket von Altschul et al. (1990; 1997) können Ähnlichkeiten von Protein- oder Gensequenzen in Protein- oder DNA-Datenbanken gefunden und eine statistische Bewertung der Ergebnisse vorgenommen werden. Das Programm bietet unterschiedliche Möglichkeiten zur Suche:

blastn Suche mit einer Nukleotidsequenz gegen eine Datenbank aus Nukleotidsequenzen

blastp Suche mit einer Proteinsequenz gegen eine Proteinsequenz-Datenbank

blastx Suche einer in alle sechs Leseraster übersetzten Nukleotidsequenz gegen eine Proteinsequenz-Datenbank

tblastn Suche einer Proteinsequenz gegen eine in alle sechs Leseraster übersetzte Nukleotidsequenz-Datenbank

tblastx Suche von einer in alle sechs Leseraster übersetzten Nukleotidsequenz in einer in ebenfalls sechs Leseraster übersetzten Nukleotidsequenz-Datenbank

Bei BLAST wird ein heuristischer Algorithmus verwendet, um lokale Sequenzähnlichkeiten zu entdecken. Dazu werden Fragmente gleicher Länge (drei Aminosäuren bei Protein- und elf Nukleotidbasen bei DNA-Sequenzen) aus der Such- und der Datenbanksequenz verglichen. Dabei werden diesen kurzen Sequenzen aligniert und bewertet. Wenn ein gewisser Schwellenwert überschritten wird, werden diese Fragmente als *Maximal Scoring Pairs* (MSP) bezeichnet, und sie werden soweit erweitert und mit anderen MSP zusammengefasst, bis sich eine maximale Punktzahl (*score*) bildet. Diese neuen lokalen alignierten Sequenzen werden *High-scoring Segment Pairs* (HSP) genannt.

Bei der Beurteilung der Homologie von Sequenzen bilden Matrizen, die die logarithmisch aufgetragene Wahrscheinlichkeit von Aminosäure- oder Basenpaarungen in alignierten Sequenzen enthalten, die Grundlage. Durch diese Wahrscheinlichkeiten kann man Aussagen über die evolutionäre Bedeutung der Paarungen treffen. Um die Matri-

zen zu erstellen, werden schon bestehende alignierte Sequenzen ausgewertet. Dabei unterscheiden sich die Matrizen in ihrem zugrunde liegenden Datensatz und in ihrer Art der Berechnung. Standardmäßig findet die BLOSUM62 Matrix Verwendung, die auf der Datenbank BLOCKS (Henikoff et al., 1994) beruht. In dieser Datenbank befinden sich alignierte, hoch konservierte Proteinfragmente, die nicht durch Lücken unterbrochen sind. Die Zahl bei einer BLOSUM-Matrix gibt an, wie hoch der Prozentsatz der Identität der alignierten Sequenzen ist. Bei BLOSUM62 werden also nur Sequenzen verwendet, die zu mindestens 62% identisch sind.

Um die Qualität der Alignierung zu bewerten, nämlich die Sequenzidentität, die Ähnlichkeit und die Anzahl der Lücken, werden noch drei weitere Werte angegeben: Raw score, bit score und E-Value. Der raw score ist die Summe der Werte, der Maximal Scoring Pairs (MSP), die zu einem High-scoring Segment Pair (HSP) zusammengefasst werden. Diese Werte sind abhängig von der Matrix, die zur Bewertung der Homologie verwendet wird. Um die Werte von verschiedenen Matrizen vergleichen zu können, werden die raw score Werte in bit score Werte umgewandelt. Der E-Value gibt schließlich die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine gefundene Sequenz zufällig auftritt.

Außerdem erlaubt der Einsatz von Filtern wie SEG (Wootton, 1994) die Identifikation von entscheidenden Bereichen für eine Bewertung der Frage, ob zwei Sequenzen einander ähneln. So gelten zum Beispiel prolinreiche Abschnitte für Funktions- oder Verwandtschaftsvorhersagen als nicht bedeutsam. Solche Bereiche mit sich immer wiederholenden Aminosäureabfolgen werden low complexity regions genannt und würden ohne die Filterung zu einer Überbewertung führen. Zusätzlich zu den bisher besprochenen Merkmalen erlaubt BLAST auch eine Bewertung von alignierten Sequenzen, die Lücken enthalten dürfen (Altschul et al., 1997). Das bedeutet, homologe Bereiche, die durch nicht homologe Bereiche unterbrochen sind, werden als Gesamtheit dargestellt.

PSI-BLAST (Position Specific Iterative BLAST)

Zusätzlich zum üblichen BLAST bei der Suche mit einer Proteinsequenz gegen eine Proteinsequenz-Datenbank (blastp) gibt es PSI-BLAST (Altschul et al., 1997; Altschul et al., 1998; Schäffer et al., 2001). Bei diesem Verfahren wird ein Profil, eine sogenannte Position Specific Scoring Matrix (PSSM), aus dem Ergebnis einer Alignierung mehrerer Sequenzen der High-scoring Segment Pairs (HSP) gebildet. Dies geschieht durch eine Gapped BLAST-Suche. Die Matrix hat die Dimension $L \times 20$ und gibt für jede Position der alignierten Sequenzen der Länge L die Wahrscheinlichkeiten für das Vorkommen jeder der 20 Aminosäuren an. Dieses Profil wird dann für eine weitere BLAST-Suche genutzt, und durch diese Iteration wird die Empfindlichkeit der Suche erhöht.

Vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) werden die Seiten mit BLAST-Suchmöglichkeiten für gesamte Genome zur Verfügung gestellt. Unter www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/page.cgi?F=HsBlast.html&&ORG=Hs gibt es eine Suchmöglichkeit für das menschliche Genom. Für *Anopheles gambiae* ist unter www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Genome/FlyBlast.html und für *Plasmodium falciparum* unter www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Genome/plasmodium.html eine Suche mit den jeweiligen Einstellungen für deren vollständig sequenzierte Genome möglich.

2.3 Programme zur Alignierung von Sequenzen

Clustal W/Clustal X

Das Programm Clustal W (Thompson et al., 1994) wird zur Alignierung von mehreren Sequenzen genutzt. Unter <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX> kann das Programm heruntergeladen werden. Es führt eine paarweise Alignierung der Sequenzen durch; dann wird auf der gesamten Länge eine Distanzmatrix erstellt, die wiederum als Grundlage für einen Stammbaum dient. Schließlich werden die Sequenzen entsprechend ihrer Verwandtschaft zum Alignierungsergebnis zusammengesetzt. Clustal X ist eine graphische Benutzeroberfläche zu Clustal W (Thompson et al., 1997).

Seaview

Seaview (Galtier et al., 1996) ist ein weiteres Programm, mit dem alignierte Sequenzen auf ihre Qualität hin bewertet werden können. Das Programm kann unter der Adresse ftp://pbil.univ-lyon1.fr/pub/mol_phylogeny/seaview für viele unterschiedliche Plattformen heruntergeladen werden.

GCG (Genetic Computer Group, Inc.), SeqLab™ und das Wisconsin Package™

Das kommerzielle Programmpaket Wisconsin Package™ (GCG, 1998) der Genetic Computer Group (GCG) ist sehr umfangreich. In dieser Arbeit wurde es vor allem eingesetzt, um Nukleotidsequenzen in Proteinsequenzen zu überführen, dabei wurden alle sechs möglichen Leseraster beachtet und dann nach potentiellen Genprodukten (offene Leseraster) durchsucht. Dazu wurde auch SeqLab™ als graphische Benutzeroberfläche zusätzlich zur eigentlichen Programmsammlung des Wisconsin Packages™ verwendet. Außerdem wurden auch Tools mit Kommandozeilensteuerung genutzt, um Nukleotid-

sequenzen so zu formatieren, dass sie im FASTA-Format in anderen Programmen eingesetzt werden konnten.

2.4 Software zur Identifikation von Iron Responsive Elements (IREs)

Bei der Suche nach Iron Responsive Elements kam ein von Dandekar et al. (1991) entwickeltes Programm zum Einsatz, das eine Vorhersage über die Qualität möglicher IREs erlaubt. Während Regulationselemente bei DNA oft durch eine Konsensussequenz beschrieben werden können, bestehen diese Elemente auf RNA-Ebene oft aus einer Kombination aus einem Sequenz- und einem Strukturmotiv. Um ein Muster bei RNA-Regulationsmotiven zu definieren, kommen neben phylogenetische Vergleichen Mutageneseversuche zum Einsatz. So konnten zum Beispiel für die Stamm/Schleifenstruktur der Iron Responsive Elements die Sequenz der Schleife und eines weiteren essentiellen Restes identifiziert werden (siehe Abbildung 3.1). Um Gemeinsamkeiten zu entdecken, ist es sinnvoll, die Mitglieder einer Sequenzfamilie, in der die gesuchten Eigenschaften vorkommen, zu sammeln. Dies geht zum Beispiel mit dem Sequence Retrieval System (SRS) besonders gut (Etzold et al., 1993). Wenn dann die Hauptmerkmale der Funktion der Sequenz ermittelt sind, ist damit der erste Schritt für eine erfolgreiche Suche nach RNA-Motiven erfolgt: Eine genaue Beschreibung des Motivs. Als nächstes wird das Merkmal in ein Computerprogramm überführt. Dabei wird festgelegt, welche Motivteile obligatorisch und welche fakultativ sind. Es wird ein erster Test mit den Daten aus dem SRS durchgeführt, in diesen Sequenzen muss das Motiv erkannt werden. Alle Ergebnisse des Programms werden genauestens unter dem Aspekt betrachtet, ob sie nach biologischen Gesichtspunkten Sinn machen. Schließlich werden die besten Ergebnisse des Programms mit bekannten RNA-Sequenzen, die die gewünschte Eigenschaft haben, verglichen und bewertet. Dies kann zum Beispiel durch das Alignieren der RNA-Sequenzen und -Strukturen geschehen (Dandekar et al., 1995).

2.5 Programmiersprachen und Textmustersuche

perl

Die Skriptsprache perl (www.perl.org) arbeitet als eine so genannte interpretierte Skriptsprache. Das bedeutet, dass der Perl Interpreter eine Datei einliest und die enthaltenen Befehle ausführt. Eine Übersetzung (Kompilieren) der Befehle in für den Computer direkt ausführbare Befehle (Maschinencode) gibt es in diesem Fall nicht (Wall et al.,

1997; Schilli, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde perl besonders häufig verwendet, weil das Durchsuchen von Texten mit Hilfe von regulären Ausdrücken besonders einfach und effizient ist. Die Implementation von regulären Ausdrücken ist bei perl sehr umfangreich (Friedl, 1997).

C

Diese Sprache (Kernighan et al., 1990) gehört zu den höheren Programmiersprachen, sie ist nicht für einen bestimmten Einsatzzweck spezialisiert, und sehr weit verbreitet. In C geschriebene Programme sind gut an unterschiedliche Betriebssysteme anzupassen. Neben dieser Portabilität des unkompilierten Quellcodes sind die kompilierten Programme im Vergleich zu Programmen, die in einer Skriptsprache wie perl entwickelt wurden, sehr schnell, weil C zur Systemprogrammierung entwickelt wurde.

Emacs

Als Texteditor für die Programmierung wurde wegen der umfangreichen Formatierungsoptionen Emacs verwendet (Cameron et al., 1996). Außerdem kam es bei Dateien mit Sequenzen zum Einsatz, weil es nicht nur beliebige Dateitypen darstellt und problemlos mit sehr großen Dateien umgehen kann, sondern auch sicher völlig unverändert speichert. Zusätzlich hat Emacs eine eigene Suchmaschine für reguläre Ausdrücke (Friedl, 1997), die sehr hilfreich beim Durchsuchen von Texten ist.

2.6 Elementarmodenanalyse

Metatool

Zur Elementarmodenanalyse wurde das Programm Metatool (Pfeiffer et al., 1999) verwendet. Das Konzept der Elementarmodenanalyse ermöglicht die Ermittlung eines fundamentalen Fließgleichgewichts einschließlich zyklischer Flüsse. Dabei wird von einem quasistationären Gleichgewicht ausgegangen, in dem sich die untersuchte Zelle befindet. Dies ist legitim, wenn es große externe gepufferte Pools gibt, bei denen es pro Zeiteinheit nur wenig Änderung durch die beteiligten Reaktionen im Vergleich zu den neu herangeführten Metaboliten gibt. Jede Fließgleichgewichtssituation kann bei der Elementarmodenanalyse als nicht negative Linearkombination von Elementarmoden dargestellt werden. Durch die hohe Umsatzgeschwindigkeit des Metabolitenpools nimmt man beim Fließgleichgewicht ($c(t)$ constant) an:

$$\frac{d\mathbf{c}(t)}{dt} = \mathbf{0} = \mathbf{N} \cdot \mathbf{r} \quad (1)$$

Flussverteilungen \mathbf{r} , die (1) erfüllen, liegen alle im Nullspace von \mathbf{N} (Heinrich et al., 1996) und können alle Metaboliten gegeneinander balancieren. Dabei ist \mathbf{N} die Stöchiometriematrix, die aus m Reihen der Metaboliten und n Spalten mit den Stöchiometrikoeffizienten der Metaboliten in jeder Reaktion besteht. Der Vektor \mathbf{r} gibt die Nettoreaktionsrate an, und der Vektor \mathbf{c} beschreibt die Metabolitenkonzentration. Die Flussverteilungen im Nullspace halten die Homöostase aufrecht und sind deshalb auf längere Sicht die für das System wichtigen Reaktionen. Der Vorteil der Gleichung (1) besteht darin, dass nicht vorhandene oder unsichere Parameter und die molekularen Reaktionsmechanismen größtenteils nicht mit eingehen.

Technisch gesehen, wird grundsätzlich zwischen externen und internen Metaboliten unterschieden. Außerdem wird mit einbezogen, ob eine Reaktion reversibel oder irreversibel verläuft. Dies ist meist bekannt, auch wenn andere kinetische Parameter nicht vorliegen. Ein Elementarmodus ist dann ein minimaler Satz an Enzymen, die im Fließgleichgewicht arbeiten können, während alle irreversiblen Reaktionen in die zugelassene Richtung ablaufen. Externe Metaboliten werden als gepuffert angenommen, weil sie mit einem externen Reservoir verbunden sind, das viel größer ist als in dem dargestellten System verbraucht werden kann. Beispiele sind „source“ oder „sink“ Zellen (Ort der Synthese oder des Verbrauchs) bei Pflanzen oder Glucose, die vom Blutstrom zum Erythrozyten geführt wird. Interne Metaboliten nehmen nur an Reaktionen innerhalb des Modells teil. Sie müssen balanciert sein: Die Menge, die synthetisiert wird, muss nach der Annahme des herrschenden Fließgleichgewichts der verbrauchten Menge des Metaboliten entsprechen. Ein Modus ist definiert als die Fließgleichgewichtsverteilung, in der die Verhältnisse der Teilflüsse untereinander unveränderlich sind. Ein Modus wird als Elementarmodus bezeichnet, wenn er nicht weiter zerlegbar ist. Ein Nachteil der Elementarmodenanalyse ist, dass es zur so genannten kombinatorischen Explosion der Anzahl der Moden kommen kann: Gibt es Isoenzyme oder längere parallele Reaktionswege, steigt die Anzahl der Elementarmoden stark an.

2.7 Glutathionreduktasekristalle als Redoxsensor

Um zu ermitteln, wie Glutathionreduktasekristalle am besten verwendet werden können, um quantitative Aussagen über den Redoxstatus einer Zelle zu treffen, wurde das Programm Openlab eingesetzt. Es ermöglichte die Division von gesamten Bildern durch einander, wobei jeder einzelne Bildpunkt durch den entsprechenden Bildpunkt des zweiten Bildes geteilt wurde. So konnte bei geeigneten Bereichen bestimmt werden, wie sich die Helligkeitsintensitäten vor und nach der Reduktion geändert hatten. Dies geschah, indem man interessante Bereiche (Region of interest, ROI) des Glutathionreduktasekristalls mit einer Maske markierte. Dieser markierte Bereich sollte eine möglichst große gleichmäßige Fläche des Kristalls umfassen, um den Farbumschlag messen zu können. Die ausgewählte Maske konnte eine unregelmäßige Form haben, weil sie von Hand gezeichnet werden kann. Sie wurde in einer separaten Datei gespeichert. Es war dann möglich, die Maske zusätzlich zu den Bildern vor und nach der Reduktion zu laden und so den gleichen Bereich auf dem Bild auszuwerten. Sollte es durch die Reduktion zu einer Verschiebung gekommen sein, wurde der Auswahlbereich ebenfalls um die entsprechende Anzahl von Bildpunkten in x- und y-Richtung verschoben. Eine Drehung des Kristalls konnte so nicht ausgeglichen werden. Die aufgenommenen Bilder waren 1024 x 768 Pixel groß. Zum Speichern der Schwarzweißbilder direkt am Mikroskop wurde die Openlab Software (Improvision, 1999) verwendet, die auf einem Macintosh-Computer lief. Die verwendeten Geräte und Reagenzien sind in den Tabellen 2.7.1 und 2.7.2 beschrieben. Das 1,4-Dithiothreitol (DTT) wurde eingesetzt, um die Glutathionreduktasekristalle zu reduzieren. Die bis zum Gebrauch tiefgefrorenen Stammlösungen hatten Konzentrationen von 200 mM, 3,75 M und 7,5 M. Es wurden in einem ersten Reduktionsschritt Endkonzentrationen von 1 mM bis zu 150 mM eingesetzt. In Einzelfällen wurde bis zu 90 min auf einen Farbumschlag gewartet und mit bis zu einer Endkonzentration von 954 mM DTT gearbeitet. Damit sich die Glutathionreduktasekristalle möglichst wenig bewegten, wurden zur Reduktion nur Volumina von 0,2 bis 0,5 μl verwendet. Es wurden vor und nach der Reduktion jeweils zwei Bilder mit dem Blau- und dem Grünfilter durch die in Tabelle 2.7.1 aufgeführte Kamera gemacht, um die Auswirkung der Reduktion messen zu können.

Es kamen sowohl Wasserkristalle (Pai, 1978) als auch Kristalle in Ammoniumsulfatlösung (Schulz et al., 1975) zum Einsatz, die vor der Reduktion deutlich gelb gefärbt waren und sich unter reduzierenden Bedingungen rot verfärbten. Um in den Versuchen die Gefahr zu verringern, dass sich die Glutathionreduktasekristalle vor und nach der Reduktion bewegten und die aufgenommenen Bilder dadurch nicht mehr auswertbar waren, wurde

eine spezielle Kammer eingesetzt. Die Kammer entsprach einem Objektträger mit einer Bohrung von 11 mm in der Mitte. Auf halber Höhe des Objektträgers hatte die Bohrung nur einen Durchmesser von 9 mm. Auf den dadurch entstandenen Steg wurde von oben und unten sehr wenig Laborfett mit einer Spritze aufgetragen. Die Kammer entstand, indem runde Deckgläschen aufgesetzt wurden. Das Volumen der Kammer betrug 25 μ l. Auf den Längsseiten des Objektträgers gab es je eine Bohrung bis in die Kammer, durch die mit einer Kanüle zum Beispiel Reduktionsmittel injiziert werden konnte. Zur Injektion wurde eine Hamiltonspritze verwendet.

Bei der Auswahlmaske der auszuwertenden Bereiche des Glutathionreduktasekristalls (Region of interest, ROI) waren oft nur Bereiche von 34 Bildpunkten eingeschlossen. Auch Kristalle, die auf den ersten Blick sehr viel versprechend aussahen, hatten nur sehr kleine Bereiche mit einer durchgehenden Fläche. Neben vielen Brüchen, die durch die Kristalle gingen und die schwarz abgebildet wurden, sorgte die prinzipielle Form eines Kristalls für eine weitere Begrenzung der auswertbaren Fläche: Bei einem Tetraeder waren nicht nur einige der Seitenflächen nicht hell belichtet, sondern die Flächen standen schräg im Raum. Man sah also nicht senkrecht auf diese Fläche. Dies reduzierte die ausgewählte Fläche der Maske weiter. Kam es noch zu einer nur minimalen Verschiebung des Kristalls bei der Reduktion, die nicht durch eine Verschiebung der Maske ausgeglichen werden konnte, wurde der Bereich mit auswertbaren Bildpunkten noch kleiner.

Tab. 2.7.1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Glass Bottom No. 1.5 Part No. P35G-1.5-7-C-grid	MatTek, Ashland, MA
Hamamatsu Camera Controller C4742-95	Hamamatsu, Herrsching
Hamamatsu Digital Camera C4742-95-12NRB	Hamamatsu, Herrsching
Hamilton 701N (ga26S/51mm/pst2) 10 μ l	Hamilton, Darmstadt
IF-Blaufilter BP QS BP 450-490 Excitation (470 nm)	Zeiss: Schott, Mainz
IF-Grünfilter B QS BP 515-565 Emission (540 nm)	Zeiss: Schott, Mainz
Leica M IRBE	Leica, Wetzlar
Leica Objektiv: unendlich/0-2, C Plan, L 20x/0.30 PH1	Leica, Wetzlar
LEP PSSYT, 150W, 73000200	EMBL, Heidelberg
Micromanipulator 5171	Eppendorf, Hamburg
RS232 INT, 73000400	EMBL, Heidelberg
Sartorius Research R160P-*D1	Sartorius, Göttingen

Tab. 2.7.2: Verwendete Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Reagentien und Verbrauchsmaterial	Hersteller
DTT, Electrophoresis Reagent, 99%, No D-9163	Sigma, Taufkirchen
1,4-Dithiothreitol (DTT) 04010	Biomol, Hamburg
Glisseal Laborfett Hochvakuumqualität, -40 °C bis +320 °C	Borer Chemie, Zuchwil

3 Ergebnisse

3.1 Werkzeuge zur Identifizierung von regulatorischen Elementen und Domänen

3.1.1 Iron Responsive Elements in der mRNA von *Staphylococcus aureus*

In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie wir versucht haben, regulatorische Elemente in mRNA Molekülen von *Staphylococcus aureus* zu lokalisieren. Die umfassende Beschreibung von zellulären Interaktionen ist schwierig, weil diese stark nicht-lineare Phänomene sind. Auf der anderen Seite interagieren viele RNA- und Proteinmoleküle nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“. Die Beschreibung und die Suche nach spezifischen Interaktionsstrukturen kann nicht nur die Art der Interaktion klären, sondern auch neue enthüllen. Hier geht es im Speziellen um die Erkennung von Iron Responsive Elements (IREs). Dazu werden drei Methoden verwendet: Ein RNA-Motiv-Suchalgorithmus, das Screening von kompletten Genomen und die Suche nach konservativen Bereichen im Genom.

Der Interaktion von RNA und Proteinmolekülen liegen komplexe Erkennungsprozesse der beteiligten Proteine zu Grunde. Bei der Bindung der beiden Moleküle, die zur Bildung eines Komplexes führt, ist dieser Prozess kooperativ und in starkem Maße nicht-linear. Genauso wird die Regulation der Komplexbildung in den meisten Fällen durch unterschiedliche Signale gesteuert. Dieser Prozess ist ebenfalls ein nicht-lineares Phänomen (Elowitz et al., 2000).

Trotzdem erlaubt das komplizierte Molekül-Molekül-Erkennungssystem, das sich im Mittelpunkt der Erkennungsprozesse entwickelt hat, die Identifizierung und Vorhersage spezifischer molekularer Interaktionen und Vorhersagen über die Struktur der molekularen Teile, die sich gegenseitig erkennen und miteinander in Beziehung treten. Hier sollte es darum gehen, wie diese Erkennungssysteme in einem biologischen Kontext angewendet werden können, um Interaktionen in einer Zelle zu erkennen.

Zelluläre Interaktionen, die durch RNA-RNA- oder RNA-Protein-Interaktionen vermittelt werden, sind stark nicht-linear, weil nur vorübergehend bestehende Basenpaarungen entstehen, aber dynamische Umlagerungen des Moleküls und umfangreiche konzertierte Aktionen von RNA- und Proteinkomponenten ablaufen. Vor diesem Hintergrund ist

Bei einem IRE bestehen die untere und die obere Helix aus je fünf beliebigen Nukleotiden; diese müssen bestimmte Energiekriterien erfüllen. Ein ungepaartes Cytosin verbindet die beiden Helices. Die Primärsequenz der Schleifenstruktur ist streng definiert. Dabei ist wichtig, dass das letzte Nukleotid sich nicht mit dem ersten Cytosin paaren kann. Sucht man prokaryontische IREs, sind mehr Variationen des grundlegenden Motivs möglich (siehe Tabelle 3.1). Das Iron Responsive Element liegt in Richtung des 5'-Endes stromaufwärts der Leserichtung der mRNA vor dem offenen Leseraster, das die Informationen für das Protein enthält. Stamm/Schleifenstrukturen kommen vielgestaltig in Zellen vor und werden üblicherweise durch Regulatorproteine in der Zelle erkannt.

Das Hauptproblem bei der Suche ist, dass die Beschreibung eines RNA-Motivs nur eine Vereinfachung der eigentlichen komplexen dreidimensionalen Struktur ist. Es wird stattdessen mit der Sekundärstruktur – einschließlich vereinfachter Energiebetrachtungen – und der Primärsequenz gearbeitet (Abbildung 3.1). Das hat den Vorteil, dass eine solche Beschreibung einfach genug ist, um eindeutig in eine maschinenlesbare Form überführt zu werden. Dies kann genutzt werden, um ein vollständiges Genom nach weiteren Vorkommen solcher RNA-Motive wie zum Beispiel IREs zu durchsuchen. Auf diese Art und Weise können alle Moleküle mit einer möglichen RNA-RNA-Interaktion identifiziert werden.

Jede dieser Sequenzen erfüllt die Anforderungen des Sekundärstrukturmodells von Iron Responsive Elements. Kommt ein IRE in dem richtigen Kontext vor, dann kann es die Translation der mRNA in Abhängigkeit vom Eisen regulieren. Die optimale Position eines IRE liegt direkt vor einem offenen Leseraster in einer mRNA. Wenn der Eisenpegel hoch ist, bindet kein Iron Responsive Element Binding Protein an das IRE und die Translation ist möglich. Ist nur wenig Eisen vorhanden, bindet das IRP fest an das IRE, und die Translation des folgenden Leserasters ist blockiert. Die Kommentare in Tabelle 3.1 geben drei unterschiedliche Qualitätsstufen der gefundenen RNA-Struktur an, die bei der Suche identifiziert wurden. Die Positionen der Nukleotide sind angegeben, laufendes Sequenzieren wird die analysierten Genomsequenzen weiter verbessern.

In Tabelle 3.1 sind neue Ergebnisse der von mir durchgeführten Suche (Dandekar et al., 2001a) nach Iron Responsive Elements im Genom von *Staphylococcus aureus* (TIGR, 2000) zusammengestellt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Nachdem nach der Methode von Dandekar et al. (1991) potentielle IREs identifiziert worden sind, wurde in der Umgebung dieser möglichen Iron Responsive Elements nach offenen Leserastern gesucht, die für ein Protein codieren könnten. Durch eine BLAST-Suche wurde die mögliche Funktion der Proteine und ihr Bedarf an Eisen untersucht. Die Ergebnisse wurden in Be-

zug auf die Beschaffenheit der potentiellen IREs, ihrer Lage und der möglichen Funktion der Proteine bewertet.

Tab. 3.1: Neue mögliche Iron Responsive Elements im Genom von *S. aureus*

IRE	codiertes Enzym	Organismus	Konfidenz	Leseraster, Position
rc0174333	NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (EC 1.6.5.3)	<i>R. norvegicus</i>	e^{-27}	+3, 20 Bp nach Ende des möglichen IRE
	cguguucggug,agauugac,c,gcuga:gcgacc:acagc,0,aacgagca,gccacaccau ¹ Gutes IRE, in der korrekten Position und bei einem Enzym vorkommend, das am Redoxmetabolismus beteiligt ist. Das Protein braucht FAD und ein Eisen-Schwefel-Cluster zur Aktivität.			
rc0218089	Cytochrom c-Oxidase (EC 1.9.3.1)	<i>B. subtilis</i>	e^{-24}	+1, startet 230 Bp vor möglichem IRE
	ucgacaccauc,acgucaag,c,aguug:caaugc:cagca,0,ucagaugu,gauuauaaaca ¹ Sehr gutes IRE, aber das Leseraster des translatierten Bereiches ist nicht sehr überzeugend. Es zerfällt in drei Fragmente und es gibt eine Verschiebung (Frameshift).			
rc0525240	Formiat-Dehydrogenase-Homolog	<i>B. subtilis</i>	e^{-89}	+3, 3 Bp nach Ende von möglichem IRE
	auuccuuugag,uuucaacc,c,ugcga:ucguac:ucccc,0,aggcggag,ugauuaaugcg ¹ Die Position des IRE ist ideal, aber das IRE selbst ist schwächer. Bei der möglichen Proteinfunktion gibt es keine biologische Verbindung zur Nutzung von Eisen.			

¹ Doppelpunkte (:) schließen die Schleifenstruktur ein, eine Null (0) markiert auf dem Gegenstrang das ungepaarte Cytosin und die Kommata (,) gliedern die Stammstruktur weiter. Bp: Basenpaare

Die Übersetzung der offenen Leseraster in eine Aminosäuresequenz wurde mit GCG (GCG, 1998) durchgeführt. Das Ergebnis wurde dann mit BLAST (Altschul et al., 1990) auf seine phylogenetische Konservierung hin überprüft. Drei mögliche Kandidaten sind in der Tabelle dargestellt. Jeder hat die potentielle Eigenschaft durch ein IRE reguliert zu werden. Ein wirklicher Beweis für diese Strukturhypothese und das Ergebnis der Motivsuche kann nur durch ein Experiment erbracht werden. In einer vorausgehenden Unter-

suchung konnten im Experiment nach einer Überprüfung des gesamten Genoms von *Escherichia coli* zwei der drei potentiellen IRE-Kandidaten in einer Gel-Verzögerungs-Untersuchung bestätigt werden (Dandekar et al., 1998b). In dieser IRE-Gel-Verzögerungs-Untersuchung wird direkt die nicht-lineare Interaktion der RNA-Elemente mit Proteinen nachgewiesen. Bei diesem Beispiel wird das Protein, das die Iron Responsive Elements bindet, als IRE-binding Protein bezeichnet. Auch hier ist eine genaue Modellierung, besonders der Dynamik der Interaktionen, zurzeit nicht machbar.

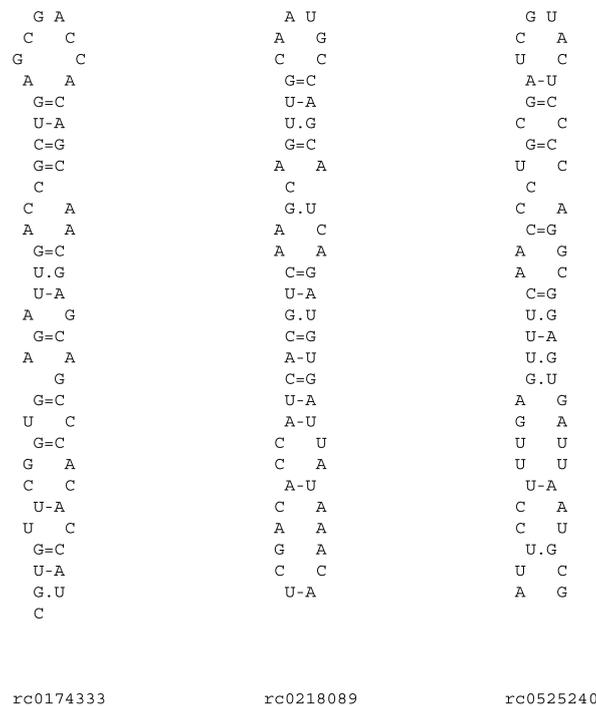


Abb. 3.2: Darstellung der möglichen IREs aus Tabelle 3.1. Zwei Linien stehen für drei Wasserstoffbrückenbindungen in einer Watson-Crick-Paarung, eine Linie für zwei Bindungen. Ein Punkt steht für optionale Wasserstoffbrückenbindungen.

Im Gegensatz zu RNA kann die Funktion von Proteinen nicht so einfach durch ihre Sekundärstruktur beschrieben werden. Das bedeutet, sie haben mehr Freiheitsgrade in ihrer Tertiärstruktur. Das gilt aber nur bei einer Betrachtung der biologischen Bedeutung. Sieht man sich die physikalischen Details an, sind sowohl Proteine als auch RNA kaum genau genug zu modellieren. Auf der anderen Seite ist eine Strategie nach dem „Schlüs-

sel-Schloss-Prinzip" immer noch eine sehr starke Strategie, um Proteininteraktionen in der Zellbiologie zu identifizieren. In jedem Fall braucht man Modellierungsalgorithmen, um die zu untersuchende Modellstruktur hinreichend genau darstellen und den Interaktionspartner vorhersagen zu können.

Untersuchungen vollständiger Genome auf zelluläre Interaktionen hin basieren auf einem Vergleich eines neu sequenzierten Genoms mit dem Genom eines Standardorganismus wie *E. coli* durch differentielle Genomanalyse. Bei dieser Methode werden komplette Genomlisten miteinander verglichen. Dabei sollen entweder gemeinsame Sätze an Genen oder Sätze an Genen, die zwar unterschiedlich sind, aber zu den gleichen Zwischenprodukten führen, identifiziert werden. Von besonderem Interesse sind Gene, die bei dem einen, nicht aber dem anderen Organismus vorkommen (Huynen et al., 1998). Auf diesen Daten aufbauend können Elementarmodenanalysen (Schuster et al., 2000b) und Vergleiche von biochemischen Abbauwegen (Dandekar et al., 1999) durchgeführt werden. Diese Methoden erlauben detaillierte Vorhersagen über die Auswirkungen von Lücken oder fehlenden Enzymaktivitäten. Solche Methoden sind mächtig genug, um systematisch nach Interaktionen in einer Zelle zu suchen. Eine vollständige Analyse kann sich jedoch als sehr komplex herausstellen. In prokaryontischen Genomen stellt sich bei einer differentiellen Genomanalyse heraus, dass aufeinander folgende Gene üblicherweise nicht konserviert sind. Trotzdem kann man für spezifische Gene eine solche Konservierung entdecken. Dies kann sinnvoll genutzt werden, wenn man die Enzyminteraktionen beschreiben möchte. Werden durch experimentelle Untersuchungen gut erforschte zelluläre Interaktionen betrachtet, wie sie bei ribosomalen Proteinen (die im Ribosom interagieren und eine stark konservierte Genreihenfolge haben) vorkommen, dann zeigt sich, eine konservierte Reihenfolge von Genen ist ein starker Indikator für die physikalische Wechselbeziehung der Proteine, für die diese Gene codieren (Dandekar et al., 1998a).

3.1.2 Suche eines Biotintransporters in *Plasmodium falciparum*

Nach der Arbeit mit den DNA-Sequenzen bei *Staphylococcus aureus* und der Untersuchung des Genkontextes geht es bei der Suche nach einem Biotintransporter in *Plasmodium falciparum* um die Identifizierung von Proteindomänen. Zweck beider Aufgaben ist es, möglichst medizinisch bedeutsame Ziele für Medikamente zu finden. Herr Prof. Dr. Lanzer und Frau Dr. Cecilia Sanchez von der Universität Heidelberg haben experimentelle Hinweise, dass es bei *Plasmodium falciparum* einen Biotintransporter geben könnte, der identifiziert werden soll. Biotin ist wichtig als prosthetische Gruppe bei Enzymen, die Carboxylierungen katalysieren und wird deshalb zum Beispiel bei der Syn-

these von Fettsäuren und der Gluconeogenese benötigt. Transporter von Biotin sind sehr interessant, weil sie sogar strukturell nicht miteinander verwandte wasserlösliche Vitamine aktiv in die Zellen aufnehmen. Dabei wird als Energiequelle neben dem Membranpotential auch ein Na^+ -Gradient verwendet (Prasad et al., 2000). Zur Identifikation eines möglichen Plasmodium falciparum-Biotintransporters wurden zuerst von verschiedenen bekannten Biotintransportern aus der Literatur (Chatterjee et al., 1999; Prasad et al., 1999; Kondo et al., 2000; Said et al., 1992; Stolz et al., 1999; Ludwig et al., 2000) die Sequenzen mit dem Sequence Retrieval System (SRS) herausgesucht (siehe Tab. 3.2). Diese wurden dann für iterative PSI-BLAST-Suchen verwendet, bei der konservierte Bereiche wie Domänen schwerpunktmäßig zum Tragen kommen. Bei den Sequenzen handelte es sich um Transporter der Typen SMVT (Sodium Dependent Multi-Vitamin Transporter), VHT1 (Vitamin H Transporter 1), SLC5A6 (Solute Carrier Family) und AtSUC5 (*A. thaliana* Sucrose Transporter). Die Sequenz des letztgenannten Transporters hat freundlicherweise Prof. Dr. Norbert Sauer aus Erlangen zur Verfügung gestellt (Sauer, 2001). Mit der Sequenz des Vitamin H (Biotin)-Transporters (VHT1) aus *S. cerevisiae* (Z72850) ließ sich durch eine PSI-BLAST-Suche nach der zweiten Iteration das Plasmodium falciparum-Protein PFB0275w mit einem E-Value von $2e^{-7}$ finden. Die PSI-BLAST-Suche mit PFB0275w führte im Gegenzug nicht zum Finden des Vitamin H-Transporters, der in der ersten Suche verwendet wurde. Mit der Proteinsequenz von AtSUC5 ließ sich PFB0275w nach vier Iterationen finden. In diesem Fall war der E-Value aber höher, was bedeutet, dass sich dieses Ergebnis leichter mit einer zufälligen Sequenz hätte erzielen lassen. Auch ließ sich hier mit PFB0275w als Suchsequenz AtSUC5 nicht wieder finden. Komplementationsversuche in Hefe im Labor von Prof. Dr. Lanzer führten nicht zu dem Ergebnis, dass PFB0275w Biotin transportiert.

Tab. 3.2: Verwendete Sequenzen von Biotintransportern

Organismus	Abkürzung	Gewebe	Transportertyp	Identifikation
<i>A. thaliana</i>	athaliana	nicht bekannt	AtSUC5	(Sauer, 2001)
<i>H. sapiens</i>	hum_intes	Darm	SMVT	AF081571
<i>H. sapiens</i>	hum_solut	nicht bekannt	SLC5A6	XM_002430
<i>O. cuniculus</i>	ocuniculu	Darm	SMVT	AF080067
<i>P. falciparum</i>	pfalcipar	nicht anwendbar	nicht bekannt	PFB0275w
<i>R. norvegicus</i>	rat_intes	Dünndarm	SMVT	AF081204
<i>S. cerevisiae</i>	scerevisi	nicht anwendbar	VHT1	Z72850

Es wurden mit Clustal X und Seaview die Sequenzen einiger bekannter Biotintransporter mit PFB0275w aligniert und das Ergebnis in Abb. 3.3 dargestellt.

Trotzdem wurde durch eine Prosite-Suche eine Domäne als hypothetischer Transporter der Major Facilitator Superfamily (MFS) identifiziert. Das bedeutet, dass die Sequenz PFB0275w für ein Transportprotein unbekannter Spezifität codieren kann. Die Art des transportierten Stoffes kann durch Genomanalyse weiter abgeleitet werden, dies ist aber im Detail hier nicht dargestellt.

3.2 Experimentelle Untersuchung eines zentralen eukaryontischen Redoxenzym: Kristalle der Glutathionreduktase

Bei der experimentellen Verifikation der Ergebnisse bioinformatischer Suchverfahren in Redoxnetzwerken braucht man eine aussagekräftige Messmethode des Gesamtredoxzustandes von Zellen. Die begrenzte Aussagekraft von reinen pH-Wertbestimmungen als Gradmesser von Redoxzuständen ganzer Zellen ist eine Einschränkung, die durch eine alternative Messmethode aufgehoben werden könnte. Die Glutathionreduktase ist als Redoxsensor in der Zelle sehr gut geeignet, weil viele Signale bei diesem Enzym integriert werden. Sie zeigt also ein viel genaueres Bild des Redoxzustandes einer Zelle als zum Beispiel die Messung eines pH-Wertes ergeben würde. Zwei Moleküle Glutathion (GSH) reagieren durch Oxidationsprozesse zu einem Molekül Glutathiondisulfid (GSSG). Durch diese reversible Reaktion stellt GSH das wichtigste Puffersystem für den Redoxzustand in der Zelle dar. Für biologische Reaktionen essentielle Thiol-Gruppen (SH-Gruppen) werden durch Glutathion geschützt oder wieder hergestellt. Das Enzym Glutathionreduktase (GR, EC 1.6.4.2) hält das Glutathion in reduziertem Zustand. Dabei ergibt sich ein Reaktionsgleichgewicht im Verhältnis 500 : 1 für GSH : GSSG als Produkt. Die Gesamtkonzentration des Glutathions in der Zelle beträgt bis zu 5 mM. So wird oxidativem Stress in der Zelle vorgebeugt. Das reduzierte Glutathion wird im Erythrozyten zusätzlich benötigt, um das Eisen als Zentralatom im Hämoglobin im zweiwertigen Zustand zu halten. Die Glutathionreduktase ist ein flavinhaltiges, NADPH-abhängiges Homodimer. Jede Untereinheit hat ein Gewicht von 50 kDa. Der Fluss der Elektronen läuft nicht direkt vom NADPH zur Disulfidbindung des oxidierten GSSG (Glutathiondisulfids). Stattdessen fließen die Elektronen über ein festgebundenes FAD und zwei Cysteinreste in einer Untereinheit schließlich zum GSSG. Dabei besteht jede Untereinheit aus drei Domänen: Eine Domäne bindet das FAD, eine Domäne das NADPH. Die dritte Domäne ist die Zwischendomäne, an der sich die Dimere zusammenlagern. FAD und NADPH werden in gestreckter Form gebunden, und der Isoalloxin- und Nicotinamidring sind einander benachbart. Interessant ist, dass die Bindungsstelle des oxidierten Glutathiondisulfids von der FAD-Domäne der einen und der Zwischendomäne der anderen Untereinheit gebildet wird.

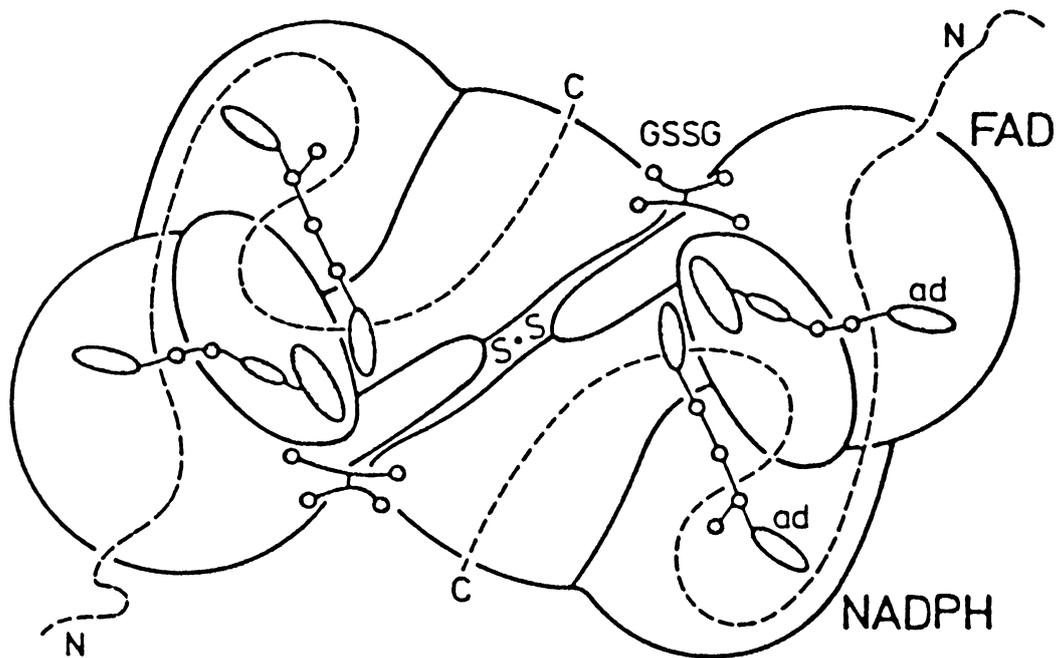


Abb. 3.4: Schema der Domänenstruktur der Glutathionreduktase. Zusätzlich sind die Liganden FAD, NADPH, GSSG und durch eine gestrichelte Linie der Verlauf der Hauptkette der beiden Monomere angedeutet, nach Schirmer et al. (1989).

Kristalle der Glutathionreduktase als Redoxsensor in lebenden Zellen

Glutathionreduktasekristalle sind als Sensor des Redoxzustandes einer Zelle sehr gut einsetzbar. Die GR-Kristalle zeigen einen charakteristischen Farbumschlag von oxidiertem (Gelb) zu reduziertem Zustand (Rot, siehe Abb. 3.5 und 3.6). Die Kristalle werden bei diesen Versuchen dazu verwendet, das Signal über den herrschenden Redoxzustand innerhalb der Zelle zu verstärken. Durch die hohe Glutathionreduktasedichte in den Kristallen läßt sich mit einem Mikroskop direkt ohne Photometer erfassen, wie sich der Redoxzustand geändert hat. Besonders wichtig ist, dass es mit dieser Methode möglich ist, den Redoxzustand von Zellkompartimenten in intakten Zellen zu bestimmen (Keese, 1997). Hier sollte jetzt untersucht werden, wie Zellen auf Veränderungen reagieren. Es sollte also nicht nur der Zustand nach einem Ereignis erfasst werden, sondern die Situation vor und nach einer Veränderung bestimmt werden. Dabei sind Krebszellen ein interessantes Untersuchungsobjekt (Das, 2002), aber auf diese Art können auch einige andere pathologische Bedingungen direkt gemessen werden wie zum Beispiel die Veränderung einer Zelle, nachdem verschiedene pharmakologisch wirksame Substanzen angewendet wurden.

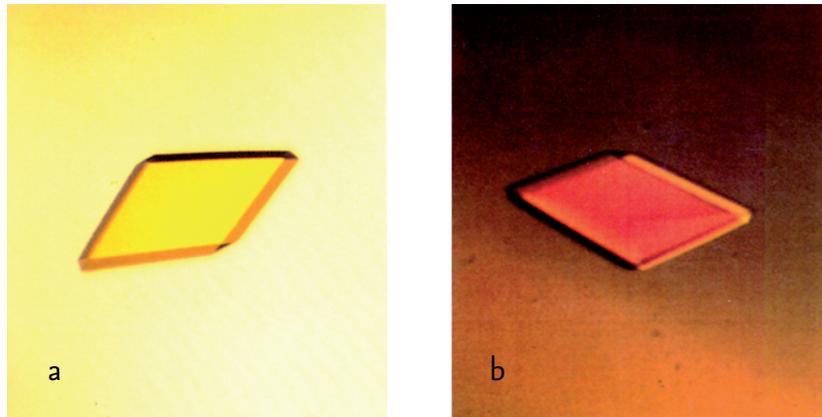


Abb. 3.5: Glutathionreduktasekristalle oxidiert (a) und reduziert (b), 300-fach vergrößert, nach Keese et al. (1999)

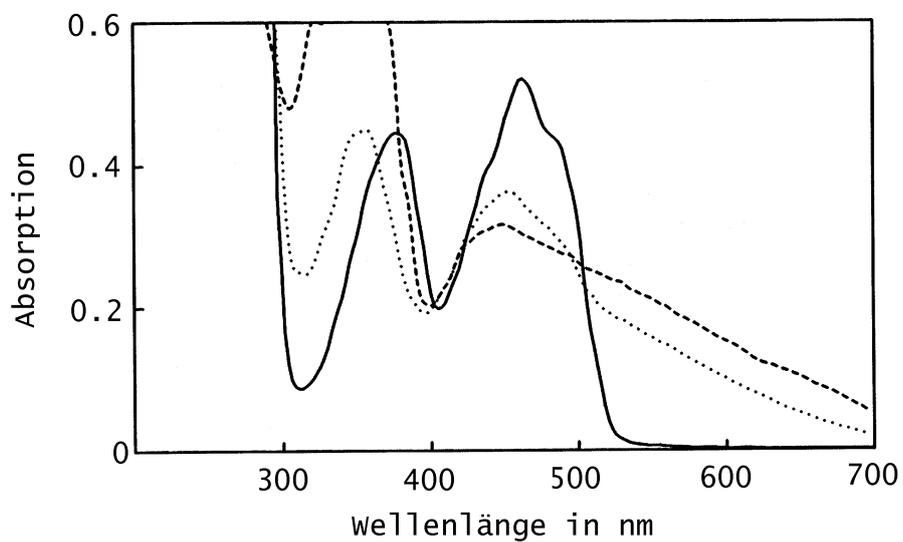


Abb. 3.6: Absorptionsspektrum oxidiertes und reduziertes Human-Glutathionreduktase. Vollständig oxidierte Glutathionreduktase (durchgehende Linie), GR mit 30 μM (gepunktete Linie) und 190 μM (gestrichelte Linie) NADPH, nach Keese (1997).

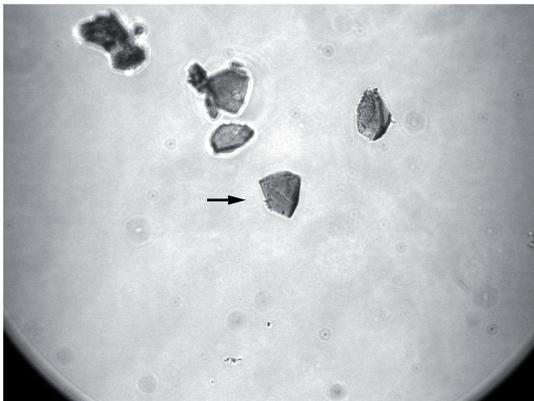
Fragestellung

Es gibt verschiedene Verfahren, wie Glutathionreduktasekristalle in die Zelle eingebracht werden können. Zum Beispiel können nach der „shot gun“-Methode die Kristalle unge richtet direkt in die Zellen geschossen werden, wie es mit DNA-beladenen Goldkugelchen gemacht wird. Dies hat den Nachteil, dass nicht genau bekannt ist, in welchen Zellen sich die Glutathionreduktasekristalle befinden. Wenn die Zellen identifiziert sind, hat der Farbumschlag schon stattgefunden, und es können keine vergleichenden Messungen am gleichen Kristall vorgenommen werden. Werden kleine Glaskanülen verwendet, um die Kristalle direkt in die Zellen zu injizieren, ist die Zelle zwar bekannt, aber es bleibt schwierig, die Kristalle in eine optimale Position zu bringen, um möglichst aussagekräftige Messungen machen zu können. Ziel ist es, diese Probleme durch digitale Bildverarbeitung zu umgehen. Es wurden zwei Messungen gemacht, vor und nach der Reduktion. Diese beiden Bilder wurden Pixel für Pixel durch einander geteilt. So wurde bei dieser in situ Messung der Einfluss der Zellmembran oder der Einfluss der Farbe des Cytosols eliminiert. Dies wurde möglich durch die Miniaturisierung bei gleichzeitiger Amplifikation des Signals der Kristalle der Glutathionreduktase.

Versuche

Zur direkten Messung der Kristalle wurde ein Mikroskop mit einem zwanzigfach vergrößernden Objektiv verwendet. Mit dem Okular ergab sich eine Gesamtvergrößerung von 200 x. Das Absorptionsspektrum einer Glutathionreduktaselösung in Abbildung 3.6 zeigt, wie stark die Änderungen bei 470 nm und 540 nm sind. Deshalb können durch Filter, die bei diesen Wellenlängen durchlässig sind, Aufnahmen gemacht werden, die sehr große Unterschiede vor und nach der Reduktion abbilden. Obwohl das Reduktionsmittel sehr vorsichtig zugegeben wurde, haben sich die Kristalle doch immer so stark bewegt, dass sie sich mit der Software nicht auswerten ließen. Deshalb wurde in Vorversuchen mit Hilfe einer speziellen Kammer, die von zwei runden Objektgläsern gebildet wurde, versucht, die Bewegung der Kristalle bei Zugabe des Reduktionsmittels zu unterbinden (Bertram et al., 2002a). Das Reduktionsmittel wurde dann durch eine Bohrung mit einer Kanüle zugegeben, und bei der elektronischen Bildverarbeitung wurden Masken um die Bereiche gelegt, die besonders gut zur Auswertung geeignet waren: Große Flächen auf den Kristallen möglichst abseits der Kanten und ohne Brüche wurden erfasst. Diese Masken als Region of interest (ROI) sind dann auf die Bilder vor und nach der Reduktion übertragen worden, und es wurde jeweils der Grauwert des Hintergrundes bestimmt und abgezogen. Danach fand eine Division Pixel durch Pixel statt, bei der jedes Pixel des Bildes, das mit dem 470 nm Filter gemacht wurde, durch das entsprechende Pixel des Bildes, das mit dem 540 nm Filter aufgenommen war, dividiert wurde. Diese Berechnun-

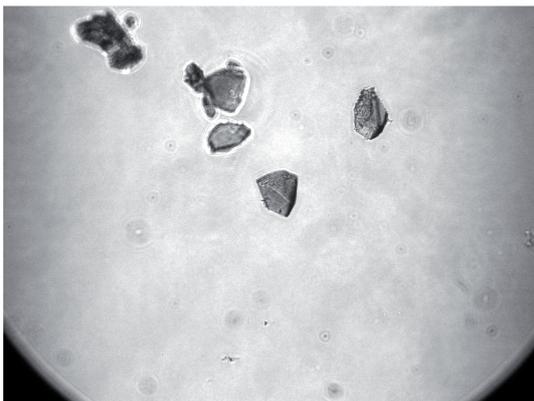
gen wurden für die Bedingungen vor und nach der Reduktion durchgeführt, und es stellte sich heraus, dass der vor der Reduktion berechnete Quotientendurchschnitt in dem durch die Maske ausgewählten Bereich größer war als der Quotientendurchschnitt, der an reduzierten Kristallen berechnet wurde (Quercia et al., 1993). Dies lässt sich auch an den Absorptionskurven des oxidierten und des reduzierten Zustandes der Glutathionreduktase in Abbildung 3.6 sehen. Trotz des Einschließens der Kristalle in die Versuchskammer kam es immer wieder zu Verschiebungen der Kristalle. Es wurde versucht die Folgen zu mildern, indem ein Verschiebungsvektor auf die Maske (Region of interest, ROI) zur Bestimmung der Messwerte angewandt wurde.



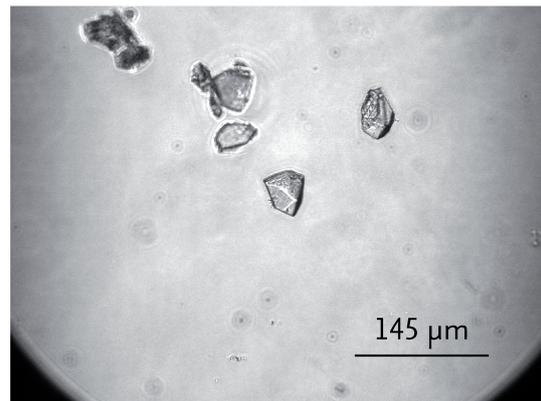
470 nm Filter, GR Kristalle oxidiert



540 nm Filter, GR Kristalle oxidiert



470 nm Filter, GR Kristalle reduziert



540 nm Filter, GR Kristalle reduziert

Abb. 3.7: Glutathionreduktasekristalle, vor und unverzüglich nach der Reduktion durch 1 mM DTT bei 470 nm und 540 nm photographiert. Durch einen Pfeil ist die zur Messung geeignete dreieckige Fläche des Kristalls markiert.

Sollte es aber bei der Bestimmung des Vektors zu Problemen kommen, weil es nicht nur eine Verschiebung des Kristalls, sondern zusätzlich eine leichte Drehung gegeben haben könnte, waren die Flächen, die gemessen wurden, oftmals nicht groß genug, um dies auszugleichen. Manchmal war die Messfläche nur etwas mehr als 30 Pixel groß. Dabei konnten geringe Fehler bezüglich des Verschiebungsvektors, zum Beispiel Brüche, die durch die ausgewählte Fläche gingen, oder eine unregelmäßige Färbung für Abweichungen sorgen. In Abbildung 3.7 ist eine Beispielaufnahme vor und nach der Reduktion zu sehen.

3.3 Analyse der metabolischen Flüsse der Glutathionreduktase als Mitglied eines komplexen Redoxnetzwerkes

Nachdem der Weg zu einer effektiveren Messmethode des Redoxzustandes lebender Zellen prinzipiell frei war, stellte sich die Frage nach Analysemethoden der um die Glutathionreduktase herum stattfindenden metabolischen Stoffflüsse. Die Elementarmoden mit der Oxidation und Reduktion von Glutathion im Zusammenspiel mit dem Pentosephosphatweg im menschlichen Erythrozyten wurden schon früher dargestellt (Schuster et al., 1998). Das System mit Glykolyse und Pentosephosphatweg habe ich durch Reaktionen des Redoxstoffwechsels im Rahmen dieses Projektes erweitert. Dabei dienten neben Originalliteratur vor allem KEGG (Kanehisa et al., 2002), WIT (WIT, 2002), Brenda (Schomburg et al., 2002) und die „Biochemical Pathways“ (Michal, 1999) als Grundlage. Dieses Elementarmodensystem wurde zunächst vom Experten analysiert, um möglichst eine Minimallösung zu finden, also ein kleines Elementarmodensystem, das widerspruchsfrei ist und somit als Testsystem für die Algorithmen und die Softwareplanung diene.

Es wurde versucht, die Anzahl der Elementarmoden von Hand zu minimieren. Dazu wurde die intern/extern-Definition der Metaboliten nach „Versuch und Irrtum“ überprüft. Dies sollte der Explosion der Anzahl der Elementarmoden entgegenwirken und interpretierbare Ergebnisse liefern. Es gibt aber keine (siehe unten) systematische Lösung in dem Sinn, dass in einem Elementarmodensystem mit schon wenigen Moden eine Änderung, die in einem anderen System zielführend war, auch hier zu noch weniger Elementarmoden führt. Damit war dieses Problem gut geeignet, um durch einen zusätzlichen computerbasierten Ansatz der Arbeitsgruppe von Herrn Moldenhauer mit untersucht zu werden.

Hier wurde ein Beispiel aus dem Redoxstoffwechsel mit Mitteln der Elementarmodenanalyse untersucht. Die Analyse von Elementarflüssen ist ein wertvolles Werkzeug in der Rekonstruktion von bakteriellen Stoffwechseln und für die Vorhersage von optimalen Erträgen in der Biotechnologie. Auf der anderen Seite besteht bei der Analyse von großen, komplexen Stoffwechselnetzwerken das Problem der kombinatorischen Explosion möglicher Wege durch das Netzwerk. Hier sollte das Problem der kombinatorischen Explosion durch die systematische Definition von Metaboliten als intern oder extern gelöst werden. Externe Metaboliten gelten als so zahlreich vorhanden, dass man sie als gepuffert ansieht. Diese Annahme ist auch für Metaboliten zulässig, die innerhalb der Zelle in sehr hohen Konzentrationen vorkommen. Dies trifft besonders auf Metaboliten an Verzweigungspunkten im Netzwerk zu. Es sollte herausgefunden werden, mit welcher Definition von Metaboliten intern/extern eine minimale Anzahl von Wegen durch das Netzwerk (elementaren Flussmoden) erreicht werden kann. Hier war das Ziel, ein System zu finden, das die Datenmenge und die Mehrdeutig- und Beliebigkeit bei der automatisierten systematischen Klassifikation der Metaboliten so weit wie möglich reduziert. Bei mittelgroßen Netzwerken kann die Lösung der kombinatorischen Minimalisierung noch durch eine umfangreiche Suche gelöst werden, wie sie auch hier am Anfang stand. Um automatisch auch größere Systeme zu optimieren, wurde ein Programm, basierend auf dem Metropolis-Algorithmus, entwickelt. Hier wurden zur Illustration beide Methoden der Optimierung von Hand und durch Algorithmen auf den Glutathionmetabolismus als größeres Netzwerk angewendet. In vielen Fällen gibt es konkrete biochemische Gründe, Metaboliten als intern oder extern zu definieren, zum Beispiel weil sie lediglich als Intermediat, als Nährstoff oder als aus der Zelle ausgeschleuster Stoff bekannt sind. Oft ist die Klassifikation der Metaboliten aber auch mehrdeutig. Zum Beispiel können ADP und ATP auf die eine oder die andere Art klassifiziert werden. Dies hängt davon ab, ob die Reaktionen in dem Modell diese häufig vorkommenden Metaboliten im Gleichgewicht halten können oder nicht. Auf die gleiche Weise kann auch eine Unsicherheit entstehen, weil langsame Reaktionen oft nicht mit in das Reaktionssystem eingeschlossen werden. Außerdem wird die Wahl der Anfangs- und Endpunkte der Reaktionswege vom Standpunkt und dem Ziel der Modellierung beeinflusst.

Betrachtet man zum Beispiel in Abbildung 3.8 (A) die möglichen Auf- oder Abbauewege von den Metaboliten P_1 bis P_5 , gibt es sechs Elementarmoden (siehe Tabelle 3.3). Andererseits könnte man sich neben dem Weg von P_1 zu P_2 auch für die Routen zu S_2 und die Wege von S_2 zu P_3 , P_4 und P_5 interessieren. Diese Wege können dann auch kombiniert werden, um über das Intermediat S_2 die Elementarmoden von P_1 zu P_3 , P_4 und P_5 zu bilden. Bei der Definition der Metaboliten als extern oder intern wurden zum Beispiel bei einem Ansatz die Wege von Glucose zu den Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und

Tyrosin (Simpson et al., 1999) und in einem zweiten die von Glucose zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), einem Vorläufermolekül dieser Aminosäuren, untersucht (Liao et al., 1996). Dabei wurde DHAP je nach Ansatz einmal als intern und einmal als extern definiert.

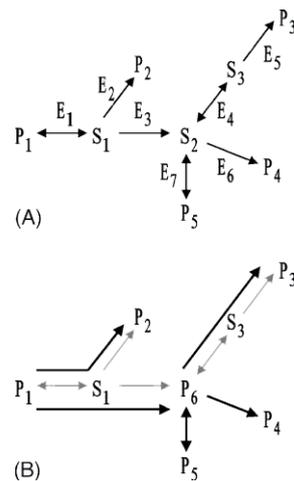


Abb. 3.8: (A) Einfaches Reaktionssystem, das die Abhängigkeit der Anzahl der Elementarmoden vom Status der Metaboliten (siehe Text) verdeutlicht. (B) Situation, bei der die Zahl der Elementarmoden (dunkle Linie) minimal ist. S_2 wird nun als P_6 bezeichnet, weil es als extern bewertet wird.

In komplexen und großen metabolischen Netzwerken kann die Anzahl von Elementarmoden sehr hoch sein und bei weitem die Zahl der Reaktionen überschreiten. Hier hat man es mit dem Problem der kombinatorischen Explosion der Anzahl der Elementarmoden zu tun. In einem Netzwerk mit 67 Reaktionen können sich zum Beispiel schon 467 Elementarmoden ergeben (van Dien et al., 2002). Im schlimmsten Fall steigt die Anzahl der Elementarmoden exponentiell mit der Zahl der Reaktionen (Mavrovouniotis et al., 1990). Das Vorkommen einer Menge Elementarmoden zeigt, dass das biochemische Netzwerk sehr robust gegenüber Mutation ist. Trotzdem führt die biochemische Interpretation der Elementarmoden durch den menschlichen Betrachter zu Problemen, wenn ihre Anzahl zu groß ist. Zusätzlich kann es bei den Computerprogrammen zu Problemen mit dem Hauptspeicher und mit der Laufzeit bei den Berechnungen kommen.

Tab. 3.3: Elementarmoden für das in Abbildung 3.8 dargestellte System^a

External metabolites	Enzymes involved	Overall stoichiometry
P ₁ , P ₂ , P ₃ , P ₄ , P ₅	{E ₁ , E ₂ }	P ₁ → P ₂
	{E ₁ , E ₃ , E ₄ , E ₅ }	P ₁ → P ₃
	{E ₁ , E ₃ , E ₆ }	P ₁ → P ₄
	{E ₁ , E ₃ , E ₇ }	P ₁ → P ₅
	{-E ₇ , E ₄ , E ₅ }	P ₅ → P ₃
	{-E ₇ , E ₆ }	P ₅ → P ₄
P ₁ , P ₂ , P ₃ , P ₄ , P ₅ , S ₁	{E ₁ }	P ₁ ↔ S ₁
	{E ₂ }	S ₁ → P ₂
	{E ₃ , E ₄ , E ₅ }	S ₁ → P ₃
	{E ₃ , E ₆ }	S ₁ → P ₄
	{E ₃ , E ₇ }	S ₁ → P ₅
	{-E ₇ , E ₄ , E ₅ }	P ₅ → P ₃
	{-E ₇ , E ₆ }	P ₅ → P ₄
P ₁ , P ₂ , P ₃ , P ₄ , P ₅ , S ₂	{E ₁ , E ₂ }	P ₁ → P ₂
	{E ₁ , E ₃ }	P ₁ → S ₂
	{E ₄ , E ₅ }	S ₂ → P ₃
	{E ₆ }	S ₂ → P ₄
	{E ₇ }	S ₂ ↔ P ₅

^a Reversible modes (indicated by ↔) are here counted once rather than in the two directions separately.

Wichtig ist, dass die Anzahl der resultierenden Elementarmoden von der Definition der Metaboliten als intern oder extern abhängt. Dabei ist die Abhängigkeit nicht trivial: Wird der Status eines Metaboliten verändert, kann die Zahl der Elementarmoden steigen oder fallen oder sich nicht verändern. Hier überlagern sich zwei verschiedene Tendenzen: Wird auf der einen Seite der Status eines Metaboliten von intern nach extern verändert, muss die Bedingung, dass genauso viel von diesem Metaboliten auf- wie abgebaut wird, nicht mehr erfüllt sein. Damit steigt die Anzahl der Freiheitsgrade dieses Systems. Zum Beispiel bei dem Elementarmodensystem in Abbildung 3.8 (A) würde die Anzahl der Moden von sechs auf sieben steigen, wenn S₁ extern statt intern ist (siehe Tabelle 3.3). Auf der anderen Seite kommt es zu einer kombinatorischen Explosion der Anzahl der Elementarmoden, weil mit mehr externen Metaboliten Fragmente von Wegen neu kombiniert werden können. Dies kann verhindert werden, wenn man geeignete, wie zum Beispiel stark vernetzte Metaboliten als extern bewertet und so die Teilwege einzeln betrachten kann. Eine solche Aufteilung in einzelne Wege statt einer Kombination vieler Teilwege kann man in Abbildung 3.8 (A) erkennen, wenn S₂ statt S₁ als extern bewertet wird. Dann fällt die Zahl der Elementarmoden von sieben (S₁ extern) auf fünf (S₂ extern, siehe Tabelle 3.3). Metabolische Netzwerke sollten, wie jede wissenschaftliche Beschreibung der Welt, so prägnant wie möglich sein. Geleitet vom Prinzip von „Ockham's razor“ wollen wir erreichen, dass die Datenmenge zur Beschreibung des Systems so weit wie möglich reduziert ist. Eine interessante Analogie ist die Definition der Kolmogorow-Komplexität: Gesucht ist die Länge des kürzesten Computerprogramms, das einen Prozess oder ein System beschreibt (Li et al., 1997). Je besser eine Theorie die Schlüssel-

datensätze zum Erkennen eines bestimmten Phänomens komprimiert, um so besser kann die Theorie verstanden und angewendet werden.

Hier schlagen wir vor, zur Klassifikation der Metaboliten die Strukturdaten so zu komprimieren, dass die Anzahl der Elementarmoden minimiert wird. Neben dem Gedanken der Kolmogorow-Komplexität war dies hauptsächlich durch das Ziel motiviert, alle Mehrdeutig- und Beliebigkeiten in der Klassifikation der Metaboliten zu vermeiden und eine Einteilung stattdessen auf automatisierte, systematische Weise vorzunehmen. Die Betrachtung von Regeln an Extrempunkten ist in der Wissenschaft eine übliche Vorgehensweise. In Abbildung 3.8 (A) folgt aus der Minimierung der Zahl der Elementarmoden, dass S_2 als extern behandelt wird. Jeder Fluss von Metaboliten in der lebenden Zelle ist darstellbar als eine Linearkombination von Elementarmoden (Schuster et al., 2000b). Mit dem oben beschriebenen Minimalitätskriterium wurde versucht, die minimale Basis zu finden, mit der sich alle Flussverteilungen darstellen lassen.

Es gibt jedoch Netzwerke, bei denen die minimale Anzahl an Elementarmoden erreicht wird, wenn einige Enzyme gar nicht an den Reaktionen teilnehmen. Würde man bei den Reaktionen in Abbildung 3.8 (A) erzwingen, dass die beiden Produkte P_2 und P_3 intern sein müssen, obwohl sie nicht durch weitere Reaktionen verbraucht und damit balanciert werden können, würde man nur drei Elementarmoden bekommen. Die Reaktionen, die von den Enzymen E_2 , E_4 und E_5 katalysiert werden, würden in diesem Elementarmodensystem nicht vorkommen. Um dieses Artefakt zu vermeiden, berücksichtigen wir nur Situationen, bei denen alle Enzyme verwendet werden. Die Nützlichkeit des betrachteten Minimierungskriteriums wird bei einer unverzweigten Reaktionskette besonders deutlich. Wären in Abbildung 3.8 (A) nur die Enzyme E_1 , E_3 , E_4 und E_5 gegeben, würde die minimale Anzahl der Elementarmoden erreicht, wenn – und nur dann, wenn – die Metaboliten S_1 - S_3 intern und P_1 und P_3 extern wären. Das korrespondiert sehr schön mit der Vorstellung, die Biochemiker üblicherweise von so einer Reaktionskette haben: Sie betrachten sie als einen einzigen Auf- oder Abbauweg.

Die Fragestellung der Minimierung der Anzahl der Elementarmoden kann mehrere Lösungen haben. Verschiedene Lösungsmöglichkeiten sind in diesem Fall denkbar: Wenn eine originale, biochemisch motivierte Klassifikation bekannt ist oder angenommen werden kann, besteht eine Möglichkeit darin, die Ergebnisse auszuwählen, bei denen die Anzahl zusätzlich als extern definierter Metaboliten minimal ist. Dies wurde gemacht, um die Änderung am originalen Modell so gering wie möglich zu halten. Aber auch diese Auswahl könnte immer noch mehrfache Lösungen beinhalten. In diesen Fällen wer-

den sich die Elementarmoden meist unterscheiden, und es muss eine weitere Auswahl getroffen werden.

Um die minimale – oder maximale – Anzahl an Elementarmoden bei sich ändernder Klassifikation der Metaboliten als extern oder intern zu finden, kann man alle möglichen 2^m Kombinationen der externen/internen Metaboliten erzeugen. Dabei steht m für die Anzahl an Metaboliten mit variablen Status. Um die große Menge von 2^m Kombinationen beträchtlich zu reduzieren, kann man verschiedene Struktureigenschaften des Netzwerkes mit einbeziehen. Als erster Schritt: Nur Metaboliten an Verzweigungen von Abbau- oder Aufbauwegen brauchen von intern zu extern und *vice versa* neu bewertet zu werden. Metaboliten markieren Verzweigungspunkte, wenn sie nicht nur in irreversiblen Reaktionen gebildet oder verbraucht werden und an mindestens drei Reaktionen beteiligt sind. Hier helfen neu in Metatool 4.3 integrierte Funktionen, mit denen die Vernetzung der Metaboliten bestimmt wird. Die Anzahl der Metaboliten an Verzweigungspunkten wird mit b bezeichnet. In einem zweiten Schritt werden Metaboliten, die nur einmal produziert und nur einmal verbraucht werden, als intern gesetzt, denn sie kommen nur in nicht verzweigten Reaktionsketten vor. In Abbildung 3.8 (A) sollte zum Beispiel S_3 als intern gesetzt werden. Zusätzlich sollten nicht balancierte Metaboliten am Anfang oder am Ende eines Weges (so genannte „source“ oder „sink“ Metaboliten) wie P_1 oder P_2 und P_3 als extern betrachtet werden. Ein Algorithmus, um alle 2^b Kombinationen zu berechnen, wurde in das Programm EI_EXCHANGE implementiert (Dandekar et al., 2003). Die hier verwendete Version erlaubte noch keine Vordefinition von externen Metaboliten. Das spielte aber keine Rolle, denn wenn ein Metabolit diesen Status aus biochemischen Gründen haben musste, konnte er aus der Eingabedatei entfernt werden. Dabei war zu beachten, dass externe Metaboliten auch nicht notwendigerweise in den Eingabedateien von Metatool spezifiziert werden mussten. In dem Programm EI_EXCHANGE steckt der Algorithmus aus Metatool, um die Elementarmoden für jede neue Kombination von internen/externen Metaboliten zu berechnen. In der Ausgabedatei von EI_EXCHANGE wird die Anzahl der Elementarmoden, die Anzahl der Enzyme pro Elementarmodus und die Anzahl der externen Metaboliten aufgelistet. Zusätzlich wird die durchschnittliche Anzahl der Enzyme pro Elementarmodus für jede Kombination berechnet. Selbst wenn nur die 2^b Kombinationen der b Metaboliten an Verzweigungspunkten statt aller Kombinationen von 2^m untersucht werden, kann eine erschöpfende Suche mit Computern Probleme bei der Berechnung von großen Netzwerken bringen. Eine Alternative besteht darin, stochastische Optimierungsmethoden anzuwenden, die nur eine Teilmenge von Kombinationen berücksichtigen, um eine annehmbare Lösung mit einer geringer Zahl an Elementarmoden in vergleichsweise kurzer Zeit bearbeiten zu können. Passende Methoden könnten der Metropolis-Algorithmus, simulier-

te Bindung von DNA Helices, evolutionäre Optimierung und andere stochastische Methoden sein. Wir verwendeten hier den Metropolis-Algorithmus (Metropolis et al., 1953), um zu zeigen, dass stochastische Optimierungsroutinen prinzipiell nützlich sind, um das hier beschriebene Problem zu lösen. Dieser Algorithmus ist eine Monte Carlo-Methode, bei der neue Fälle (hier neue Kombinationen von externen/internen Metaboliten) zufällig erzeugt werden. Dann wird jeweils der Wert der Zielfunktion, der minimiert werden soll, berechnet. Danach wird die Differenz Δz von diesem Wert und dem vorher errechneten Wert der Zielfunktion bestimmt. Der neue Fall wird mit der Wahrscheinlichkeit Q akzeptiert, wobei gilt:

$$Q = \begin{cases} 1, & \text{wenn } \Delta z \leq 0 \\ e^{-\frac{\Delta z}{T}}, & \text{wenn } \Delta z > 0 \end{cases} \quad (2)$$

Dabei wird T als Temperatur bezeichnet, weil der Algorithmus auch verwendet werden kann, um die Entspannung von thermodynamischen Systemen zum Zustand der minimalen Energie (Kundu et al., 1998) zu berechnen. Bei anderen Anwendungen spielt T die Rolle eines formalen Parameters, der vom Anwender gewählt werden kann. Der exponentielle Term in Gleichung (2) repräsentiert eine Boltzmann-Verteilung.

Der Metropolis-Algorithmus führt nicht notwendigerweise zu einem globalen Minimum. Trotzdem war jede beträchtliche Reduktion der Anzahl der Elementarmoden in diesem Zusammenhang hilfreich. Für große Systeme konnte nur ein Kompromiss zwischen der Reduktion der Elementarmodenanzahl und der Laufzeit des Programms erreicht werden. Der Metropolis-Algorithmus wurde als C-Programm implementiert (Bulik et al., 2002), das Metatool als Unterprogramm aufrufen kann. Bei diesem Programm ergab die Zielfunktion z die Anzahl der Elementarmoden. Das Programm startete, indem es alle Metaboliten an Verzweigungspunkten (siehe oben) als extern annahm. Das bedeutet, dass jede Reaktion, die Metaboliten an Verzweigungspunkten verbindet, einen eigenen Elementarmodus bildet. In Abbildung 3.8 (A) wären die Reaktionen mit $\{E_4, E_5\}$ ein solcher Elementarmodus, der einen Verzweigungspunkt mit einem Endpunkt verbindet. Im nächsten Schritt wurde zufällig einer der Metaboliten an Verzweigungspunkten ausgewählt und mit dem internen Status versehen, und die Zahl der Elementarmoden wurde erneut berechnet. Die neue Zusammensetzung der Metaboliten wurde gemäß Gleichung (2) angenommen oder verworfen. Nicht balancierte Metaboliten (am Anfang oder Ende von Reaktionswegen, nur an einer Reaktion teilnehmend) wurden immer als extern in die Rechnungen einbezogen. Wie schon erwähnt, sollten aus biologischen Gründen

Metaboliten als extern zu setzen sein, sollten sie aus der Eingabedatei für Metatool entfernt werden. Der Parameter T ist in dem Programm vom Schalter „Epsilon“ kontrolliert, der für $1/T$ steht. Wenn der neue Fall verworfen wird, wird der Status eines anderen Metaboliten an einer Verzweigung nach intern geändert. Dieses Verfahren stoppt nach einer vom Benutzer vorgegebenen Anzahl von Wiederholungen. So kann man im Voraus entscheiden, wie viel Laufzeit des Computers man investieren möchte, um eine möglichst kleine, aber nicht notwendigerweise minimale Anzahl von Elementarmoden zu finden. Um die Anzahl der Wiederholungen zu finden, kann mit 2^b die Anzahl der Schritte für eine erschöpfende Suche als Anhaltspunkt dienen. Der Benutzer, der die Laufzeit limitieren möchte, nimmt dann einen Bruchteil dieses Wertes. Das Programm erzeugt zwei Ausgabedateien. Die erste Datei enthält ein Protokoll aller Iterationen, gibt die Anzahl der Elementarmoden und die Anzahl der verwendeten Enzyme an, listet die Zahl der externen Metaboliten auf und gibt diese Metaboliten auch an. Die zweite Datei enthält ähnliche Informationen für die Fälle, in denen die Anzahl der Elementarmoden minimal sind. Zusätzlich sind hier die Elementarmoden ausführlich in Matrixform zu finden.

Um die Leistung des Programms zu prüfen, wurde das Beispiel aus Abbildung 3.9 in eine Eingabedatei übersetzt. Es kann als Reaktionskette von zehn Sätzen mit je drei Isoenzymen und zusätzlich einer Reaktion, die nur von einem Enzym katalysiert wird (von S_5 nach S_6), betrachtet werden. Wenn die „source“ und „sink“ Metaboliten P_1 und P_2 als extern und alle anderen Metaboliten S_{1-10} als intern bewertet werden, dann bekommt man schon ein System mit $3^{10} = 59049$ Elementarmoden. Die Größe des Systems ist so umfangreich, dass nicht nur eine erschöpfende Suche nach allen Möglichkeiten, sondern auch schon die Berechnung aller Elementarmoden für einen bestimmten Fall lange Zeit braucht. Die Frage stellt sich, ob ein stochastisches Programm die Laufzeit des Programms deutlich reduzieren kann.

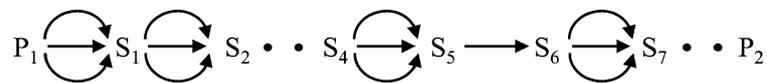


Abb. 3.9: Hypothetisches Reaktionssystem mit zehn Reaktionen, bei denen jede von drei Isoenzymen und eine von nur einem Enzym katalysiert wird. Die Punkte sind Auslassungszeichen für nicht dargestellte Reaktionen mit drei Isoenzymen.

Es ist einfach zu erkennen, dass, um die Anzahl der Elementarmoden z zu senken, es vorteilhaft ist, zum Beispiel S_1 als extern einzustufen, egal, wie die anderen Metaboliten bewertet werden. Das gilt für alle S_{1-10} , außer für S_5 und S_6 . Von diesen beiden sollte einer intern und der andere extern sein, um z zu minimieren. Tatsächlich ist das System hier so angelegt, dass es analytisch gelöst werden kann und zwei Lösungen mit der gleichen Anzahl von $z = 30$ (3 Isoenzyme \times 10 Reaktionen) hat. Die einzelne Reaktion von S_5 zu S_6 ist in einem Elementarmodus mit einem der drei Isoenzyme von S_4 oder S_6 eingeschlossen (weil bei diesem minimalen System entweder S_5 oder S_6 als intern bewertet werden). In der Situation zu Beginn des Laufs, wenn alle Metaboliten extern sind, ist z gleich der Anzahl der Reaktionen und damit 31.

Um das Metropolisprogramm laufen zu lassen, wurde aus Vereinfachungsgründen $T = 1$ gewählt und das Programm 30 mal ausgeführt, um eine Statistik zu erhalten, wie schnell die Lösungen gefunden werden (das Programm wurde auch mit $1/T = 5$ laufen gelassen, siehe weiter unten). Ähnliche Berechnungen wurden auch für drei weitere Systeme durchgeführt. Zum Beispiel das Reaktionsnetzwerk, das den Calvin-Zyklus beschreibt, mit dem Pflanzen im Tageslicht Energie speichern, besteht aus 25 Reaktionen mit 13 Metaboliten an Verzweigungspunkten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 zu sehen. Die minimale Anzahl der Elementarmoden und die Vielzahl der Lösungen wurde durch das Programm EI_EXCHANGE bestätigt. Man kann in Tabelle 3.4 sehen, dass das Metropolisprogramm im Vergleich zu einer erschöpfenden Suche für alle untersuchten Systeme eine signifikant geringere Zahl von Schritten braucht, um ein Minimum zu finden. Dies gilt auch, wenn man anerkennt, dass bei erschöpfenden Suchen ein erstes Minimum bei weniger als 2^b Schritten gefunden wird, zum Beispiel bei $(2^b + 1) / 2$, wenn die Anzahl der Minima q ist und $q = 1$ ist. Die Zahl der Iterationen, die beim Metropolis-Algorithmus benötigt werden, um ein Minimum zu finden, variiert, weil das Programm Zufallszahlen verwendet. Bei dem hypothetischen Reaktionssystem, das in Abbildung 3.9 gezeigt wird, ist die maximale Anzahl von Schritten, um alle Minima der Elementarmoden zu finden, mit über 30 Läufen viel geringer als die Anzahl von $2^{10} / 3$. Es reichen also ungefähr 341 Schritte im Durchschnitt, um bei einer erschöpfenden Suche das erste Minimum an Elementarmoden zu finden. Die am Ende notwendige Zahl an Schritten ist etwas höher, denn man muss überprüfen, ob sich nicht in weiteren Schritten noch Verbesserungen ergeben. Auch das Finden aller Minima geht mit dem Metropolis-Algorithmus schneller als mit einer Suche über alle möglichen Kombinationen. Trotzdem hat der Metropolis-Algorithmus Nachteile, wenn es um die maximal benötigte Anzahl von Schritten zum Finden aller Minima geht, wie beim Reaktionssystem der Glykolyse mit dem Pentosephosphatweg und den Nukleotiden zu sehen ist. Nicht unerwähnt bleiben soll, dass der Metropolis-Algorithmus gut geeignet ist, ein beliebiges Minimum zu finden. Aber es

kann sein, dass dieser Algorithmus bei bestimmten Systemen weniger gut geeignet ist, alle Minima zu entdecken.

Tab. 3.4: Statistik der Leistungsstärke des Metropolisprogramms^a

Reaction system	Average/maximum number of steps to find one global minimum	Average/maximum number of steps to find all global minima	Minimal number of elementary modes	Multiplicity of solution	Total step number in exhaustive search
Hypothetical system with isoenzymes (Abb. 3.8)	8.4/51	64.4/207	30	2	$2^{10} = 1024$
Glycolysis/pentose phosphate pathway ^b	83.4/395	148/553	2	3	$2^9 = 512$
Part of nucleotide metabolism ^c	33/114	81.7/370	6	2	$2^8 = 256$
Calvin cycle at daytime ^d	106/288	894/2021	7	15	$2^{13} = 8192$

^a Die Anzahl der Läufe war 30 für jedes System.

^b Schuster (2000b).

^c Schuster (2002b).

^d Nicht veröffentlicht. Die Eingabedateien sind verfügbar.

Lässt man das Programm mit dem Parameter $1/T = 5$ laufen, besteht das Ergebnis für das hypothetische Reaktionssystem aus Abbildung 3.9 und das Nukleotidreaktionssystem darin, dass die durchschnittliche und maximale Anzahl an Schritten, um das erste Minimum an Elementarmoden zu erreichen, gefallen ist. Auf der anderen Seite ist die Anzahl der Rechenschritte, um alle Minima zu finden, für alle vier Systeme gestiegen. Dies ist gut zu verstehen, denn wenn man die „Temperatur“ absenkt, ist die Abkühlung schneller, aber bei dieser Methode kann die Suche beim ersten Minimum stecken bleiben. Aus diesem Grund hängt die optimal gewählte „Temperatur“ T auch von der Anzahl der Minima q ab. Außerdem sollte betont werden, dass der Metropolis-Algorithmus hauptsächlich Fälle überprüft, in denen die Anzahl an Elementarmoden minimal ist. Das führt dazu, dass die Berechnungszeit eines durchschnittlichen Schrittes kürzer ist als bei einer erschöpfenden Suche – weniger Elementarmoden im Ergebnis benötigen einfach weniger Zeit bei der Berechnung als das Beharren darauf, alle Ergebnisse, auch die mit besonders zahlreichen Elementarmoden, zu berechnen. Die Laufzeit des Metropolisprogramms ist sehr kurz: Die Berechnung von 1000 Schritten benötigt weniger als 2 Sekunden mit einem 500 MHz Pentium Computer.

Die geringe Anzahl von nur zwei Elementarmoden als Minimum bei der Berechnung des Glykolyse/Pentosephosphatweges in Tabelle 3.4 tritt auf, wenn alle Cofaktoren (ATP, ADP, NAD^+ , ...) entweder intern oder extern sind. Wenn sie als extern definiert sind, was

biochemisch für dieses System mehr Sinn macht, ist die minimale Anzahl an Elementarmoden $z = 7$ und auch die minimale Anzahl an externen Metaboliten wurde schon untersucht (Schuster et al., 2000b). Bei einer anderen Lösung mit $z = 7$ muss zusätzlich Fructose-6-phosphat extern sein. Wenn im Nukleotidsystem die Cofaktoren als extern definiert werden, kann die bisherige minimale Anzahl an Elementarmoden von $z = 11$ (Schuster et al., 2002b) auf sieben gesenkt werden. Es gibt keine weitere Lösung, in der durch nur sieben Elementarmoden das Nukleotidsystem beschrieben werden kann. Hier müssen dann im Vergleich zur vorherigen Lösung AMP und Ribose-5-phosphat noch zusätzlich als extern eingestuft werden.

Biologisches Beispiel - Das biochemische Netzwerk

Um die oben beschriebenen Methoden zu veranschaulichen, betrachten wir als ein umfangreicheres Reaktionssystem in Abbildung 3.10 den Glutathionmetabolismus (Becker et al., 1999). In dem Reaktionsschema verbinden 59 biochemische Reaktionen (siehe Tabelle 8.2) 79 Metaboliten (siehe Tabelle 8.3). Dabei wurden anorganisches Phosphat und dissoziiertes und nicht dissoziiertes Wasser aus Vereinfachungsgründen nicht mit aufgenommen. Diese beiden Metaboliten nehmen an so vielen Reaktionen teil, dass sie in jedem Fall als extern gelten. Bei den Metaboliten in Tabelle 8.3 kommen zwölf in jeweils genau zwei Reaktionen mit Aufbau und Verbrauch der Metaboliten vor. Diese Situation muss unterschieden werden von Metaboliten wie CO_2 , die in zwei Reaktionen synthetisiert oder verbraucht werden. Von den Metaboliten sind nach den hier verwendeten Definitionen 19 an Verzweigungspunkten zu finden.

Ergebnisse der Berechnungen (Beispiel Glutathionmetabolismus)

Die Metaboliten an Verzweigungspunkten führen zu $2^{19} = 524288$ Kombinationen der interessierenden Metaboliten. Dies ist ein Wert, dem das Programm EI_EXCHANGE gewachsen ist, und mit einem PC mit 455 MHz Intel Pentium-Prozessor hat die Berechnung ungefähr 96 Stunden gedauert. Die Frequenzverteilung aller möglichen Kombinationen von internen/externen Metaboliten ist in Abbildung 3.11 gezeigt. Die minimale Anzahl an Elementarmoden ist 42. Es gibt 48 unterschiedliche Lösungen dieser Minimierungsaufgabe, die sich in der Anzahl der Metaboliten, die extern sind, unterscheiden. Die minimale Anzahl an externen Metaboliten, mit der das Minimum von Elementarmoden erreicht wird, ist 57. Dies ergibt sich nur in vier von 48 Fällen. Die maximale Anzahl an externen Metaboliten, mit denen die minimale Anzahl der Elementarmoden erreicht wird, ist 59. Damit sind im besten Fall bei 57 externen Metaboliten neben den zwölf Metaboliten, die in verschiedenen Reaktionen vorkommen und deshalb sowieso intern sind, nur zehn weitere Metaboliten als intern gesetzt.

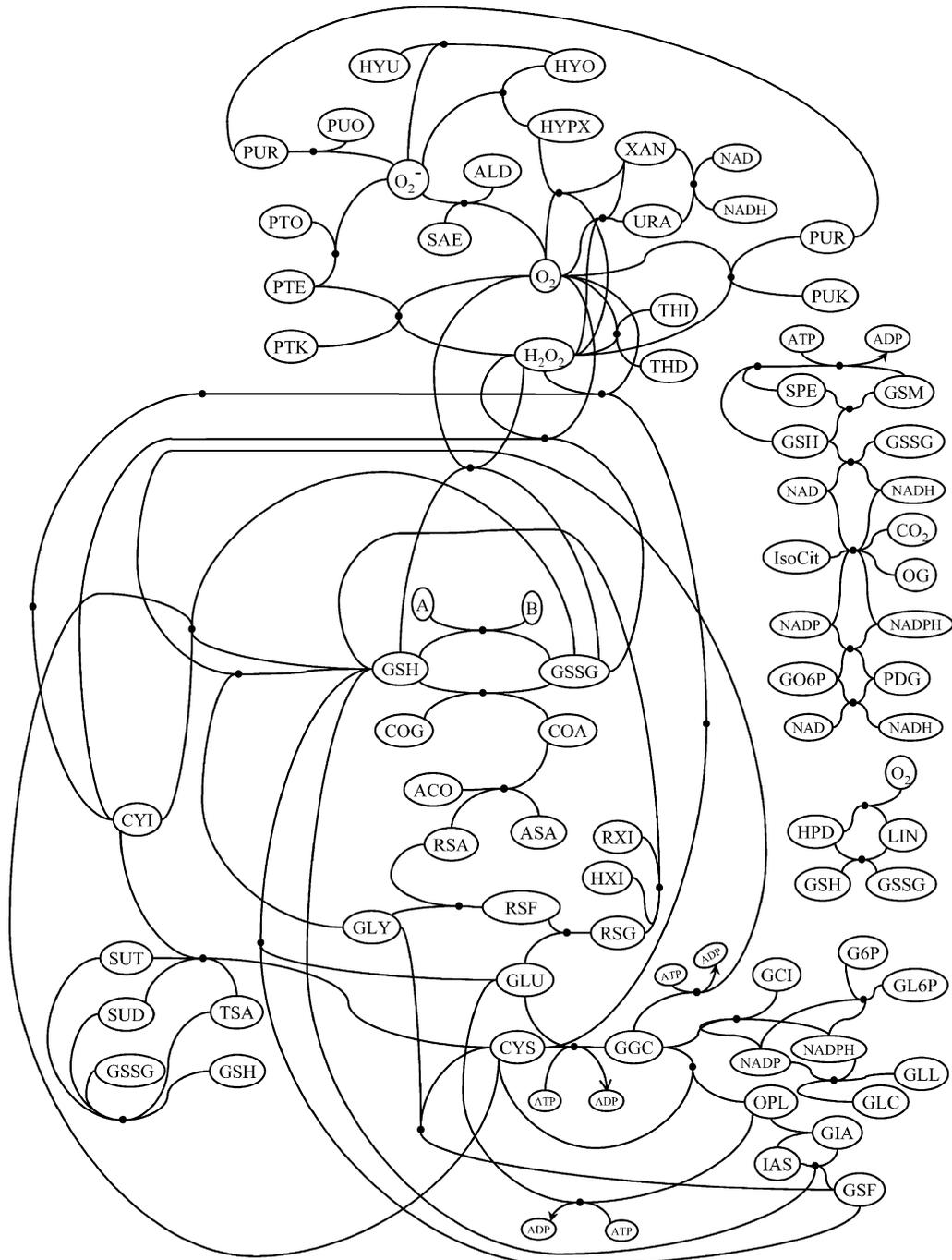


Abb. 3.10: Glutathionmetabolismus. Namen der Reaktionen und Metaboliten siehe Tabellen 8.2 und 8.3.

Danach wurde das Programm mit dem Metropolis-Algorithmus auf dieses Beispiel angesetzt. Durch Versuch und Irrtum wurde $1/T = 5$ als optimaler Wert zum schnellsten Finden des ersten Minimums ermittelt. Es gibt zwar Methoden, um die Optimierung der „Temperatur“ zu automatisieren. Sie wurden aber hier nicht angewandt, weil es in diesem Fall nur darum ging, zu zeigen, dass die stochastischen Optimierungsroutinen im Prinzip hier anzuwenden sind. Wählte man $1/T = 5$, brauchte es, bis eine der Minimumsituationen von 42 Elementarmoden mit 57 externen Metaboliten gefunden war, nur 90 Iterationen, die in 20 Sekunden mit dem oben genannten Computer berechnet waren. Dies ist eine sehr bemerkenswerte Reduktion der Laufzeit des Programms, verglichen mit einer erschöpfenden Suche. Lässt man das Programm laufen, kann man sehen, dass das Minimierungsproblem eine sehr zerklüftete Zielfunktion hat. Die Änderung des Status eines einzigen Metaboliten kann die Anzahl der Elementarmoden mehr als verdoppeln, zum Beispiel von 43 auf 109. Dies zeigt ein weiteres Mal, dass Standardmethoden zur Minimierung hier nicht wirken.

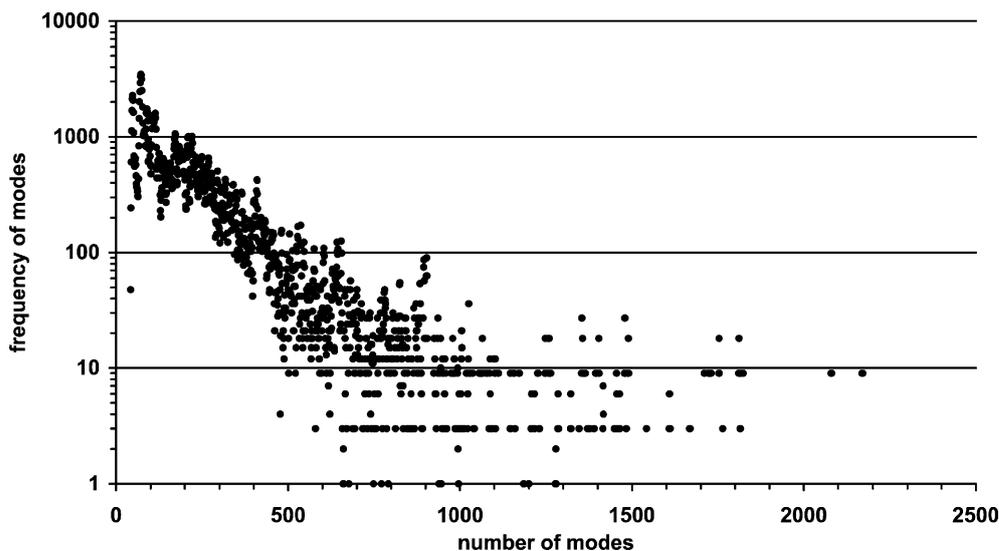


Abb. 3.11: Frequenzverteilung der Elementarmoden des Glutathionmetabolismus (logarithmische Achse) bei Änderung des Status der Metaboliten als intern oder extern. Frequenz bedeutet in diesem Zusammenhang die Anzahl von Situationen, in der eine gegebene Anzahl von Elementarmoden vorkommt. Es sind nur die Kombinationen abgebildet (229888), bei denen alle 59 Reaktionen in mindestens einem Elementarmodus vorkommen. Die minimale Anzahl von Elementarmoden (42) tritt in 48 Kombinationen auf, die maximale Elementarmodenanzahl (2170) kommt bei neun Kombinationen vor. Die Anzahl von 72 Elementarmoden tritt mit einer Frequenz von 3462 Kombinationen am häufigsten auf.

Biochemische Interpretation

In Tabelle 8.3 ist die Klassifikation von externen und internen Metaboliten der optimalen Lösung angegeben, die nach weniger als 100 Iterationen durch den Metropolis-Algorithmus gefunden wurden. So weit es zu erkennen war, gab es im Vergleich zu den anderen drei Lösungen der erschöpfenden Suche keine Vor- oder Nachteile. Die Elementarmoden, die die Lösung der Tabelle 8.3 als Eingabedatei ergibt, kann biochemisch wie folgt interpretiert werden: In 19 Elementarmoden kommt jeweils nur ein Enzym vor. Dies ist der Fall, weil das untersuchte System viele Substanzen enthält, die nicht in weiteren Reaktionen auftauchen. Jede Reaktion, die zwei terminale Metaboliten verbindet, ergibt einen eigenen Elementarmodus. Zwei Elementarmoden beinhalten die Oxidation von zwei Substanzen, Linolensäure und Cystein, durch molekularen Sauerstoff und die anschließende Reduktion dieser Stoffe durch GSH. Der Modus {Gcy, TttII} steht für die Spaltung von Thiosulfat in Sulfid und Sulfat und die Schaffung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen (ergibt Cystin). Danach wird die Disulfidbrücke wieder gelöst und GSH oxidiert. Vier Elementarmoden zeigen die Regeneration von GSH zu GSSG durch die Oxidation von NADPH. Zur Reduktion zu NADPH kommt es entweder durch die Oxidation von Glucose, Glucose-6-phosphat, Isocitrat oder 6-Phosphogluconat. Der Modus {HypI, -Xdn, G6pdI} zeigt die Oxidation von Glucose-6-phosphat durch molekularen Sauerstoff zu GL6P und H₂O₂. Zwei weitere Elementarmoden beschreiben ähnliche Prozesse für Isocitrat und 6-Phosphogluconat. Der Elementarmodus {(2Gcl), Gcrl, Gcy, Gr} zeigt die Bildung von Bis- γ -glutamyl-cystein (Gci). Bei diesem Modus kommt es zu einem Oxidations-Reduktionszyklus von Glutathion. Im Modus {HypII, -HypIV, -HypVII} wird ein Molekül Dihydroxyhypoxanthin zweimal oxidiert und ergibt Xanthin und Wasserstoffperoxid und ist so ein bekanntes Beispiel für oxidativen Stress in lebenden Zellen. Im Elementarmodus {HypIII, -HypVIII} wird ein hydroxyliertes Purin oxidiert und ergibt ein Purin und Wasserstoffperoxid. Der Modus {HypIV, -HypIX} beschreibt die Umwandlung verschiedener Formen von Pterinen. Der Modus {Gsa, Gss} ist ein Zyklus, bei dem ATP verbraucht wird und bei dem das erst synthetisierte Glutathionylspermidin weiter zu GSH und Spermidin gespalten wird. Ein anderer Zyklus mit ATP-Verbrauch ist {CytIV, Gcl, Opr}. Drei Elementarmoden {CgdII, Gcl, Gls}, {CytIII, Gcl, Gls} und {MaII, Gcl, Gls} beschreiben die Neusynthese von GSH von Cysteylglycin und Glutamat. Der Modus {CytI, GtfIII, Opr} ist Teil des Abbaus von Glutathion in seine Aminosäuren. Das ist der gleiche Effekt wie bei dem Ein-Enzym-Elementarmodus {GtfII}. Die drei komplexesten Elementarmoden beinhalten je sieben Enzyme und haben die Gesamtstöchiometrie $2ACO + 4ATP + CYI + 2GSH + 2RXI = 4ADP + 2ASA + 2COA + GSSG + 2HXI$. Einer der Elementarmoden mit diesem Stoffumsatz enthält folgende Enzyme {(2Cca), (2CgdI), (2Gcl), Gcy, (2Gls), (2GtfI), (2Gtr)}. Alle drei Elementarmoden erreichen die Regeneration von oxidiertem Protein und gleichzeitiger Wiederherstellung oxidierter Reste (RXI) und

oxidierter Disulfidbindungen (Cystine) unter Verbrauch von freier Energie in Form von ATP oder Acetyl-CoA. So tragen diese Elementarmoden zum Schutz von Proteinen vor oxidativem Stress bei.

Optimierung der Anzahl der Elementarmoden durch den Experten

Bei der Suche nach einem Reaktionssystem mit einer minimalen Anzahl an Elementarmoden von Hand ergaben sich natürlich im Vergleich zum automatisiert erstellten Ergebnis Unterschiede. Die Zahl der Elementarmoden lag bei der von Hand optimierten Version bei 104. Diese Version diente auch als Startpunkt der hier beschriebenen Computeroptimierung und zur Korrektur und Bearbeitung der umfangreichen Eingabedateien (siehe Anhang 8.2 bis 8.9). Die Elementarmoden im von Hand optimierten System bestanden größtenteils aus sehr kurzen Reaktionswegen mit höchstens drei Enzymen. Nur zwölf Elementarmoden hatten mehr als acht Enzyme. Hier handelte es sich um die Synthese und den Abbau von Glutathion und die Verknüpfung mit Teilen des Pentosephosphatweges.

Vergleich mit einem automatischen Ansatz zur Zerlegung des Netzwerkes

Zum Vergleich wird die Methode nach Schuster (2002a) herangezogen, bei der das biochemische Netzwerk in kleinere Teile zerlegt wird. Man kann neben den Metaboliten, die von der Zelle aufgenommen und abgegeben werden, auch die als extern bewerten, die in mehr Reaktionen als bei einem gegebenen Schwellenwert vorkommen. Wenn ein Metabolit in einigen Reaktionen vorkommt, ist sein Konzentrationsspiegel kaum von der Geschwindigkeit einer einzelnen Reaktion beeinflusst. Deshalb können aus Vereinfachungsgründen diese Schlüsselmetaboliten als gepuffert betrachtet werden. Wenn eine ausreichende Anzahl an Metaboliten als extern bewertet wird, „zerfällt“ das Netzwerk wegen seiner hierarchischen modularen Struktur (Ravasz et al., 2002) sozusagen in Unternetzwerke. Die meisten der Unternetzwerke sind biochemisch einfacher zu interpretieren, und die Elementarmoden können sehr viel leichter bestimmt werden, als es bei dem gesamten Netzwerk der Fall ist. Im Gegensatz zum Schwellenwert der Verzweigungspunkte, der auf drei Reaktionen fixiert ist, an denen der Metabolit teilnehmen muss, um als Verzweigungspunkt zu gelten, ist der Schwellenwert zur Dekomposition des Netzwerkes variabel. Er kann so ausgewählt werden, dass die Unternetzwerke eine praktische Größe haben. Es hat sich herausgestellt, dass vier ein geeigneter Schwellenwert ist, um ein Netzwerk in Unternetzwerke zu zerlegen. Um die Zerlegung des Netzwerkes zu bewerkstelligen, ist das Programm SEPARATOR (Schuster et al., 2002a) entwickelt worden. Die angewandte Methode ist noch simpler als die Methoden, die auf der Kontrolle des Informationsflusses („betweeness“) an einem Knoten oder einer Kante basie-

ren (Girvan et al., 2002) und bei der die Anzahl der Pfade durch einen Knoten oder eine Kante bestimmt wird. In unserem Fall müssen nur die Kanten gezählt werden, die von einem Knoten ausstrahlen. Die Zerlegung in Untergruppen wurde auch für Gen- und Proteinnetzwerke vorgeschlagen (Snel et al., 2002). Die hier vorgestellte Methode zielt nicht hauptsächlich auf die Zerlegung von Netzwerken. Die minimale Anzahl an Elementarmoden konnte prinzipiell auch mit dem gesamten Reaktionsnetzwerk erreicht werden. In vielen Fällen jedoch, wie zum Beispiel bei den in Abbildung 3.8, löst sich das Netzwerk bei optimaler Elementarmodenanzahl auf. Interessanterweise erreicht man das gleiche Subsystem wie in Abbildung 3.8 auch mit entsprechend gewähltem Schwellenwert mit dem Zerlegungsalgorithmus. Der Schwellenwert wäre hier drei, also Metaboliten, die in mehr als drei Reaktionen vorkommen, werden als extern bewertet. In Tabelle 8.3 ist auch die Verbundenheit („connectivity“) der Metaboliten angegeben. Betrachtet man eine der vier optimalen Lösungen mit 57 externen Metaboliten, die auch in Tabelle 8.3 angegeben ist, sieht man, dass die Verbundenheit mit verschiedenen Reaktionen meist eins ist. Viele der verbleibenden externen Metaboliten wie zum Beispiel 25 GSH, 18 GSSG und 9 H_2O_2 sind aber an sehr vielen Reaktionen beteiligt. Von Metaboliten, die in mehr als einer, aber weniger als fünf Reaktionen verwendet werden, sind 18 extern und 18 intern. Von den verbleibenden Metaboliten, die in mehr als vier Reaktionen auftauchen, sind sieben extern und vier intern. Das bedeutet, dass der Minimierungsalgorithmus mehr externe Metaboliten braucht als der Zerlegungsalgorithmus, und dass das entsprechende System beim zweiten Algorithmus prägnanter ist. Das ist teilweise der Fall, weil zwar einige Metaboliten durch irreversible Reaktionen nur produziert (CO_2 , ADP) oder nur verbraucht werden und diese deshalb extern sein sollten, trotzdem bleiben aber essentielle Wege durch das Netzwerk erhalten. Der Minimierungsalgorithmus führt zu einer Situation, bei der jede der Reaktionen in eines von acht Untersystemen eingeteilt werden kann. Dies kann man auch in den Ausgabedateien von Metatool sehen, das acht Block-Diagonalmatrizen bei der Ausgabe der Elementarmoden markiert. Einer dieser Blöcke besteht allerdings aus 17 Untersystemen mit jeweils nur einer Reaktion, die keine internen Metaboliten verwenden. Das ist der Fall, weil Metatool solche „trivialen“ Untersysteme in einem Block zusammenfasst. Interessanterweise ergeben sich bei der algorithmischen Zerlegung des Netzwerkes mit einem Schwellenwert von vier die gleichen acht Untersysteme.

3.4 Weitere biomedizinische und informatische Herausforderungen bei der Analyse von Domänenunterschieden zwischen Mensch und Malaria-Parasit

Nach den Untersuchungen zur Glutathionreduktase und Redoxnetzwerken werden die bioinformatischen Ansätze genereller bearbeitet und einerseits ein System zur automatischen Domänenenerkennung, andererseits allgemeine bioinformatische Methoden zur Stoffwechselweganalyse näher betrachtet.

3.4.1 Automatische Klassifikation von Proteindomänen

Automatische Proteinklassifikation nach Taylor

Eine automatische Erkennung von Domänen in Proteinen ist erstrebenswert, weil dadurch Ungenauigkeiten, die bei der Klassifikation durch unterschiedliche Experten entstehen, verhindert werden können. Das Problem bei der üblichen Domänenenerkennung ist, dass sie von Hand nach nicht genau vorgegebenen Regeln durchgeführt wird. Diese Willkürlichkeit führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. Es gab bei den Klassifikationen oft Klassen mit nur wenigen Domänen oder sogar nur einer einzigen Domäne als Inhalt. Wie kann also bei so großer Vielfalt eine Domäne erkannt werden? Taylor hat eine automatisierte Erkennung von Grundformen ohne menschlichen Eingriff vorgeschlagen (Taylor, 2002b). Danach soll die Reichhaltigkeit an unterschiedlichen Domänen beschrieben und gleichzeitig vermieden werden, viele künstliche Klassen zu haben, in denen nur wenige Domänen sind. Dieser Ansatz wurde von uns kritisch hinterfragt (Bertram et al., 2002b).

Viele verschiedene Computerprogramme messen die dreidimensionale Ähnlichkeit von Proteinen, indem sie die Koordinaten der Proteine vergleichen. Dann können die Proteine nach Ähnlichkeit eingruppiert und benannt werden. Dies funktioniert mit einer Ähnlichkeit, die nur teilweise oder aber vollständig sein kann. Ein Nachteil ist, dass Computerprogramme üblicherweise sozusagen die „Idee“ der Strukturähnlichkeit nicht erkennen können, sondern eben nur Details miteinander vergleichen. Am Ende brauchen auch diese vergleichenden Programme für eine Klassifikation die subjektive Meinung von Experten. Taylor hat schon in einer früheren Arbeit (Taylor, 2001) eine automatisierte Zerlegung von Proteinen in Segmente vorgestellt, die jeweils eine α -Helix oder ein β -Faltblatt

repräsentieren. In diesem Fall ist die Einteilung aber streng nach mathematischen Regeln erfolgt.

Um Probleme zu umgehen, die sich bei einer Einordnung in eine Hierarchie ergeben, hat Taylor ein minimales Basisset von idealisierten Strukturen entworfen. Dieses Basisset kann mit einem Computerprogramm (Taylor, 2002a) mit allen bekannten dreidimensionalen Proteinstrukturen verglichen werden. Das Programm bezieht sich auf die Sekundärstruktur des Proteins und bildet eine Ebene, in der die Sekundärstruktureigenschaften zusammengefasst werden: Entweder eine β -Faltblattebene oder eine Schicht aus verschiedenen α -Helices. Von diesen beiden Sorten von Ebenen gibt es selten mehr als vier in einer Proteindomäne. Gedrehte Faltblattstrukturen („twist“, „curl“ und „stagger“) werden als flach oder zylindrisch (fassartig) idealisiert. Bei dieser Klassifikation kann mit einer inneren Schicht aus β -Faltblatt und einer äußeren α -Schicht ein System geschaffen werden, das an ein Periodensystem mit inneren und äußeren Valenzschalen erinnert. Diese Valenzschalen werden fortschreitend gefüllt, hier aber nicht mit Elektronen, sondern mit weiteren Sekundärstrukturelementen (α -Helices). Sollte eine weitere Schicht von β -Faltblatt oder α -Helix hinzukommen, wird das „Periodensystem“ wie bei den Lanthanoiden erweitert (siehe Abbildung 3.12). Bekannte dreidimensionale Strukturen von Proteinen werden auf lineare Segmente reduziert und dann mit den idealen Strukturen verglichen. Ein schneller zweiteiliger Algorithmus zur Überprüfung von dreidimensionalen Strukturen wurde als Vorfilter genutzt. Danach vergleicht ein umfassender doppelt-dynamisch programmierter Algorithmus die linearen Segmente ohne Rücksicht auf die Länge oder die Ausrichtung. Sollte ein gutes Ergebnis erreicht worden sein, werden die Längen auf 10 Å gesetzt. Die Anzahl der idealisierten Strukturen wird so gewählt, dass sie zum untersuchten Protein passt. In einem nächsten Schritt wird versucht, mit einer Abweichung von weniger als 6 Å im quadratischen Mittel ein Modell über das bekannte Protein zu legen.

Versuche mit einzelnen Domänen aus der Proteindatenbank CATH (Orengo et al., 1997) zeigten, dass viele Strukturen nicht gut klassifiziert werden konnten. Dazu zählen alle α -, genau wie die dreieckigen β -Strukturen (Kleeblatt- und Prismenstrukturen und β -Helices) und die integralen Membranproteine sowie kleine, nicht dicht gepackte Domänen. Von den verbleibenden 418 Domänen wurde für 34 kein brauchbares Ergebnis bei den idealisierten Formen gefunden. Für die restlichen 384 Domänen wurde in 85% aller Treffer eine Identität von über 50% der Struktur erreicht, und bei mehr als der Hälfte der Domänen konnte mehr als 70% der Struktur ins Modell übersetzt werden. Große β -Propeller, zusätzliche Ebenen aus α -Helices oder Subdomänen und virale Hüllproteine mit unstrukturierter Schleifenstruktur waren größtenteils in der Gruppe mit nur teilweiser Übereinstimmung.

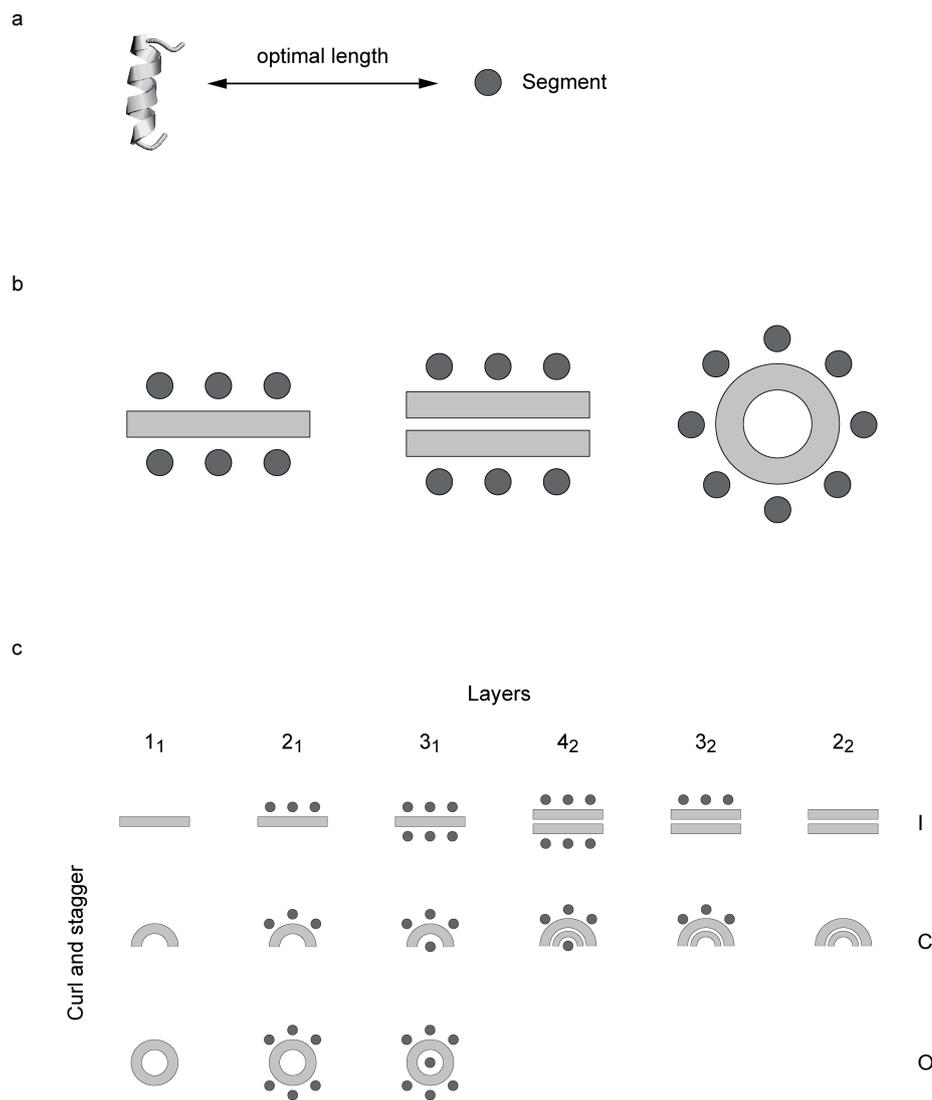


Abb. 3.12: Idealisierte Strukturen nach Taylor (2002b). (a) Statt Sekundärstrukturen wie α -Helix oder β -Faltblatt verwendet Taylor Proteinsegmente, um die Sekundärstrukturen unterschiedlicher Länge zu normalisieren und um die Proteinstrukturen schnell mit einem großen Bereich an Topologien zu vergleichen. (b) Dieser Ansatz erlaubt mit nur drei idealisierten Formen zu beginnen ($\alpha\beta\alpha$ - und $\alpha\beta\beta\alpha$ -Schichten und $\alpha\beta$ -Fasstruktur). Diese drei idealisierten Formen korrespondieren mit I_{3_1} , I_{4_2} und O_{2_1} in Abbildungsteil c. (c) Von diesen idealisierten Formen lassen sich alle Ebenen des „Periodensystems“ von Proteinstrukturen konstruieren. Das resultierende vereinfachte System eines „Periodensystems“ ist hier abgebildet. Jede Form kann in jeder Ebene weiter mit Helices gefüllt werden. Die drei Buchstaben I, C, O stehen bildlich für verschiedene Ausprägungen von β -Faltblatt-Strukturen: I für eine Ebene, C für eine halboffene und O für eine Fasstruktur.

Durch eine automatische, einem Ising-Modell ähnliche Methode (Taylor, 1999), werden die bisher nicht übereinstimmenden Teile der Proteinstrukturen in mehreren Iterationen mit den idealisierten Strukturen verglichen. Dies führt zu einer verbesserten Trefferquote bei den idealisierten Strukturen von durchschnittlich 80% jedes Proteins. Dabei passen 75% der Domänen mindestens zu 70% zu den idealisierten Strukturen. Jede der idealisierten Formen kann nach der Anzahl der Sekundärstrukturen in jeder Schicht indiziert und dann in ein Koordinatensystem eingeordnet werden. Es gibt nur drei grundlegende Formen: $\alpha\beta\alpha$ -Schichten, $\alpha\beta\beta\alpha$ -Schichten und $\alpha\beta$ -Faltblatt. Jeder Schritt in der Ebene der β -Koordinaten bedeutet eine zusätzliche Sekundärstruktur oder eine Sekundärstruktur weniger. Eine der Dimensionen im Faltblattkoordinatensystem steht für die Eröffnung einer weiteren Faserstruktur für eine festgelegte Anzahl von Faltblatteinheiten. So kann der gesamte Bereich von realen Proteinen, die mit dieser Methode klassifiziert werden, einfach dargestellt werden. Folgt man dieser Klassifikation, dann gibt es für kleine Proteinstrukturen doppelt so viele Arten der Faltung als Sekundärstruktur wie bei größeren. Kommen mehr als zehn Sekundärstrukturen in einem Protein vor, ist die Faltung beinahe in jedem Fall einmalig. Folgt man dem System nach der Klassifizierung von idealisierten Strukturen, bedeutet dies auch automatisch, dass Proteine auf der Basis der größten gemeinsamen idealisierten Struktur verglichen werden können, die in allen Proteinen oder Untergruppen zu finden ist.

Generelle bioinformatische Methoden zur Stoffwechselanalyse

Es geht hier um die Beschreibung der Methoden, die es allgemein ermöglichen, den Weg vom Genom zum metabolischen Netzwerk zu untersuchen (Bertram et al., 2004). Die Grundlage der Rekonstruktion von Stoffwechselwegen sind genomische oder biochemische Daten. Ziel ist es, mit diesen Daten eine höhere Interaktionsebene zwischen Enzymen in einem spezifischen Genom darzustellen und Unterschiede bei Stoffwechselwegen in verschiedenen Arten zu entdecken. Es wird der Fluss der Metaboliten in einem Netzwerk aus unterschiedlichen Stoffwechselwegen mit verschiedenen Werkzeugen wie zum Beispiel der Elementarmodenanalyse untersucht. So können Schlüsselenzyme und potentielle medizinische Ziele erkannt werden. Die Bedeutung der vergleichenden Genomanalyse hat in letzter Zeit zugenommen, weil immer mehr Genome vollständig sequenziert sind (Paulsen et al., 2001). Erst mit den vollständig sequenzierten Genomen können groß angelegte Vorhersagen über die metabolische Ausstattung eines Organismus gemacht werden. So können wichtige Stoffwechselwege und ihre Verbindungen untereinander rekonstruiert werden (Rohlin et al., 2001). Auf der einen Seite können die Stoffwechselwege durch Ausschalten einzelner Gene untersucht werden (Lewandoski, 2001). Andererseits können auch Modelle oder eine Rekonstruktion von Stoffwechselwegen durch bioinformatische Lösungen, wie hier beschrieben, geschaffen werden. In der

biochemischen Standardliteratur sind Stoffwechselwege oft als lineare Abfolge von Enzymen dargestellt. In der Realität bilden die Enzyme aber komplexe Netzwerke. Neben der Zerlegung von Netzwerken und der Integration von Stoffwechselwegen mit informatischen Mitteln bedarf es unter anderem sensitiver Programme zum Sequenzvergleich, um ein vollständiges Bild aller vorhandenen Enzyme zu erhalten. Bei der Untersuchung von Stoffwechselnetzwerken kommt erschwerend hinzu, dass die einzelnen Wege nicht nur auf vielfältige Weise untereinander verbunden sind, sondern auch verzweigt sein können. Da die Enzymdatenbanken (Kanehisa et al., 2002; Schomburg et al., 2002; Bairoch, 2000) nur auf Methoden wie die automatische Erkennung entlang vorgegebener Stoffwechseldiagramme zurückgreifen, müssen diese Vorhersagen für weitere Analysen noch genauer untersucht werden. Manche Enzyme kommen nur in bestimmten Geweben, Organellen oder in bestimmten Entwicklungsstadien vor. Manchmal gibt es mit Isoenzymen unterschiedliche Enzymversionen in einem Gewebe, die auf verschiedene physiologische Zustände unterschiedlich reagieren. Hier lohnt eine Analyse der Domänen, die sich oft schwierig gestaltet. Sie kann aber zu neuen Erkenntnissen in Bezug auf Gewebespezifität, extrazelluläre Domänen und Homologien führen (Dandekar et al., 2002). Wie oben beschrieben, stellt Taylor (2002b) einen neuen automatisierten Ansatz vor. Sollen komplexe Stoffwechselwege identifiziert werden, kann man mit einer Sequenzanalyse Lücken füllen oder alternative Enzyme finden. Die Erkennung zusammenhängender Enzymaktivitäten wird stark vereinfacht durch Datenbankwerkzeuge wie das der Gruppe orthologer Gene (*cluster of orthologous genes*, COGs (Tatusov et al., 2001)) oder das der verwandten Enzymgruppen (*related enzyme clusters* (Goto et al., 1997)). Beide Methoden haben zu großen Datenbanken geführt, die Enzyme aus verschiedenen Genomen mit gleicher Aktivität auflisten (Tatusov, 2002). Man sollte aber im Blick behalten, dass auch Regulationen auf RNA-Ebene stark in den Stofffluss eingreifen können, wie man an den Iron Responsive Elements sehen kann (Dandekar et al., 2001b). Sollten die Annotationen automatisch durchgeführt werden, kann zum Beispiel auf komplette kommerzielle Plattformen wie Pedant (Frishman et al., 2001) oder Bioscout (Lion, 2002) zurückgegriffen werden.

Analyse der Enzymabfolge in Stoffwechselwegen

Wir haben hier bei der vergleichenden Analyse von Stoffwechselwegen drei Methoden gewählt, die kombiniert werden:

- a) Analyse und Vergleich von biochemischen Daten,
- b) Untersuchung der Stoffwechselwege, basierend auf dem Konzept des metabolischen Flusses und

c) Nutzung vergleichender Genomanalyse.

Wird eine Analyse von Enzymabfolgen in Stoffwechselwegen gemacht, konzentriert man sich innerhalb einer Organismengruppe auf einen bestimmten Stoffwechselweg. Die beteiligten Enzyme werden aufgelistet und verglichen wie normale Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen: konservierte und weniger konservierte Bereiche werden markiert. Als Beispiel kann bei der Glykolyse eine starke Konservierung bei der Verarbeitung der Triosen beobachtet werden. Im oberen Teil der Glykolyse bei der Umsetzung der Hexosen können aber, abhängig von den betrachteten Arten, viele Variationen, Lücken und alternative Enzyme auftreten (Dandekar et al., 1999). Die Sequenzanalyse von Stoffwechselwegen zeigt nicht nur die biochemischen Möglichkeiten der verglichenen Arten auf, sondern artspezifische Unterschiede werden sofort sichtbar. Sollten entscheidende Enzyme fehlen, muss mit der Rekonstruktion noch einmal begonnen werden. Hier muss überprüft werden, ob eine Funktion wirklich fehlt oder ob nicht ein Enzym, das zu einer anderen Sequenzfamilie gehört, als orthologe „Ersetzung“ (Bork et al., 1998) die gesuchte Reaktion katalysieren kann. Es kann aber auch Stoffwechselwege geben, die die fehlende Reaktion insgesamt umgehen.

Analyse des metabolischen Flusses

Wenn ermittelt wurde, welche Enzyme bei verschiedenen Stoffwechselwegen vorhanden sind, kann im nächsten Schritt der Fluss der Metaboliten in einem Netzwerk untersucht werden. Dabei ist die Berechnung der elementaren Flussmoden (*elementary flux modes*) (Schuster et al., 1999) ein komfortables Werkzeug zur Untersuchung eines metabolischen Netzwerkes. Hier wird untersucht, ob mit den gegebenen Enzymen ein stabiler Fluss der Metaboliten durch das Netzwerk möglich ist oder ob noch zusätzliche Enzyme notwendig wären. Mit diesen Elementarmoden kann man feststellen, ob es einen stöchiometrisch richtigen Weg von spezifischen Substraten zu bestimmten Produkten gibt. Wie komplex ein Stoffwechselnetzwerk auch sein mag: Die Elementarmoden beschreiben das gesamte Netzwerk. Eine Linearkombination der Elementarmoden beschreibt ein konkretes Fließgleichgewicht, das in einem Versuch gemessen werden kann (Schuster et al., 2000b). Deshalb lässt sich der Stoffwechselzustand einer lebenden Zelle jeweils als eine Kombination von Elementarmoden darstellen. Früher wurde ein Stoffwechselweg im Netzwerk oft nach traditionellen Vorgaben oder chemischem Wissen gestaltet. Heute sind Algorithmen sehr hilfreich, um Wege in einem komplexen metabolischen Netzwerk präzise beschreiben zu können. Durch den Algorithmus werden alle möglichen Enzymkombinationen systematisch untersucht und am Ende nur die ausgegeben, die durch ein mathematisches Kriterium bewertet wurden. So kann man auf eine rationale, systematische Weise alle potentiellen Wege durch ein metabolisches Netzwerk sichtbar machen.

Auch die Reaktionswege in der biochemischen Standardliteratur sind oft Elementarmoden, weil der beschriebene Hauptweg von einem externen Edukt zu einem externen Produkt führt. Allerdings lassen sich oft durch Elementarmodenanalyse weitere Wege durch das Netzwerk finden. Diese Elementarmoden würden meist übersehen werden, wenn man sie nicht durch ein bioinformatisches Werkzeug identifizieren würde. Ein weiterer Vorteil der Analyse des metabolischen Flusses ist das Erkennen von energetisch gegenseitigen Enzymkombinationen – so genannte *futile cycles* – die so in einem gegebenen Organismus gefunden werden. Dies ist oft ein Hinweis auf eine allosterische Regulation etwa bei Schlüsselenzymen. Eine ausführliche Beschreibung der Elementarmodenanalyse findet sich im Abschnitt 2 und in Schuster et al. (2000a), Beispiele und Anwendungen finden sich in Schuster et al. (2000b). Der Algorithmus wurde schon in Smalltalk (Woods, 1997) und C (Pfeiffer et al., 1999) implementiert. Neben einer Auflistung aller Stoffwechselwege gibt es beispielsweise für die kinetisch detaillierte metabolische Flussanalyse (metabolic flux analysis, MCA) und die Elementarmodenanalyse folgende Anwendungsmöglichkeiten (Cornish-Bowden et al., 2000):

- a) Überprüfung, ob ein Satz von Enzymen zu einem gewünschten Produkt führt und deshalb ein gesuchter Stoffwechselweg möglich ist,
- b) Identifikation von nicht redundanten Stoffwechselwegen und Enzymaktivitäten, was wichtig für die Arzneimittelentwicklung ist,
- c) Ermittlung von Stoffwechselwegen mit maximalem oder beinahe maximalem Ertrag (Stelling et al., 2002), die in der Biotechnologie eine wichtige Fragestellung sind,
- d) Einsatz der Elementarmoden bei Genomvergleichen, weil so schnell erkannt werden kann, ob die Stoffwechselwege vollständig sind oder ob sie noch Lücken und Widersprüche enthalten und
- e) pharmakologische und medizinische Bewertung eines Enzymmangels.

Die Elementarmodenanalyse ist auch für pharmakologische Anwendungen interessant, weil so giftige oder intermediäre Metaboliten verfolgt werden können. So wird eine Verringerung der Nebenwirkungen angestrebt, denn diese erzeugen einen bedeutenden Anteil der Gesundheitskosten (Meisel et al., 2000). Sollte es möglich sein, ein metabolisches Netzwerk um angrenzende Reaktionen zu erweitern, führt dies zu erhöhter Vorhersagegenauigkeit. Damit können auch Metaboliten erkannt werden, die auf Nebenwegen entstehen und die die Wirkung von Medikamenten modifizieren. Eine solche Ver-

änderung der Wirkung tritt zum Beispiel bei Betäubungsmitteln auf. Bei Organismen, die biochemisch schwer zu untersuchen sind, ist genomische Information besonders nützlich. Allerdings muss dazu aus einer Familie orthologer Sequenzen mindestens ein Enzym biochemisch charakterisiert sein. Auch die Nutzung der Informationen, die im Genkontext liegen, wie zum Beispiel eine konservierte Genreihenfolge, kann bei biochemisch schwer zu untersuchenden Organismen sehr hilfreich sein (Overbeek et al., 1999). Für den Vergleich von Genomen muss die Möglichkeit von Genverdoppelungen, der Ersatz von Genen durch nicht verwandte Sequenzen (eine nicht orthologe „Ersetzung“) und die Umgebung der Gene mit betrachtet werden. Dabei ist eine phylogenetische Analyse sinnvoll, um Genverdoppelungen auf die Spur zu kommen und die Substratspezifität der Enzyme zu klären. Soll die biochemische Funktion analysiert werden, gewinnt die Untersuchung durch eine sorgfältige Überprüfung der Domänenstruktur an Aussagekraft.

3.4.2 Pathogenomik

Die Doktorarbeit wurde in unmittelbarer Nähe zum PathoGenoMik-Zentrum durchgeführt. Bei Virulenz und Pathogenität von Bakterien spielen spezifische Proteindomänen und Stoffwechselwege, wie sie in dieser Arbeit untersucht wurden, eine entscheidende Rolle. In einer weiteren Arbeit haben wir über die spezifischen Aufgaben der Pathogenomik berichtet (Bertram et al., 2003a). Das in Würzburg angesiedelte Kompetenznetzwerk PathoGenoMik kann von diesen Arbeiten des Lehrstuhls für Bioinformatik profitieren, indem auf die langjährige erfolgreiche Sequenz-, Struktur- und Genomanalyse zurückgegriffen werden kann. Unter anderem werden im Netzwerk PathoGenoMik Analysen zellulärer Netzwerke durchgeführt, wie sie bei der Untersuchung des Genoms von *Mycoplasma pneumoniae* angewandt wurden. Ein Kernpunkt bei Untersuchungen von metabolischen Netzwerken ist das Verständnis der Interaktion von Wirt und Erreger. So gewinnt man zusätzlichen Einblick in Reaktionen von pharmakologischen Wirkstoffen (Schuster et al., 2002a). Sollen bei der Suche nach medizinisch verwertbaren Proteinen Schlüsselenzyme an entscheidenden Stoffwechsellpunkten genauer untersucht werden, ist es eine große Hilfe, nach der Untersuchung metabolischer Netzwerke eine Suche nach Übereinstimmungen (alignment) in Stoffwechselwegen durchzuführen (Dandekar et al., 2002). Zusätzlich ist ein neu eingerichteter Server zur Berechnung von Strukturvorhersagen (Schmidt et al., 2002) nützlich. Außerdem wurden Fortschritte bei der Beschreibung von regulatorischer und katalytischer RNA erzielt (Dandekar et al., 2001b; Dandekar, 2001). Bundesweit sind im PathoGenoMik Netzwerk 28 Arbeitsgruppen zusammengefasst. In dem Netzwerk werden die Themen in drei Verbünde gegliedert: grampositive Kokken, intrazelluläre Bakterien und gramnegative pathogene Bakterien (Bertram et al., 2003b).

Innerhalb dieses Kompetenznetzwerkes sollen die Grundlagen für neue diagnostische und therapeutische Verfahren geschaffen werden. Dies ist auch für die Industrieländer sehr wichtig, denn auch hier geht von Infektionskrankheiten eine starke Gefährdung der Bevölkerung aus. Dies liegt zum Beispiel an den steigenden Zahlen immungeschwächter älterer Menschen und an einer immer stärkeren Konzentration der Lebensmittelproduktion. Kommt es hier zu Problemen, sind überwiegend sehr große Gruppen betroffen. Bei den Infektionskrankheiten, die in Industrieländern eine große Rolle spielen, sind unter anderem Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) (Tsumagari et al., 2000), *Salmonella typhimurium* (Zansky et al., 2002), magengeschwürverursachende *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila* aus Klimaanlageanlagen (Joseph, 2002) und generell nosokomiale Infektionen in Krankenhäusern (Stott et al., 2002) sehr bedeutend. Die beschriebenen Probleme werden noch durch Bakterien drastisch verschärft, die (multi)resistent gegen bisher bekannte Behandlungsmethoden sind (Helms et al., 2002). Aus diesem Grund liegt der Schwerpunkt des Kompetenznetzwerkes auf pathogenen Bakterien, die von großem wissenschaftlichem und gesundheitspolitischem Interesse sind. Die Zusammenarbeit von Bioinformatik und dem Kompetenznetzwerk PathoGenoMik hat die bioinformatische Erfassung und Vorhersage des pathogenen Potentials bakterieller Krankheitserreger zum Ziel und zusätzlich sollen für die Virulenz wichtige DNA-Bereiche identifiziert und untersucht werden.

3.5 Analyse der Rolle der Glutathionreduktase in Redoxnetzwerken von Anopheles, Mensch und Plasmodium

Es soll hier ein Vergleich von verschiedenen Elementarmoden von Plasmodium, Anopheles und dem Menschen durchgeführt werden. Die Erkenntnisse, die durch die Optimierung des Glutathionelementarmodensystems aus Kapitel 3.3 gewonnen wurden, werden nun genutzt, um die Eingabedateien der drei Elementarmodensysteme zusammenzustellen. Ziel ist es, Merkmale zu finden, die im besten Fall nur bei Plasmodium oder nur bei Plasmodium und Anopheles vorkommen, die genutzt werden könnten, um gegen Plasmodium oder Anopheles vorzugehen, ohne den Menschen zu gefährden. Für diesen Vergleich sind in den Abbildungen 3.13 bis 3.15 einige charakteristische Elementarmoden farbig hervorgehoben. Die Reaktionen sind kursiv geschrieben, die Metaboliten nicht hervorgehoben. Die Abkürzungen sind in den Tabellen 8.4 bis 8.9 aufgelistet. Da die Metaboliten und Reaktionen meist mit drei Buchstaben abgekürzt sind, kann nur an dem zugehörigen Reaktionspfeil abgelesen werden, in welchen Elementarmodensystemen der jeweilige Metabolit oder die jeweilige Reaktion vorkommen. Bei Reaktionen, die in mehr als drei Elementarmoden vorkommen, reichen die drei Buchstaben nicht

aus, um die Beteiligung an den Elementarmoden anzuzeigen. Wenn Reaktionen reversibel sind, sie aber in einer Richtung in diesen farblich hervorgehobenen Elementarmoden Verwendung finden, wird die mögliche Rückreaktion durch einen schwarzen Pfeil angezeigt. Dabei kann es vorkommen, dass ein Teil eines Elementarmodus mehrfach beschrieben wird, da es nur so zu stöchiometrisch richtigen Lösungen kommt. Diese mehrfache Nutzung innerhalb eines Elementarmodenbeispiels wird in den Graphiken nicht extra angezeigt. Die Ergebnisse mit den Elementarmoden der drei Versuchsansätze sind beim Autor erhältlich.

Die Eingabedatei für Plasmodium besteht aus 51 Reaktionen mit 73 Metaboliten und es ergeben sich 107 Elementarmoden. In der Eingabedatei für das Elementarmodensystem Anopheles sind 62 Reaktionen mit 82 Metaboliten, die zu 244 Elementarmoden führen. Die Eingabedatei für das System des Menschen besteht aus 58 Reaktionen und 75 Metaboliten, die Ausgabedatei besteht aus 134 Elementarmoden.

Plasmodium - Beispiele Elementarmoden

Die Reaktionen, die in Plasmodium vorkommen, sind in Abbildung 3.13 dargestellt. In Rot ist ein Elementarmodus zu sehen, der die gesamte Glykolyse vom Import eines Moleküls Glucose (GLC) bis zum Export von Lactat (LAC) nutzt. Es ist das einzige Mal, dass sozusagen eine vollständige, ununterbrochene Glykolyse in den gewählten Beispielen zu sehen ist. Reaktionen des Pentosephosphatzyklus werden bei diesem Elementarmodus nicht verwendet. Es findet aber ein Import von Pyruvat (PYR) durch die reversible Reaktion des Pyruvat-Exports (PYR_{ex}) statt. In allen Elementarmoden, in denen Pyruvat-Export vorkommt, handelt es sich um einen Import. Dies liegt darin begründet, dass erst durch die Reaktion von Pyruvat zum Lactat durch die Lactat-Dehydrogenase (LDH, 1.1.1.27) und den daraus folgenden Verbrauch von Reduktionsäquivalenten das Elementarmodensystem im Gleichgewicht ist. Außerdem können die Reaktionen der DOXP-Synthase (Dxs, 4.1.3.37) und DOXP-Reductoisomerase (Dxr, 1.1.1.267) nur dann stattfinden, wenn zusätzliches Pyruvat importiert wird. Dies gilt bei der DOXP-Synthase auch für die Elementarmoden mit Pyruvat-Export, die bei Anopheles vorkommen. Weitere Reduktionsäquivalente werden über Glutathion (GSH) und Thioredoxin (TRX(SH)₂) durch Metallreduktion im Gleichgewicht gehalten.

Die beiden Elementarmoden, die in Grün und Blau hervorgehoben sind, haben als Gemeinsamkeit eine Glykolyse, bei der nicht alle Enzyme verwendet werden, und die vollständige Verwendung des Pentosephosphatweges. Nach dem Import von Glucose (GLC)

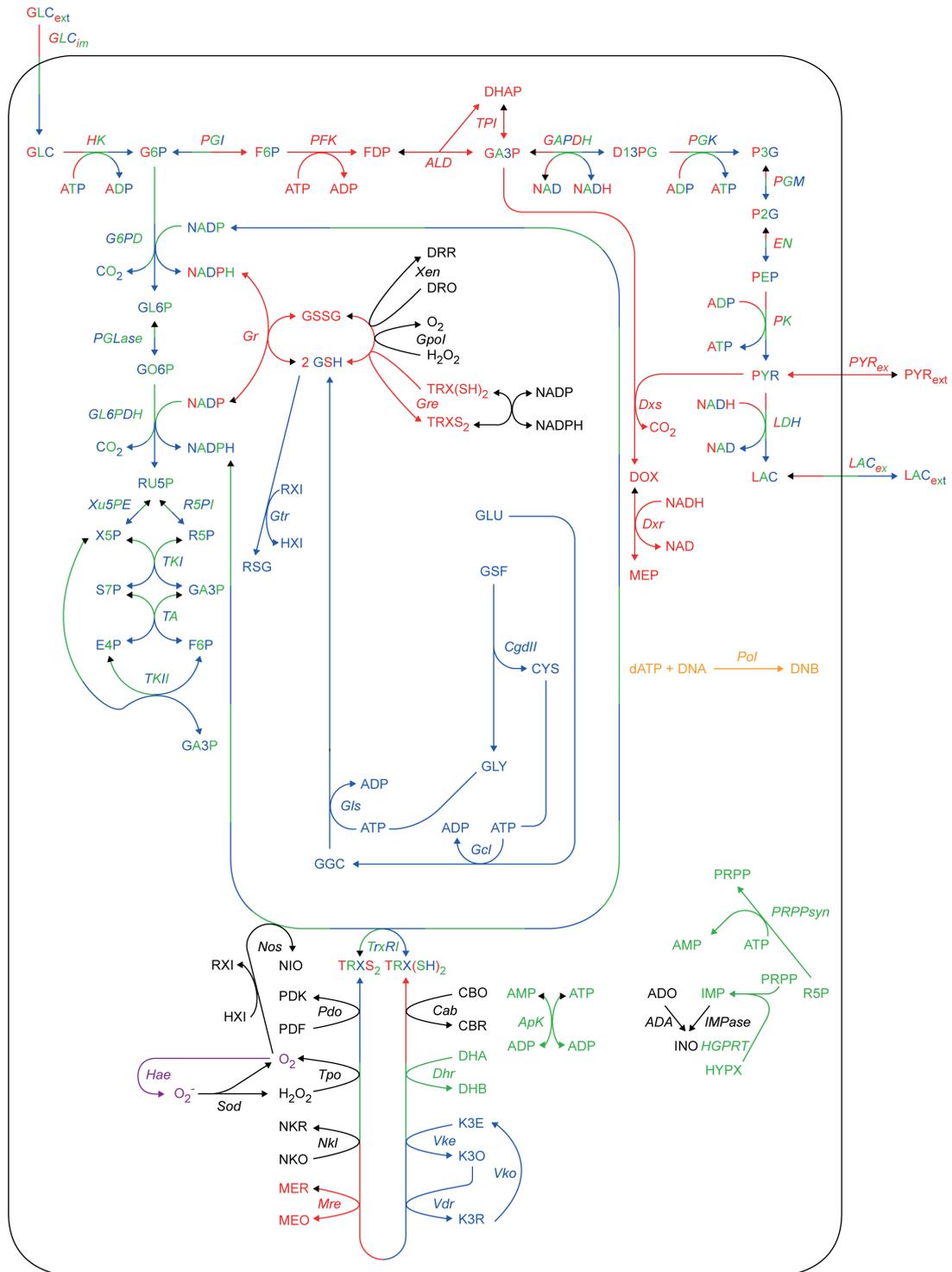


Abb. 3.13: Reaktionen, die die metabolischen Fähigkeiten von *Plasmodium* repräsentieren. Einige charakteristische Elementarmoden sind farbig markiert, die Abkürzungen der Reaktionen (kursiv) und Metaboliten siehe Tabellen 8.4 und 8.5.

wird dann bei der Glykolyse das Fructose-6-phosphat (F6P) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GA3P) weiter verwendet, das am Ende des Pentosephosphatweges steht.

Bei dem grün markierten Elementarmodus werden Teile des Salvage Pathways verwendet. So kommt es zum ATP-Verbrauch, und Reduktionsäquivalente werden über Thioredoxin ($\text{TRX}(\text{SH})_2$) und die Dehydroascorbatreduktion (Dhr) im Gleichgewicht gehalten. Die Dehydroascorbatreduktion durch Thioredoxin ist Teil der Strategie, oxidierte Proteine zu vermeiden (Follmann et al., 1995). Sie ist eine Reaktion, die nur bei Plasmodium und Anopheles vorkommt, nicht bei dem Reaktionssystem des Menschen.

Bei dem Elementarmodus in Blau kann man sehen, dass beim Aufbau des Glutathionmoleküls (GSH) ATP verbraucht wird. Die Reduktionsäquivalente bleiben im Gleichgewicht, weil über Thioredoxin ein Zyklus mit Vitamin K im Mittelpunkt abläuft. Die Vitamin K-Epoxid-Reduktase (Vke, 1.1.4.1) ist ein Enzym, das in dieser Domänenkonfiguration Unterschiede zwischen Anopheles/Plasmodium und dem menschlichen System zeigt. Zudem scheint es eine Verbindung bei der posttranslationalen Modifikation von Proteinen bei der Vitamin K-abhängigen Carboxylierung von Glutamatresten und der korrekten Ausbildung von Disulfidbrücken durch die Proteindisulfid-Isomerase (Pdo, 5.3.4.1) zu geben (Soute et al., 1992).

In Orange ist ein Elementarmodus eingefärbt, den es so nur bei Plasmodium und nicht bei Anopheles und dem Menschen gibt: Die DNA-Polymerase (Pol, 2.7.7.7) ist als Ziel deutlich angreifbarer, weil Plasmodium deutlich schneller wächst als Anopheles beziehungsweise der Mensch als sein jeweiliger Wirt. Dadurch ergibt sich auch für die DNA eine viel höhere Umsatzrate bei Plasmodium im Vergleich zu den beiden anderen Organismen, und für die Reduktion der Ribonukleotide werden sehr viele Redoxäquivalente benötigt (Holmgren, 1989).

In Violett ist die Reaktion dargestellt, in der noch nicht entgiftetes Häm (Hae) aus den Erythrozyten des Menschen als Redoxshuttle bei Plasmodium wirkt und so den oxidativen Stress bei Plasmodium erhöht (Sinden et al., 2002).

Anopheles - Beispiele Elementarmoden

Keiner der in den Farben Rot, Grün, Blau und Violett markierten Elementarmoden bei Anopheles hat eine vollständige Glykolyse, alle verwenden aber den Pentosephosphatweg vollständig. Bei den in Rot, Blau und Violett dargestellten Elementarmoden wird neben dem Glycerinaldehyd-3-phosphat (GA3P) auch das Fructose-6-phosphat (F6P) sozusagen in der üblichen Richtung der Glykolyse verwendet. Bei dem in grün dargestell-

ten Elementarmodus findet in den Beispielen bei *Anopheles* das einzige Mal die Glucose-6-phosphat-Isomerase (PGI, 5.3.1.9) Verwendung: Hier gibt es wieder die Rückreaktion des Fructose-6-phosphat, das in den Pentosephosphatweg eingeht. Bei allen vier Elementarmoden in Rot, Grün, Blau und Violett findet am Ende der Glykolyse der Export von Lactat statt (LAC_{ex}), nur bei den Elementarmoden, die in den Farben Rot, Grün und Blau zu sehen sind, kommt es zu einem Import von Pyruvat (PYR_{ex}). Es entsteht 1-Deoxy-xylulose-5-phosphat (DOX) als weiteres Produkt durch die DOXP-Synthase (Dxs, 4.1.3.37).

Bei den drei Elementarmoden, die in Rot, Grün und Blau zu sehen sind, findet der Ausgleich der Reduktionsäquivalente über die Thioredoxin-Reduktase (TrxRI, 1.6.4.5) statt.

Im rot dargestellten Elementarmodus ist das Kalzium-Bindeprotein (Cab) Reaktionspartner des Thioredoxins (Lundström-Ljung et al., 1995). Dieses Kalzium-Bindeprotein katalysiert eine Reaktion, die hier nur in den Reaktionssystemen von *Anopheles* und *Plasmodium* vorkommt.

Im grün dargestellten Elementarmodus kommt wieder die Dehydroascorbatreduktion (Dhr) vor.

Im blau dargestellten Elementarmodus bei *Anopheles* findet sich die Reaktion der Thiol-Peroxidase (Tpo) und eine Melanisierungsreaktion, bei der Melanin als Radikalerzeuger (Mla) fungiert. Diese Reaktion existiert nur bei *Anopheles* und könnte vielleicht den oxidativen Stress bei *Anopheles* erhöhen und so helfen, eine Plasmodieninfektion zu bekämpfen.

Beim violett gefärbten Elementarmodus gibt es neben der Reduktion von Medikamenten (Xen) die Reduktion von Glutathion (Gre), die hier nur bei *Anopheles* und *Plasmodium* in den Elementarmodensystemen vorkommt. Die Glutathionreduktase fehlt als Enzym bei *Drosophila melanogaster*, es kommt aber trotzdem zu einer Reduktion von Glutathion (Kanzok et al., 2001). In diesem Elementarmodus findet der Ausgleich des ATP aus der Glykolyse durch die Synthese von Glutathion (GSH) statt.

Bei dem in orange markierten Elementarmodus wird unter anderem die NK-Lysin-Reduktion (Nkl) verwendet. NK-Lysin hat drei Disulfidbindungen, die durch die Thioredoxin-Reduktase (TrxRI, 1.6.4.5) reduziert werden können (Andersson et al., 1996). Hier wurde NK-Lysin als Protein in die Elementarmodensysteme von *Anopheles* und *Plasmodium* aufgenommen, mit dem möglicherweise der oxidative Stress erhöht werden könnte.

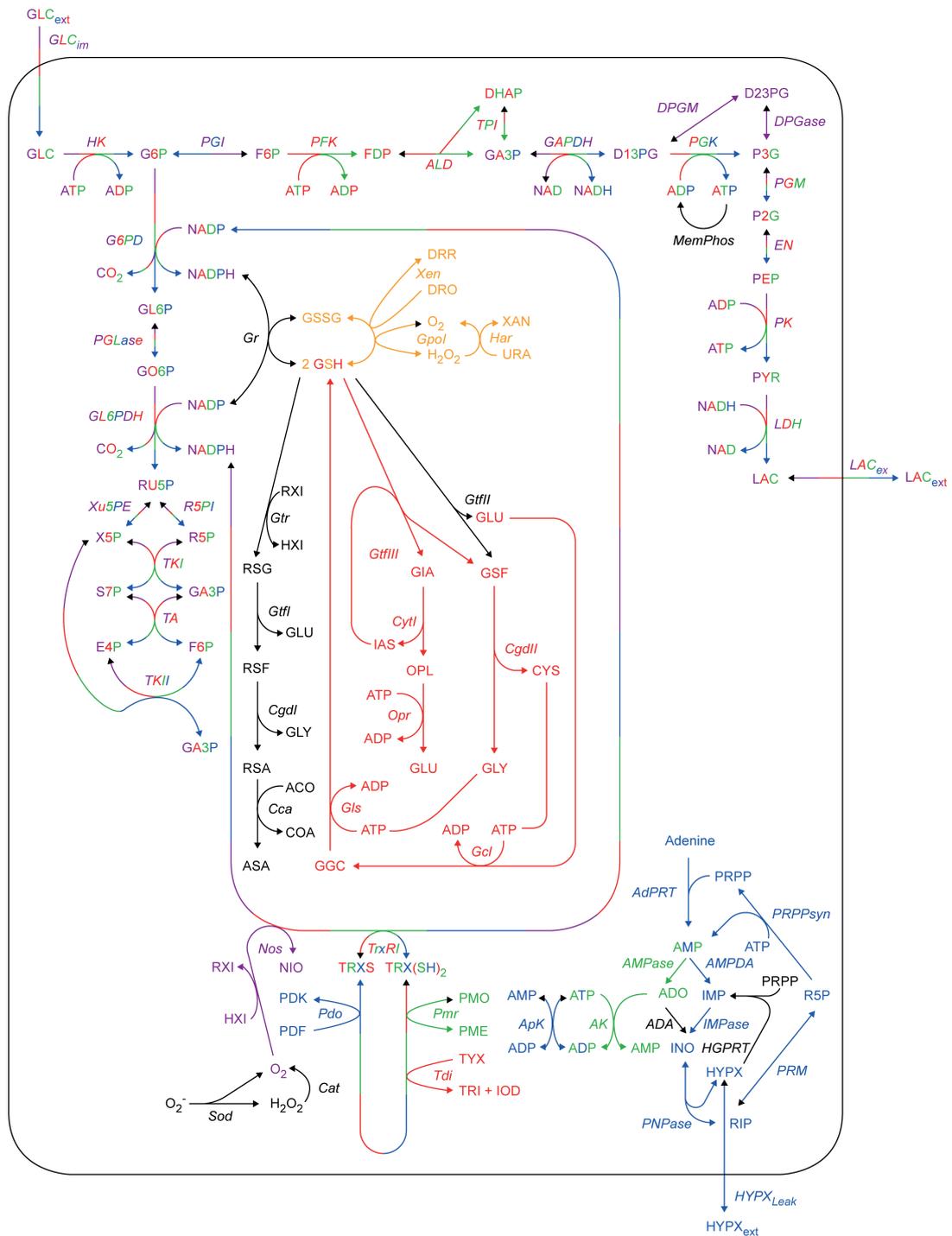


Abb. 3.15: Reaktionen, die die metabolischen Fähigkeiten des Menschen repräsentieren. Einige charakteristische Elementarmoden sind farbig markiert, die Abkürzungen der Reaktionen (kursiv) und Metaboliten siehe Tabellen 8.8 und 8.9.

Mensch - Beispiele Elementarmoden

Bei dem Elementarmodensystem, dem die für den Menschen charakteristischen Reaktionen zugrunde liegen, sind potentielle Ziele für Medikamente nicht so leicht zu definieren, weil vitale Funktionen nicht beeinträchtigt werden dürfen. Der Vollständigkeit halber sollen aber auch hier ein paar Elementarmoden hervorgehoben werden (siehe Abbildung 3.15), schließlich gibt es Medikamente wie Methylenblau, die auch Wirkung auf menschliche Enzyme haben.

Vier der hier dargestellten Elementarmoden haben eine unvollständige Glykolyse und einen vollständig genutzten Pentosephosphatweg. Sie sind in den Farben Rot, Grün, Blau und Violett dargestellt, und die Glykolyse endet immer im Export von Lactat (LACex). Bei den beiden Elementarmoden in Grün und Rot wird das Fructose-6-phosphat (F6P) unter Umgehung der Glucose-6-phosphat-Isomerase (PGI, 5.3.1.9) sozusagen in der üblichen Richtung zu Pyruvat (PYR) abgebaut. Die beiden Elementarmoden in Blau und Violett nutzen die Glucose-6-phosphat-Isomerase (PGI, 5.3.1.9) in umgekehrter Richtung, und das Fructose-6-phosphat geht in den Pentosephosphatzyklus ein.

Bei dem in rot dargestellten Elementarmodus gibt es neben dem Ausgleich der Reduktionsäquivalente durch die Thyroxin-Deiodinase (Tdi, 3.8.1.4), die bei Säugetieren vorkommt (Follmann et al., 1995), einen umfangreichen Zyklus der Synthese von Glutathion (GSH).

Der Elementarmodus in Grün schließt den Zyklus der Reduktionsäquivalente Proteinmethionin-S-oxid-Reduktase (Pmr, 1.8.4.6), und es kommen einige wenige Teile des Salvage Pathways zum Einsatz. Die Proteinmethionin-S-oxid-Reduktase katalysiert eine Reaktion, bei der Proteine, die am Schwefel des Methionins oxidiert sind, wieder reduziert werden. So können die Proteine weiter verwendet und müssen nicht abgebaut werden (Lowther et al., 2000).

In Blau ist ein Elementarmodus zu sehen, der umfangreich Gebrauch des Salvage Pathways macht und dabei auch gleich ATP umwandelt. Die Reduktionsäquivalente werden in diesem Beispiel von der Proteindisulfid-Isomerase (Pdo, 5.3.4.1) benötigt, die dafür sorgt, dass Proteine richtig gefaltet werden, indem korrekte Disulfidbrücken ausgebildet werden (Holmgren, 1989).

Bei dem Elementarmodus, der in Violett dargestellt ist, kommen mit der Bisphosphoglycerat-Mutase (DPGM, 5.4.2.4) und 2,3-Bisphosphoglycerat-Phosphatase (DPGase, 3.1.3.13) zwei Enzyme vor, die es nur im Erythrozyten gibt. Durch das Vorkommen des Metaboli-

ten 2,3-Bisphosphoglycerat (D23PG) kann im Gegensatz zum 1,3-Bisphosphoglycerat keine energiereiche Bindung genutzt werden, um ATP zu bilden. Deshalb kommen in diesem Elementarmodus auch keine Reaktionen zusätzlich zur Glykolyse vor, die einen ATP-Umsatz bedingen. Die Reduktionsäquivalente werden in der Reaktion der NO-Synthase (Nos, 1.14.13.39) verbraucht.

Der orange dargestellte Elementarmodus enthält die Reaktionen Glutathion-Peroxidase (Gpol, 1.11.1.9), die Reduktion von Medikamenten (Xen) und Harnsäure als Oxidationsschutz (Har). Bei diesen Reaktionen kommt es zu einem Umsatz von Glutathion (GSH), und Harnsäure spielt neben den weiter oben schon erwähnten Enzymsystemen eine wichtige Rolle bei der Bewältigung von oxidativem Stress (Missirlis et al., 2001).

Tab. 3.5: Einige Beispiele für biologische Funktionen, in denen sich Anopheles und Plasmodium unterscheiden

Funktion	Code	EC	Organismus
Kalzium-Bindeprotein	Cab	(F)	Anopheles, Plasmodium
Dehydroascorbatreduktion	Dhr	(F)	Anopheles, Plasmodium
DOXP-Reductoisomerase	Dxr	1.1.1.267	Plasmodium
DOXP-Synthase	Dxs	4.1.3.37	Anopheles, Plasmodium
Glutathionreduktion	Gre	(F)	Anopheles, Plasmodium
Häm als Redoxshuttle	Hae	(F)	Plasmodium
Melanin als Radikalerzeuger	Mla	(F)	Anopheles
Metallreduktion	Mre	(F)	Anopheles, Plasmodium
NK-Lysin-Reduktion	Nkl	(F)	Anopheles, Plasmodium
DNA-Polymerase	Pol	2.7.7.7	Plasmodium
Thiol-Peroxidase	Tpo	(F)	Anopheles, Plasmodium
Vitamin K-Epoxid-Reduktase	Vke	1.1.4.1	Anopheles, Plasmodium

(F): Vorhandene Funktion ohne zugeordnete EC Nummer

4 Diskussion

4.1 Identifizierung von regulatorischen Elementen und Domänen

Die Interaktionen von zwei Molekülen in einer Zelle sind stark nicht-linear und schwierig in einer geschlossenen und umfassenden Art und Weise zu beschreiben. Hier werden neue Ergebnisse vorgestellt, die durch aktuelle Untersuchungen durch ein optimiertes heuristisches Suchverfahren mit verschiedensten Algorithmen erzielt worden sind. Dabei ging es um die Aufdeckung von Interaktionen der Proteine und die Vorhersage derselben aus Sequenzen. Die Untersuchungen konzentrieren sich auf Genumgebungen, um eine Vorhersage darüber zu treffen, welche Genprodukte wahrscheinlich zusammenwirken. Zukünftig könnte bei der Suche nach möglichen Iron Responsive Elements (IREs) die Übersetzung aller offenen Leseraster in Aminosäuren und Bewertung der Qualität der Proteine in Bezug auf ihre Lage und Dimension automatisiert werden. Daraufhin kann auch die Blastsuche automatisch durchgeführt werden. Inzwischen wurde mit dem RNA Analyzer (Bengert et al., 2003) ein Werkzeug geschaffen, mit dem einige der Aufgaben wie die Erkennung der Faltung der RNA ohne Eingriff des Benutzers ablaufen. Bisher hat sich die Erforschung der Regulation des Informationsflusses in der Zelle auf DNA statt RNA konzentriert, weil die Handhabung von RNA-Proben im Vergleich zu DNA-Proben schwieriger war. In Zukunft könnte die experimentelle Untersuchung von IREs stark ausgeweitet werden. Die weitere Untersuchung von *Staphylococcus aureus* mit den Möglichkeiten der vollständigen Genomsequenz ist besonders nutzbringend in Bezug auf die hohe Anzahl von nosokomialen Infektionen, an denen diese Bakterien beteiligt sind (Platt, 2001; Madigan et al., 1997). Die Suche nach Iron Responsive Elements im Genom von *Staphylococcus aureus* führte leider am Ende nicht zu im medizinischen Sinne verwertbaren Daten, weil zum Zeitpunkt der Untersuchung die Sequenzen des Genoms noch keine sehr hohe Stabilität erreicht hatten. Diese kommerzielle Sequenz hatte noch sehr viele Fehler. Generell ist die Suche nach Strukturen und Interaktionspartnern weiterhin eine herausfordernde Aufgabe, die nur durch spezifische Algorithmen zu lösen ist. Es ist auch klar, dass die biologische Realität bei weitem komplexer ist als die bisherigen Modelle. Besonders Modifikationen in der Regulation, Interaktionen, die nur im Übergang bestehen, und die dynamischen Beziehungen zwischen den analysierten Molekülen sind hier nicht mit eingeflossen.

Obwohl brauchbare und interessante Vorhersagen für Interaktionen in einer Zelle, basierend auf mathematischen Werkzeugen und Algorithmen, gemacht werden können, be-

darf es doch der experimentellen Bestätigung. Trotz alledem werden die hier angewendeten und die weiteren in Entwicklung befindlichen Algorithmen anderer Gruppen (Dinner et al., 2000; DeGrado et al., 1999; Skerra, 2000; Eaton et al., 2000) in Zukunft immer wirkungsvoller und wichtiger werden. Mit ihrer Hilfe kann durch die Analyse von zellulären Interaktionen die Anzahl der experimentell zu testenden Kandidaten drastisch reduziert werden.

Die Suche nach einem Biotintransporter in *Plasmodium falciparum* wurde weiter vorangetrieben, es gab aber kein positives Ergebnis. Eine PSI-BLAST-Suche mit der Proteinsequenz aus *Plasmodium* (PFB0275w) konnte nicht zur Sequenz des Biotintransporters aus *Arabidopsis* (AtSUC5) zurückführen, weil diese zu diesem Zeitpunkt noch nicht veröffentlicht war. Ob PFB0275w möglicherweise als Transportprotein für etwas anderes als Biotin dient, wurde bisher nicht vertiefend untersucht.

4.2 Glutathionreduktase als Redoxsensor

Glutathionreduktasekristalle können mit guten Erfolgsaussichten bei der Suche nach neuen Zielen für neue Medikamente gegen Malaria eingesetzt werden. Generell kann durch die Signalverstärkung der Kristalle die Wirkung aller potentiellen Medikamente, die den Redoxzustand einer Zelle ändern, exakt überprüft werden zum Beispiel für die Suche nach neuen Zytostatika. Im Gegensatz zu einer Messung des pH-Wertes mit einem Indikator liegt der Vorteil der Messung mit Glutathionreduktasekristallen darin, dass die Pufferkapazität der NADPH-Konzentration und die Konzentration aller anderen redoxaktiven Substanzen in der Zelle in dieser Messung integriert (siehe Tab. 8.2 und 8.3) und direkt optisch gemessen werden. Außerdem finden die Messungen *in situ* und *in vivo* an ganzen Zellen statt. Bei den Kristallen der Glutathionreduktase als Redoxsensor ergaben sich aber auch Probleme, weil sich die zu messenden Kristalle auch in den Vorversuchen trotz der Kammer mit kleinem Volumen von 25 µl immer noch leicht bewegt haben, auch wenn das Reduktionsmittel sehr vorsichtig durch eine Kanüle zugegeben wurde. Zusätzlich ergaben sich Probleme, wenn die Flächen zur Auswertung der Kristalle zu klein waren und sich dann vergleichsweise große Fehler durch die Verschiebung der Auswahlmasken ergeben konnten. Die Größe der Flächen, die ausgewertet werden konnten, war generell limitiert. Da die Flächen sehr unregelmäßig waren, wurden sie nicht nur durch die Kanten des Kristalls mit Lichtbrechungseffekten begrenzt, sondern auch durch Brüche. Dies alles führte dazu, dass der Effekt, der gemessen werden konnte, nicht so prononciert war, wie man es sich eigentlich wünschen würde. Vielleicht war die Software auf solche Spezialfälle wie das Verschieben der Masken auch nicht optimal ein-

gerichtet. So kann man sich vorstellen, dass der benötigte Verschiebungsvektor vom Programm automatisch ermittelt wird oder dass sich eine solche Routine zumindest integrieren lässt. Um dem Kristall als Sensor keine Möglichkeit zu geben, seine Lage zu verändern, könnte man den Kristall vielleicht an einer Sonde fixieren und dann in die Zelle einführen. Die Messung des Redoxzustandes von vollständigen Zellen mit Glutathionreduktasekristallen könnte ihre Erweiterung in Bindung der Kristalle an Nanooberflächen (Wang et al., 2002) finden. Bei einer weiteren, vor kurzem vorgeschlagenen Methode werden die massiven Konformationsänderungen, die auftreten, wenn ungefaltete Proteine in Anwesenheit ihres Liganden sich zum nativen Protein umlagern, direkt gemessen. Dieser Biosensor ist so selektiv, dass er sogar in komplexen, stark kontaminierten Umgebungen funktioniert (Kohn et al., 2005). Bei der Messung einer einzelnen Zelle wäre im Gegensatz zu einer ungerichteten so genannten „shot gun“-Methode bei der Verwendung von Sensoren an der Spitze von Nanospitzen immer klar, welche Zelle gerade untersucht wird. Auch die Ausrichtung der Kristalle für eine optimale Messung wäre gewährleistet. Sollten sich die Kristalle als zu klein für eine sichere Messung herausstellen, kann man diese Nanospitzen als Träger verwenden, um größere Kristalle gut definiert in die lebenden Zellen zu bringen. Dies unterstreicht das Potential, das Enzyme als Mikrokristalle in der pharmazeutischen Forschung haben. Andere interessante Kristalle könnten aus Enzymen bestehen wie Adenylatzyklase, HIV-Proteasen oder Proteasen, die andere virale Proteine schneiden. Zusätzlich könnte man sich Schichten von verschiedenen Enzymkristallen vorstellen, die als Kaskade arbeiten und bei der Umsetzung des Substrates das zu messende Signal immer weiter verstärken. Schließlich könnte eine solche Vorgehensweise mit einer einleitenden Qualitätskontrolle der Kristalle einhergehen, und so würden Sensoren mit besonders großen, nicht von Brüchen beeinflussten Flächen optimaler Ausrichtung Verwendung finden.

4.3 Glutathion als zentrales Molekül in metabolischen Netzwerken

Wir haben gezeigt, dass das Problem der kombinatorischen Explosion der Anzahl der Elementarmoden durch eine geeignete Klassifikation des Status der Metaboliten gelöst werden kann. Die Anzahl der Elementarmoden kann sehr stark reduziert werden, wenn ein passender Satz an Metaboliten zusätzlich zu den Edukten oder Produkten des biochemischen Systems („source“ und „sink“ Metabolite) für den Ablauf als extern bewertet wird. Speziell haben wir vorgeschlagen die Bewertung der Metaboliten zu nutzen, um die Anzahl der Elementarmoden zu minimieren. Auf diese Art und Weise kann der Aufwand, die oftmals riesige Anzahl der Elementarmoden zu interpretieren, reduziert werden. Dies macht eine Auswertung oft überhaupt erst möglich. Der verwendete Algorith-

mus basiert auf der Annahme, dass im Prinzip jeder Metabolit des Systems als gut gepuffert (und damit extern) angesehen werden kann, wenn er in einer ausreichenden Anzahl an Reaktionen vorkommt. Dann verändert die Geschwindigkeit einer einzigen Reaktion die Gesamtkonzentration eines Stoffes nicht sehr stark.

Früher galten die Elementarmoden als biochemische Auf- und Abbauwege (Schuster et al., 2000b). Unsere Ergebnisse führen zu der Frage, ob Elementarmoden festgelegte Charakteristika biochemischer Netzwerke sind oder künstliche Konstrukte, die durch mathematische Modellierung entstehen. Wir denken, dass das Konzept von biochemischen Auf- und Abbauwegen gewisse Aspekte lebender Zellen abbildet. Sie sind aber nicht einzigartig auf eine objektive Art und Weise festgelegt. Wie jedes andere wissenschaftliche Konzept hängt es davon ab, wie detailliert die Analyse ist. Wird zum Beispiel die Synthese einer Aminosäure modelliert, wird der Reaktionsweg aus sehr viel mehr Enzymen bestehen, als wenn nur ein paar Vorläufer dieser Aminosäure im Modell abgebildet werden sollen. Im Kontext der vorliegenden Analyse können wir schließen, dass die Anzahl der Elementarmoden in einem biochemischen Netzwerk auch von dem biochemischen Schwerpunkt des Modells abhängt. Dieser Schwerpunkt wird nicht notwendigerweise eine feststehende Größe sein. Dies kann aber objektiver gehandhabt werden, wenn das Minimierungsprinzip dieser Studie verwendet wird. Der Algorithmus hilft, genau die minimale Anzahl an Transformationen in einem System festzustellen. Diese Zahl ist eine interessante Charakteristik eines Reaktionssystems.

Das Programm `EI_EXCHANGE` wurde geschrieben, um alle möglichen Kombinationen von internen und externen Metaboliten zu generieren. So kann man prinzipiell die minimale Zahl der Elementarmoden herausfinden. Verwendet man aber stattdessen einen stochastischen Minimierungsalgorithmus, kann die Zeit, die minimale oder doch wenigstens eine geringe Anzahl an Elementarmoden zu finden, stark reduziert werden. Aus diesem Grund sollte ein solches Optimierungsprogramm verwendet werden, wenn zu viele Kombinationen untersucht werden sollen. Dabei muss nicht unbedingt der Metropolis-Algorithmus genutzt werden. Simulierte Bindung von DNA-Fragmenten, evolutionäre Optimierung oder andere stochastische Strategien können genauso zum Einsatz kommen. Der Metropolis-Algorithmus wurde hier zur Demonstration eingesetzt. Während ein globales Minimum in sehr großen Systemen nicht notwendigerweise gefunden wird, wurde hier mit dem System mittlerer Größe von 59 Reaktionen mit Glutathion im Mittelpunkt eines der globalen Minima schnell identifiziert. Ein weiterer Vorteil der stochastischen Methode im Vergleich zur erschöpfenden Suche ist der Einfluss auf die Startbedingungen: Da bei der Suche nach einer minimalen Anzahl der Elementarmoden alle Metaboliten an Verzweigungspunkten als extern betrachtet werden, liegen die Lösungen oftmals nahe beieinander. Das bedeutet, dass diese Elementarmodensysteme

sich schnell berechnen lassen, weil sowieso nicht so viele Elementarmoden im Ergebnis erzielt werden. Bei der erschöpfenden Suche werden aber auch Systeme berechnet, die sehr viele Elementarmoden enthalten und damit in der Berechnung lange dauern oder gar nicht zu berechnen sind. Zum Beispiel müssten bei der erschöpfenden Suche des Testsystems aus Abbildung 3.9 im schlimmsten Fall 59049 Elementarmoden berechnet werden. Schon die Startbedingungen des Metropolisprogramm führen zu einer Situation mit nur 31 Elementarmoden als Ergebnis. Die Anzahl der Elementarmoden ist schnell zu berechnen, und das Minimum von 30 Moden ist zügig gefunden.

Beide Minimierungsalgorithmen wurden an Hand von drei kleineren biochemischen Beispielen und einem größeren Netzwerk des Glutathionmetabolismus veranschaulicht. Für dieses metabolische System (Abb. 8.11) mit den vielen alternativen Redoxschutzmechanismen galt es als Gesamtaufgabe, die Redoxhomöostase zu maximieren. Dies geschieht durch viele unterschiedliche schützende Metaboliten und Intermediate als Teil eines sehr viel komplexeren und vollständigeren zellulären Metabolismus. Auch hier gibt die Methode sinnvolle Resultate. Zum Beispiel werden die Toleranz von oxidativem Stress beim Wechselspiel von Oxidation und anschließender Regeneration von GSH wie auch die Synthese und der Abbau des Glutathions selbst (Becker et al., 1999) korrekt von den Elementarmoden wiedergegeben. Im Gegensatz zu den von Schuster (2000b) untersuchten Elementarmodensystemen der Glykolyse oder des Pentosephosphatweges ist das Reaktionssystem um das Glutathion weniger stark vernetzt. Vielleicht kann hier eine Erweiterung, ein Anschluss an andere Reaktionssysteme noch eine stärkere Vernetzung mit Vorteilen bei der Interpretation bringen.

Im Falle von mehreren Lösungen mit gleicher minimaler Zahl an Elementarmoden sollte man unserer Meinung nach die Lösung mit der geringsten Anzahl an externen Metaboliten vorziehen. Natürlich kann dies auch wieder zu mehreren möglichen Lösungen führen. Dies ist interessant, denn es bedeutet, dass verschiedene Wege der Charakterisierung eines biochemischen Netzwerkes in Form von unterschiedlichen Auf- und Abbauwegen gleich relevant sein könnten. Auf der anderen Seite bedeutet es, dass die Methoden nicht in allen Fällen alle Unsicherheiten und Ungenauigkeiten in der Bewertung der Metaboliten verhindern können. Zusätzlich ergaben sich beim Minimierungsalgorithmus und beim Algorithmus zur Zerlegung des Netzwerkes in Unternetzwerke bei entsprechend gewählten Schwellenwerten die gleichen Einteilungen in Unternetzwerke. Dies ist der Fall, obwohl die Algorithmen für völlig unterschiedliche Anwendungen entwickelt wurden: In einem Fall geht es darum, ein gesamtes Netzwerk zu untersuchen und dabei die Zahl der das Netzwerk beschreibenden Elementarmoden zu minimieren. Im zweiten Fall soll das Reaktionsnetzwerk in kleinere Unternetzwerke zerlegt und jedem Unternetzwerk eine biochemische Interpretation gegeben werden. Ob die beiden

unterschiedlichen Algorithmen bei geeigneter Wahl der Schwellenwerte generell die gleichen Ergebnisse liefern, ist eine interessante Frage zukünftiger Untersuchungen. Die Nicht-Einmaligkeit ist ein verbreitetes Phänomen in der Wissenschaft, zum Beispiel in der Quantenmechanik bei Eigenzuständen oder in der Linearen Algebra. Man kann jedoch erwarten, dass bei vielen Elementarmodensystemen biochemische Gründe eine Auswahl des Systems ermöglichen.

Das Glutathionnetzwerk enthält eine beträchtliche Anzahl an multifunktionellen Enzymen, die eine umfangreiche Substratspezifität haben. Hier sind es unter anderem die γ -Glutamylzyklotransferase (CytI-IV) und die Hypoxanthinoxidase (HypI-IX). Dabei ist zu beachten, dass drei Elementarmoden die unterschiedlichen Funktionen der Hypoxanthinoxidase nutzen, ohne dass weitere Enzyme beteiligt sind. Hier liegt im Prinzip nichts anderes vor, als eine Menge von Elementarmoden, die nur aus einem Enzym bestehen. Multifunktionale Enzyme sind in der Analyse von Auf- und Abbauwegen nicht ungewöhnlich (Schuster et al., 2002c). Bei zwei Elementarmoden wird als Gesamtstöchiometrie nur ATP hydrolysiert, und keine weiteren Metaboliten werden synthetisiert oder abgebaut. Dies wird als „futile cycle“ bezeichnet. Es ist ein Hauptmerkmal der Elementarmodenanalyse solche Reaktionsmuster zu erkennen (Schuster et al., 2000b; Rohwer et al., 2001).

Wie durch die untersuchten Beispiele gezeigt wurde, ergibt der hier angewendete Minimierungsansatz Ergebnisse, die sich gut biochemisch interpretieren lassen. Es wird jedoch nicht behauptet, dass sie in jedem Fall die besten Ergebnisse liefern. Eine viel versprechende Verfeinerung des Algorithmus in der Zukunft betrifft eine analoge Behandlung von Metaboliten gleicher Substanzklassen. Es erscheint zum Beispiel sinnvoll, alle Aminosäuren auf die gleiche Art und Weise zu behandeln. Bei dem Elementarmodensystem mit Glutathion im Mittelpunkt zeigt sich, dass Glycin und Cystein als intern, Glutamat aber als extern bewertet werden müssen. Von einem biochemischen Standpunkt her ist es sinnvoller, Glycin und Cystein genauso zu behandeln wie Glutamat, also extern. Dies würde zu einem Elementarmodus mit folgender Gesamtstöchiometrie führen: $GLU + CYS + GLY + 2ATP = GSH + 2ADP$. In anderen Reaktionssystemen kann es natürlich sinnvoll sein, alle drei Aminosäuren als intern einzustufen. Zusätzlich sollten alle Metaboliten extern sein, die in das untersuchte System von außen eingebracht werden, wie zum Beispiel Glucose beim Metabolismus der Kohlenwasserstoffe. Da die meisten dieser Metaboliten nur in einer Reaktion verwendet werden, werden sie automatisch in den Programmen als extern eingestuft. Es ist verständlich, auf der Stufe des gesamten Systems oder der Zelle verbrauchte oder synthetisierte Metaboliten („source“ und „sink“ Metaboliten) als extern zu definieren, auch wenn sie an mehr als einer Reaktion teilnehmen (ihre „connectivity“ ist größer als eins, siehe Tabelle 8.3), obwohl wir dies im Beispiel

des Glutathionmetabolismus nicht getan haben. Das Stoffwechselnetzwerk um die Glutathionreduktase und die dazugehörige Dokumentation dienen jetzt als Grundlage für die Entwicklung eines weiteren Algorithmus, mit dem Proteinexpressionsdaten in das Elementarmodennetzwerk integriert werden sollen.

Für das Reaktionsnetzwerk mit Glutathion im Mittelpunkt sind die Ergebnisse der Minimierung der Elementarmoden mit einer älteren Methode zur Bewertung, ob die Metaboliten extern oder intern sein sollten (Schuster et al., 2002a), verglichen worden. Es zeigte sich, dass sich die Ergebnisse nur wenig unterscheiden. Die Unterschiede könnten weiter reduziert werden, wenn statt der Frage, bei wie vielen Reaktionen ein Metabolit verwendet wurde („connectivity“), ein Maß zum Einsatz kommt, das „Anzahl der lokalen Routen“ genannt werden könnte. Zum Beispiel wurde hier NADPH von fünf irreversiblen Reaktionen gebildet und von einer irreversiblen Reaktion verbraucht. So gab es fünf Möglichkeiten, diese Reaktionen lokal zu Routen durch das Netzwerk zu verbinden. Aus diesem Grund war es sinnvoll, NADPH als intern zu bewerten, wie es sich auch bei der Anwendung der Algorithmen ergab (das Gleiche galt auch für NADP). Hätte man auf der anderen Seite einen Metaboliten, der durch vier irreversible Reaktionen synthetisiert und durch zwei irreversible Reaktionen wieder abgebaut würde, würde dieser Vorteil schwerer wiegen: Man hätte hier acht lokale Routen, aber der Metabolit kommt nur in sechs Reaktionen vor (seine „connectivity“ ist in diesem Fall sechs). $4 \times 2 = 8$ ergibt mehr als $4 + 2 = 6$ und deshalb sollte der Metabolit als extern eingestuft werden.

Neben der Minimierung der Anzahl von Elementarmoden, wie es hier im Detail besprochen wurde, mag die Maximierung der Anzahl von mehr als nur akademischem Interesse sein. Wenn in einer lebenden Zelle mehrere alternative Elementarmoden existieren, kann ein gesuchtes Produkt auch hergestellt werden, wenn ein oder mehrere Enzyme entfernt werden („knock out“). Das führt zu robusteren Systemen, einer bedeutenden Eigenschaft von metabolischen Systemen (Barkai et al., 1997). Es ergab sich eine stabilere Homöostase.

Optimierungsstudien sind bei der Modellierung biochemischer Sachverhalte weit verbreitet. Die meisten Untersuchungen befassen sich mit der Optimierung lebender Organismen während der Evolution (Heinrich et al., 1996; Voit, 2000) oder beim Bioengineering (Stephanopoulos et al., 1998). Der Ansatz, der hier zum Tragen kommt, ist ein wenig anders: Wir versuchen unser Verständnis von lebenden Zellen zu optimieren. Elementarmoden stellen ein Konzept oder ein Modell bestimmter Aspekte des zellulären Metabolismus dar. Vereinfacht man dieses Modell so stark wie möglich, ohne wichtige Merkmale zu verlieren, hilft es uns, die Komplexität des Metabolismus besser zu verstehen.

4.4 Verallgemeinerung der Methode für die Analyse von Domänenunterschieden zwischen Mensch und Malaria-Parasit

Automatische Proteinklassifikation

Verschiedene Proteinklassifikationssysteme sind schon früher vorgeschlagen worden. Unter diesen waren zum Beispiel CATH (Orengo et al., 1997) und SCOP (Murzin et al., 1995), bei denen die topologische Klassifikation von immer umfangreicheren Sammlungen von Proteindaten nur teilweise automatisch erfolgt und des menschlichen Eingriffs bedarf. Neben diesen Klassifikationen haben zahlreiche Untersuchungen zur maximalen Anzahl der unterschiedlichen Proteinfaltungen ergeben, dass es generell einige hundert, wenn nicht sogar einige tausend Faltungen gibt (Zhang et al., 2001; Panchenko et al., 1997). Betrachtet man das Problem der Proteinklassifikation von Taylors (2002b) neuem Ansatz, verschiebt sich die Klassifikation von Proteinen von einem Problem der Eingruppierung in vorhandene Topologien hin zu dem Problem, das beste Set von idealisierten Strukturen zu finden. Taylor hat hier einen neuen, flexiblen und automatisierten Ansatz gewählt, der auf Proteinsegmenten beruht. Die Proteine werden in grundlegende Elemente zerlegt, statt die Sekundärstruktur direkt zur Klassifikation zu verwenden. Durch diese geschickte Neudefinition von Sekundärstrukturelementen als Segmente, die die idealisierten Formen bilden, ergibt sich ein völlig automatisierter Klassifikationsalgorithmus. Damit sind subjektive Einflüsse bei der Klassifikation der Proteine vermieden, und eine einfache und klare Klassifikation an Hand der idealisierten Formen ist möglich. Die so klassifizierten Proteine können einfach dargestellt und problemlos diskutiert werden, ohne so streng definierte Bezeichnungen wie Helices oder Fassstrukturen zu benötigen. Für rein helikale Proteine, Transmembranproteine und dreieckige Settings von β -Proteinen und auch interne Wiederholungen von β -Faltblattstrukturen müssen allerdings noch Erweiterungen entwickelt werden. Zur Zeit können α -Domänen mit diesem Ansatz nicht hinreichend klassifiziert werden. Es scheint aber ein rein technisches Problem zu sein, das in der nahen Zukunft gelöst wird. Auch Taylor erkennt an, dass es keine strikten Energiedifferenzen zwischen verschiedenen Sekundärstrukturen gibt und deshalb der Vergleich mit dem Periodensystem als Symbol in dieser Hinsicht nicht trägt. Auch ist das Problem der Domänendefinition genau genommen nicht gelöst. Da schon die idealisierten Strukturen alle die Größe von Domänen haben, wird von Taylor (2002b) vorgeschlagen, die jeweils beste Übereinstimmung als Domäne zu nehmen. Hier handelt es sich nur um eine Näherungslösung ohne klare Definition der Domänengrenzen. Die Klassifikation in dem „Periodensystem“ führt zu einer Sortierung, aber die Hierarchien, die mit

CATH und SCOP entwickelt werden, sind natürlicher. Das ist besonders wichtig, wenn Proteine analysiert werden müssen, und dabei Domäne für Domäne verglichen werden soll. Außerdem kann die automatisierte Entdeckung, aber nicht der automatisierte Vergleich von Domänen leicht bewerkstelligt werden, wie man bei den bekannten Strukturdomänen von SCOP sieht (Schmidt et al., 2002). Man muss obendrein bedenken, dass es noch zahlreiche weitere Klassifikationssysteme von Domänen gibt. Die drei idealisierten Formen mögen eine untere Grenze für die Erzeugung eines automatisierten Systems darstellen, aber es gibt viele Klassifikationsalternativen wie zum Beispiel die Gruppierung von Proteinen in α , β , α/β und $\alpha + \beta$, gemäß den meisten hierarchischen Proteintopologiesystemen. Es treten noch dazu bei Proteinen nicht nur solche Sekundärstrukturelemente auf, sondern es ist auch eine Klassifikation nach verschiedensten Wendungen und Schleifen möglich (Oliva et al., 1997; Rufino et al., 1996; Wintjens et al., 1996; Burke et al., 2001). Besonders Proteinstrukturen in der Form kreisförmiger Schleifen (Berezovsky et al., 2001) versprechen neue Einsichten, unabhängig von Domänendefinitionen. Außerdem gibt es verschiedene Ansätze, die mit Abstandsmatrizen oder Erkennungssystemen für die räumliche Verteilung der Aminosäuren in einem Protein, besonders mit der Graphentheorie (Bonchev et al., 2001) oder NMR-Techniken (Grishaev et al., 2002) arbeiten. Weitere Fortschritte in diesen Forschungsgebieten sind anzunehmen. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die automatische Bestimmung von Proteintopologien durch die idealisierten Strukturen von Taylor (2002b) ein wertvolles Werkzeug ist. Die besondere Stärke des neuen Systems liegt in der Vermeidung der Schwierigkeiten, die bei der Definition von spezifischen Sekundärstrukturen auftreten, weil bei diesem System Proteinsegmente nur ungefähr zu Standardsekundärstrukturen passen müssen. Die Reduktion auf drei Hauptformen ist auf der einen Seite artifiziell, und die Art und Weise, wie das System aufgebaut ist, muss weiterentwickelt werden. Das gilt besonders für die Domänen, die nur aus α -Helices bestehen, und ein paar andere Ausnahmen. Auf der anderen Seite ist die grundlegende Idee viel versprechend, sich von der Definition spezifischer Sekundärstrukturelemente zu lösen und stattdessen eine automatische Topologie durch einen Algorithmus entwerfen zu lassen. Eine verbesserte automatische und doch natürliche Klassifikation von Proteinstrukturen jeglicher Topologie sollte in nicht zu weiter Ferne realisierbar sein.

Informatische Methoden

Während die Menge an vorhandener genomischer Information immer weiter zunimmt, sinkt ihre Qualität eher. Dies geschieht, weil immer größere Datenmengen verarbeitet und gepflegt werden müssen, dafür aber häufig das Personal fehlt. Immer mit Bedacht werden müssen komplexe ethische und gesetzliche Fragestellungen, besonders wenn es um das menschliche Genom oder sogar nur um einzelne Patientengruppen geht (Issa,

2002; Burke et al., 2002). Zusätzlich fehlen bei vielen Genomsequenzen biochemische und experimentelle Bestätigungen der Vorhersagen. Außerdem werden Informationen von sehr gut untersuchten Genomen auf neu sequenzierte Genome übertragen, um diese schneller annotieren zu können. Dabei wird von einer Proteinähnlichkeit auf eine ähnliche Funktion geschlossen. Sollte nur ein Teil der Argumentation falsch sein – was noch wahrscheinlicher wird, wenn sich die Argumentation über mehrere Genome erstreckt –, dann führt dies schnell zu falschen Zuweisungen (Kyrpides et al., 1999). Die automatische Genomannotation ist weit davon entfernt perfekt zu sein und kann so zu Missinterpretationen führen. Aber auch die individuelle Annotation durch Experten unterliegt dieser Einschränkung. Nach der ersten manuellen Annotation des Genoms von *Mycoplasma pneumoniae* (Himmelreich et al., 1996) wurde zum Beispiel eine erneute Annotation (Dandekar et al., 2000) durchgeführt. Dabei änderte sich die Zuordnung in der Hälfte aller Fälle: Bei einem Viertel war die Änderung nur geringfügig, beim Rest substanziell. Es wurden nicht nur deutlich mehr Proteinen Funktionen zugeordnet. Es wurden auch elf neue Leseraster gefunden. Genomannotation ist also eine kontinuierliche Aufgabe. Die Suche nach neuen Medikamenten gegen Infektions- und durch Parasiten ausgelöste Krankheiten (Binder et al., 1999) wie Malaria profitiert stark von den hier angesprochenen bioinformatischen Werkzeugen. Besonders die Rekonstruktion von Stoffwechselwegen zur Entdeckung neuer Zielenzyme und die vergleichende Analyse von vektor- oder parasitenspezifischen Stoffwechselwegen eröffnen spannende Möglichkeiten für die pharmakologische Forschung. Dies wurde kürzlich für Malaria von der Firma Celera untersucht (Hoffman et al., 2002). Eine andere Aufgabe der Zukunft ist die eingehende Analyse von eukaryontischen Genomen. Da können zusätzliche Informationen erlangt werden, wenn die Unterschiede von eukaryontischen Genprofilen im Detail betrachtet werden. Bei den Expressionsprofilen von Mensch und Schimpanse haben sich interessante Unterschiede finden lassen (Pennisi, 2002). So wird die Analyse des menschlichen Genoms stark von einem vollständig sequenzierten Genom eines nahen Verwandten wie des Schimpansen profitieren (Kaessmann et al., 2002; Pääbo, 2003).

In Verbindung mit den vorhandenen großen Datenbanken für Enzyme und Genome werden die bioinformatischen Werkzeuge zu einem eindeutigen Geschwindigkeitsgewinn und einer Kostenreduktion bei der Rekonstruktion von Stoffwechselwegen, der Identifizierung von Zielmolekülen (Pfoest, 1998; Ward, 2001; Bumol et al., 2001) und damit in der Medikamentenentwicklung führen. Als großes Ziel gilt noch immer die bioinformatische Analyse des Weges von der Genomsequenz zum komplexen Genotyp. Es geht auch um die Frage, wie Sequenzveränderungen am Ende entweder als Krankheit sichtbar werden oder wie sie diese Krankheit zu verhindern helfen. Die Beantwortung dieser Frage wird neben zahlreichen anderen Kooperationen auch durch eine Zusammenarbeit mit dem PathoGenoMik Netzwerk gefördert. Individuelle genom- oder art-

spezifische Stoffwechselwege und generelle Unterschiede in Stoffwechselwegen können mit diesen Werkzeugen in einem untersuchten Enzymnetzwerk immer präziser aufgelöst werden. Als direkter Effekt auf die Medikamentenentwicklung führt dies zu einer Beschleunigung der Prozesse für Forscher mit Zugang zu diesen Technologien. Der Einfluss von neuen Wegen zur Medikamentenentwicklung (Moore, 2002; Friedrich, 2000; Winkelmann, 2001) – über genomics, proteomics und der bioinformatischen Analyse von Sequenzen oder der Rekonstruktion von Stoffwechselwegen – wird in Zukunft eine zunehmende Rolle spielen. Dies ist ein weiterer Schritt auf dem Weg zu effektiveren Therapiemöglichkeiten und kann zu neuen Medikamenten führen, die besser mit den Gesundheitssystemen zu vereinbaren sind (Evans, 1992). Dabei geht es auch um die Produktion billiger Arzneimittel gegen wichtige Krankheiten wie zum Beispiel AIDS, um Medikamente in gleichem Umfang in unterentwickelten wie entwickelten Ländern anwenden zu können (Fleck, 2003).

4.5 Glutathion in verschiedenen Redoxnetzwerken im Vergleich

Durch den komplexen Lebenszyklus der Plasmodien bieten sich völlig unterschiedliche Ansätze zur Eindämmung der Malariainfektionen. Auf der einen Seite kann der Eingriff direkt beim Erreger oder dem Vektor erfolgen. Es gibt zum Beispiel viel versprechende Versuche für einen konventionellen Impfstoff gegen *Plasmodium falciparum*, während sich der Erreger im Erythrozyten befindet. Das für das Merozoitenstadium von *Plasmodium* charakteristische Oberflächenprotein Merozoite Surface Protein 1 (MSP-1) wird zur Membran des Erythrozyten exportiert, seine Untereinheiten lassen sich inzwischen gentechnisch herstellen, und sie lagern sich *in vitro* wieder zu MSP-1 zusammen (Kauth et al., 2003). Da Malaria gerade in weniger weit entwickelten Ländern den größten Schaden anrichtet, sind preiswert herzustellende Medikamente besonders wünschenswert. Hier könnte ein Impfstoff auf DNA-Basis die Lösung sein. Dabei bekommt der Patient ein Plasmid mit der DNA des zu exprimierenden Proteins, das als Antigen dient, injiziert. Die Expression des Gens, das für das Antigen kodiert, wird dann zum Beispiel durch die Gabe eines ebenfalls preiswerten Antibiotikums, das an einen Aktivator bindet, gestartet (Lei et al., 2004). Nachteilig wäre, dass einerseits ein preiswertes Antibiotikum gefunden werden muss, das üblicherweise keine Verwendung findet, um eine ungewollte Aktivierung zu verhindern und andererseits so der Verbreitung von Resistenzen gegen die verwendete Gruppe des Antibiotikums Vorschub geleistet wird. Statt den Erreger direkt zu bekämpfen, kann man auch versuchen, seinen Lebenszyklus im Vektor zu unterbrechen. Nachdem es möglich geworden ist, *Anopheles* gentechnisch so zu verändern, dass sie nicht mehr von Plasmodien infiziert werden können, könnte man viele grundlegende

Probleme wie medikamentenresistente Krankheitserreger oder pestizidresistente Vektoren umgehen (Ito et al., 2002). Bei einem solchen Ansatz müsste man allerdings in einem Verbreitungsgebiet alle Anopheles durch gentechnisch veränderte ersetzen, um Erfolg zu haben. Da die neue Eigenschaft an Tochtergenerationen weitergegeben werden soll, muss die genetische Veränderung in der Keimbahn und nicht in somatischen Zellen erfolgen. Zusätzlich müssten die veränderten Mücken genetisch fitter sein als der vorherrschende Wildtyp, damit sie sich überhaupt durchsetzen könnten (Lycett et al., 2002). Bei dem zweiten Vorschlag bei dem sterile Mücken ausgebracht werden, um die Population zusammenbrechen zu lassen (Benedict et al., 2003), gilt es außerdem zu überprüfen, ob die Insekten nicht die entscheidende Nahrungsgrundlage für andere Tiere bilden. Außerdem wären dies Freisetzungsversuche von gentechnisch veränderten Organismen in sehr großem Umfang mit dem definitiven Ziel, die Wildpopulation zu ersetzen. In wirtschaftlich weiter entwickelten Ländern war es oftmals sehr erfolgreich, die Larvenentwicklung zu behindern. Dazu kann gehören, die Fließgeschwindigkeit von Flüssen zu erhöhen, den Bewuchs aus den Flüssen zu entfernen, trotzdem aber für schattige Ufer zu sorgen, Drainagen zu verlegen, zu verhindern, dass es Schwankungen im Wasserstand gibt oder auch die Wasserläufe in Abständen regelrecht zu spülen (Beales et al., 2002b).

Die von mir im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen mehrere für die drei untersuchten Organismen spezifische Elementarmoden auf, die als mögliche Ziele von Medikamentenentwicklung genutzt werden können. Bei Plasmodium ist in das Elementarmodensystem Häm als Redoxshuttle (Hae) eingeschlossen, bei dem Reduktionsäquivalente innerhalb der Plasmodienzelle entstehen, so dass der oxidative Stress in der Zelle steigt und frühzeitiger Zelltod droht. Außerdem wurde die Vervielfältigung der genetischen Information bei dem Elementarmodensystem von Plasmodium, nicht aber dem von Anopheles oder dem des Menschen eingeschlossen, um dem viel schnelleren Wachstum des Parasiten Rechnung zu tragen. So können Strategien, die gegen die Vervielfältigung der DNA gerichtet sind, zwar Plasmodium schaden, aber bei Menschen keine negativen Effekte haben, wenn die Dosierung richtig gewählt wird. Auch die DOXP-Reductoisomerase (Dxr, 1.1.1.267), hier als letztes Enzym im Nicht-Mevalonatweg („non-mevalonate pathway“) der Isoprenoidbiosynthese (Jomaa et al., 1999), kommt nur im Elementarmodensystem von Plasmodium vor und kommt in besonderer Weise deshalb als Ziel für eine Medikamentenentwicklung in Frage. Einerseits könnte man diese Elementarmodensysteme weiterentwickeln, indem sie viel mehr Reaktionen aufnehmen und die Auswertung dann stärker automatisiert erfolgt. Auf der anderen Seite könnte auch die kombinatorische Explosion der Anzahl der Elementarmoden noch besser gemeistert werden. Dazu sind mit der Zerlegung des Netzwerkes in Subnetzwerke und mit der extern/intern-Definition durch EI_EXCHANGE schon wertvolle Grundlagen gelegt. Damit

sind von uns einige zentrale Aspekte studiert worden, weiterführende Untersuchungen werden zur Zeit durchgeführt.

Elementarmodensysteme, in denen die Melanisationsreaktion (Mla) vorkommt, haben das Merkmal, das nur bei Anopheles vorkommen kann: Nach einer Blutmahlzeit von Anopheles muss Plasmodium durch die Darmwand in die Körperhöhle wandern, um die Speicheldrüsen der Mücke erreichen zu können. Bei dieser Passage durch die Darmwand können einige Anopheles Plasmodium mit einer Hülle aus Melanin umgeben und so die Infektion stoppen (Paskewitz et al., 1994). Anopheles, die auf diese Weise eine Infektion sozusagen zurückweisen, werden mit „R“ (refractory), die für Malaria anfälligen Anopheles werden mit „S“ (susceptible) bezeichnet (Collins et al., 1986). Die Melanisierung als üblicher Verteidigungsmechanismus von Insekten gegen Infektionen könnte mit genetisch veränderten Vektoren zur Malariabekämpfung eingesetzt werden (Crampton, 1994). Ein Problem ist dabei, dass Anopheles zwar Plasmodien aus verschiedenen Teilen der Welt mit Melanin einschließt und unschädlich macht, aber gerade die lokalen afrikanischen Plasmodien haben meist eine andere Oberflächencharakteristik und werden nicht erkannt (Beier et al., 1998). Neben der DOXP-Reductoisomerase (Dxr, 1.1.1.267) ist auch die DOXP-Synthase (Dxs, 4.1.3.37) ein Schlüsselenzym des Nicht-Mevalonatweges und kommt noch dazu sowohl bei Plasmodium als auch bei Anopheles vor. Diese Enzyme eignen sich besonders gut als Ziel von Malariamedikamenten, weil hier, verglichen mit dem menschlichen Organismus, ein völlig anderer Stoffwechselweg beschritten wird. Ein Beispiel für ein solches Medikament ist Fosmidomycin, besonders wenn es in Kombination mit weiteren Antibiotika wie Clindamycin gegeben wird (Wiesner et al., 2002). Weitere Reaktionen, die sowohl bei Plasmodium als auch bei Anopheles in den Elementarmoden vorkommen, sind die NK-Lysin-Reduktion (Nkl), Dehydroascorbatreduktion (Dhr), Metallreduktion (Mre), das Kalzium-Bindeprotein (Cab) und die Thiol-Peroxidase (Tpo). Auch diese Reaktionen würden sich gut als Ziele für die Entwicklung von potentiellen Medikamenten gegen Malaria eignen, denn in diesem Ansatz sind sie spezifisch für den Krankheitserreger und den Vektor, nicht aber für den Wirt. Deshalb können sie ohne die Gefahr von direkten Nebenwirkungen als Ziel gewählt werden. Als besonders interessant stellen sich die NK-Lysin-Reduktion (Nkl), Dehydroascorbatreduktion (Dhr) und Metallreduktion (Mre) dar, weil bei diesen Reaktionen der oxidative Stress und damit die Belastung der Organismen sich stark erhöhen lassen. Auch die Vitamin K-Epoxid-Reduktase (Vke, 1.1.4.1) ist in diesem Ansatz nur bei Anopheles und Plasmodium verwendet. Natürlich kommt Vitamin K auch beim Menschen vor, aber hier wissen wir auch, dass es als Medikament in Maßen gegeben werden kann, um die Blutgerinnung in Gefäßen zu reduzieren. Es könnte deshalb prinzipiell ein speziesspezifischer Vitamin K-Antagonist genutzt werden, um in den Stoffwechsel einzugreifen. An der je nach Ort stark unterschiedlichen Resistenz von Ratten gegen Blutgerinnungshemmer lässt sich ermes-

sen, wie groß allein die Unterschiede innerhalb einer Art sein können. Sollten Blutgerinnungshemmer gegen Plasmodien, die den Menschen befallen haben, gegeben werden, müsste abgewogen werden, ob ein möglicher therapeutischer Nutzen gegenüber einer erhöhten Blutungsneigung überwiegt.

Das Elementarmodensystem des Menschen dient zum Vergleich und enthält keine neuen möglichen Ziele von Medikamenten, die gegen Malaria wirken könnten, erlaubt aber den Effekt, den Methylenblau zum Beispiel als BlueCQ auf die Glutathionreduktase des Menschen hat, zu bewerten (Schirmer et al., 2003).

5 Ausblick

Teil dieser Arbeit war die Untersuchung des antioxidativen Abwehrsystems von *Plasmodium falciparum*, die innerhalb des Sonderforschungsbereiches 544 mit dem Ziel, bezahlbare Medikamente zu entwickeln, fortgesetzt wird. Methylenblau wurde schon von Paul Ehrlich als Sabotageinhibitor gegen Dithiolproteine vorgeschlagen (Guttmann et al., 1891). Heute bietet sich mit einer als BlueCQ bezeichneten Kombination der Medikamente Methylenblau und Chloroquin eine moderne Therapie an (Schirmer et al., 2003; Mandi et al., 2005). Diese Kombinationstherapie hat den Vorteil, dass es sich bei ihren Bestandteilen um schon zugelassene Arzneimittel handelt, die sehr preiswert herzustellen und zu vertreiben sind (Schirmer, 2003). Sabotageinhibitoren zeichnen sich generell durch die Fähigkeit aus, antioxidativ wirkende Disulfidreduktasen in Gegenwart von molekularem Sauerstoff in oxidierende Enzyme zu verwandeln (Schirmer et al., 1987; Krauth-Siegel et al., 2005). Ein weiterer viel versprechender Sabotageinhibitor ist ein Medikament, bei dem ein Glutathionreduktase-Inhibitor direkt an ein Malariamittel gebunden ist (Davioud-Charvet et al., 2001). Beide Ansätze könnten so weiterentwickelt werden, dass sie in einer konzertierten afrikaweiten Aktion genutzt werden, um durch eine mehrwöchige prophylaktische Anwendung die Malaria zurückzudrängen.

Die Wirkung von Chloroquin oder einer Kombination mit anderen Medikamenten wie Methylenblau kann auch auf bioinformatische Weise durch Modellierung verschiedener biochemischer Wege bei Plasmodien weiter untersucht werden. Die bisherigen Methoden der Elementarmodenanalyse werden durch Weiterentwicklungen wie YANA erweitert und vereinfacht: Einerseits erleichtert eine graphische Bedieneroberfläche gegenüber der Kommandozeilenbedienung die Nutzung der Software, andererseits sind Formatprobleme durch Integration der einzelnen Komponenten von Elementarmodenanalyse und Zerlegung der Netzwerke eliminiert (Schwarz et al., 2005). Daneben können die bioinformatischen Ansätze auch in der Kontrolle bakterieller Infektionen zu weiteren Ergebnissen führen (Ziebuhr et al., 2004).

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit untersucht zelluläre Netzwerke mit dem Ziel, die so gewonnenen Einsichten medizinisch beziehungsweise biotechnologisch zu nutzen. Hierzu müssen zunächst Proteindomänen und wichtige regulatorische RNA-Elemente erkannt werden.

Dies geschieht für regulatorische Elemente in Nukleinsäuren am Beispiel von Iron Responsive Elements (IREs) in *Staphylococcus aureus*, wobei sich solche Elemente in viel versprechender Nähe zu exprimierten Sequenzen finden lassen (T. Dandekar, F. Du, H. Bertram (2001) *Nonlinear Analysis* 47(1): 225-34). Noch bedeutsamer als Ziele zur Medikamentenentwicklung gegen Parasiten sind Domänenunterschiede in Struktur und Sequenz bei Proteinen (T. Dandekar, F. Du, H. Bertram (2001) *Nonlinear Analysis* 47(1): 225-34). Ihre Identifikation wird am Beispiel eines potentiellen Transportproteins in *Plasmodium falciparum* exemplarisch dargestellt.

Anschließend wird das Zusammenwirken von regulatorischen Elementen und Domänen in Netzwerken betrachtet (einschließlich experimenteller Daten). Dies kann einerseits zu allgemeineren Schlussfolgerungen über das Netzwerkverhalten führen, andererseits für konkrete Anwendungen genutzt werden. Als Beispiel wählten wir hier Redoxnetzwerke und die Bekämpfung von Plasmodien als Verursacher der Malaria.

Da das gesamte Redoxnetzwerk einer lebenden Zelle mit Methoden der pH-Wert-Messung nur unzureichend zu erfassen ist, werden als alternative Messmethode für dieses Netzwerk Mikrokristalle der Glutathionreduktase als Indikatorsystem nach digitaler Verstärkung experimentell genutzt (H. Bertram, M. A. Keese, C. Boulin, R. H. Schirmer, R. Pepperkok, T. Dandekar (2002) *Chemical Nanotechnology Talks III - Nano for Life Sciences*).

Um komplexe Redoxnetzwerke auch bioinformatisch zu modulieren, werden Verfahren der metabolischen Fluxanalyse vorgestellt und verbessert, um insbesondere ihrer Verzahnung besser gerecht zu werden und solche Netzwerke mit möglichst wenig elementaren Flussmoden zutreffend beschreiben zu können.

Die Reduktion der Anzahl von Elementarmoden bei sehr großen metabolischen Netzwerken einer Zelle gelingt hier mit Hilfe unterschiedlicher Methoden und führt zu einer vereinfachten Darstellungsmöglichkeit komplexer Stoffwechselwege von Metaboliten. Dabei dient bei jeder dieser Methoden die biochemisch sinnvolle Definition von exter-

nen Metaboliten als Grundlage (T. Dandekar, F. Moldenhauer, S. Bulik, H. Bertram, S. Schuster (2003) *Biosystems* 70(3): 255-70).

Allgemeiner werden Verfahren der Proteindomänenklassifikation sowie neue Strategien gegen mikrobielle Erreger betrachtet.

In Bezug auf automatisierte Einteilung von Proteinen in Domänen wird ein neues System von Taylor (2002b) mit bekannten Systemen verglichen, die in unterschiedlichem Umfang menschlichen Eingriffs bedürfen (H. Bertram, T. Dandekar (2002) *Chemtracts* 15: 735-9). Außerdem wurde neben einer Arbeit über die verschiedenen Methoden aus den Daten eines Genoms Informationen über das metabolische Netzwerk der Zelle zu erlangen (H. Bertram, T. Dandekar (2004) *it* 46(1): 5-11) auch eine Übersicht über die Schwerpunkte der Bioinformatik in Würzburg zusammengestellt (H. Bertram, S. Balthasar, T. Dandekar (2003) *Bioforum* 1-2: 26-7). Schließlich wird beschrieben, wie die Pathogenomik und Virulenz von Bakterien der bioinformatischen Analyse zugänglich gemacht werden können (H. Bertram, S. Balthasar, T. Dandekar (2003) *Bioforum Eur.* 3: 157-9).

Im letzten Teil wird die metabolische Fluxanalyse zur Identifikation neuer Strategien zur Bekämpfung von Plasmodien dargestellt: Beim Vergleich der Stoffwechselwege mit Glutathion und Thioredoxin in *Plasmodium falciparum*, Anopheles und Mensch geht es darum, gezielte Störungen im Stoffwechsel des Malariaerregers auszulösen und dabei den Wirt zu schonen. Es ergeben sich einige interessante Ansatzpunkte, deren medizinische Nutzung experimentell angestrebt werden kann (H. Bertram, K. Xiao, R. H. Schirmer, T. Dandekar (2005) in Vorbereitung).

Summary

The objective of this thesis is to obtain information, which may be advantageous for biotechnical and medical purposes. In order to achieve this aim it is first necessary to identify protein domains and essential regulatory RNA elements.

In case of regulatory RNA elements this is accomplished by investigating Iron Responsive Elements (IREs) in *Staphylococcus aureus* as a model. In this case these elements are found in much promising vicinity to open reading frames coding for proteins (T. Dandekar, F. Du, H. Bertram (2001) *Nonlinear Analysis* 47(1): 225-34). Even more significant for the purpose of developing pharmaceuticals against parasites are differences of structure and sequence in protein domains (T. Dandekar, F. Du, H. Bertram (2001) *Nonlinear Analysis* 47(1): 225-34). Their identification is shown in a potential transport protein in *Plasmodium falciparum*.

Subsequently the interaction of regulatory elements and domains in networks is considered (including experimental data). The resulting observations may lead to general conclusions concerning network reaction, as well as specific applications. Our example and field of interest are redox networks and Plasmodia causing malaria.

It is not possible to cover the redox network state of a living cell using only pH measurements. Therefore small crystals of glutathione reductase are employed as a more suitable indicator, whose signal is digitally amplified (H. Bertram, M. A. Keese, C. Boulin, R. H. Schirmer, R. Pepperkok, T. Dandekar (2002) *Chemical Nanotechnology Talks III - Nano for Life Sciences*).

In order to bioinformatically modulate complex redox networks techniques of metabolic flux analysis are presented. They are also improved particularly to advance the understanding of interdependences and to facilitate the correct comprehension of such networks with as few elementary flux modes as possible.

In this thesis the reduction of the number of elementary modes of large and intertwined metabolic networks succeeds with various methods. This leads to a simpler model of complex metabolic functions. For each of the methods used in this process the biochemically justified definition of external and internal metabolites constitutes the basis

(T. Dandekar, F. Moldenhauer, S. Bulik, H. Bertram, S. Schuster (2003) *Biosystems* 70(3): 255-70).

In a more general sense methods of protein domain classification and new strategies for the control of microbial pathogens are considered.

In reference to automated classification of protein domains a new system by Taylor (2002b) is compared with traditional systems, which require a varying degree of human intervention (H. Bertram, T. Dandekar (2002) *Chemtracts* 15: 735-9). In addition different methods of acquiring information on the cellular metabolic network from genomic data is discussed (H. Bertram, T. Dandekar (2004) *it* 46(1): 5-11). Furthermore a survey of the main fields of bioinformatic research in Würzburg is given (H. Bertram, S. Balthasar, T. Dandekar (2003) *Bioforum* 1-2: 26-7). Finally it is outlined how pathogenicity and virulence of bacteria may be made accessible to bioinformatic analysis (H. Bertram, S. Balthasar, T. Dandekar (2003) *Bioforum Eur.* 3: 157-9).

In the conclusion metabolic flux analysis is used for the identification of new strategies in the battle against Plasmodia: The comparison of metabolic pathways with glutathione and thioredoxin in *Plasmodium falciparum*, *Anopheles* and man aims at raising planned dysfunctions in the metabolism of *Plasmodium* or *Anopheles* without harming the human host. Valuable suggestions for medical applications and pharmacological targets are obtained (H. Bertram, K. Xiao, R. H. Schirmer, T. Dandekar (2005) in preparation).

7 Literatur

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman (1990)** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215(3)**: 403-10.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D. J. Lipman (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25(17)**: 3389-402.
- Altschul, S. F. und E. V. Koonin (1998)** Iterated profile searches with PSI-BLAST - a tool for discovery in protein databases. *Trends in Biochemical Sciences* **23(11)**: 444-7.
- Andersson, M., A. Holmgren und G. Spyrou (1996)** NK-lysin, a disulfide-containing effector peptide of T-lymphocytes, is reduced and inactivated by human thioredoxin reductase. Implication for a protective mechanism against NK-lysin cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry* **271(17)**: 10116-20.
- Andreeva, A., D. Howorth, S. E. Brenner, T. J. Hubbard, C. Chothia und A. G. Murzin (2004)** SCOP database in 2004: refinements integrate structure and sequence family data. *Nucleic Acids Research* **32(Database issue)**: D226-9.
- Ayala, F. J., A. A. Escalante und S. M. Rich (1999)** Evolution of Plasmodium and the recent origin of the world populations of Plasmodium falciparum. *Parassitologia* **41(1-3)**: 55-68.
- Bairoch, A. (2000)** The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Research* **28(1)**: 304-5.
- Barkai, N. und S. Leibler (1997)** Robustness in simple biochemical networks. *Nature* **387(6636)**: 913-7.
- Bateman, A., E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Ewinger, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K. L. Howe, M. Marshall und E. L. Sonnhammer (2002)** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* **30(1)**: 276-80.

- Beales, P. F. und H. M. Gilles (2002a)** Rationale and technique of malaria control - Chemical methods. In: D. A. Warrell und H. M. Gilles (Herausgeber) *Essential malariology*, 4. Ausgabe. Arnold, distributed in the U.S.A. by Oxford University Press (London, New York) ISBN: 0340740647, 0340807377 Seiten 132-41.
- Beales, P. F. und H. M. Gilles (2002b)** Rationale and technique of malaria control - Mosquito control/Environmental management for mosquito control/Environmental manipulation. In: D. A. Warrell und H. M. Gilles (Herausgeber) *Essential malariology*, 4. Ausgabe. Arnold, distributed in the U.S.A. by Oxford University Press (London, New York) ISBN: 0340740647, 0340807377 Seiten 118-32.
- Becker, K., M. Schirmer, S. M. Kanzok und R. H. Schirmer (1999)** Flavins and flavoenzymes in diagnosis and therapy. *Methods in Molecular Biology* **131**: 229-45.
- Beier, J. C. und J. P. Vanderberg (1998)** Sporogonic Development in the Mosquito. In: I. W. Sherman (Herausgeber) *Malaria: parasite biology, pathogenesis, and protection*. ASM Press (Washington, DC) ISBN: 1555811310 Seiten 49-61.
- Benedict, M. Q. und A. S. Robinson (2003)** The first releases of transgenic mosquitoes: An argument for the sterile insect technique. *Trends in Parasitology* **19(8)**: 349-55.
- Bengert, P. und T. Dandekar (2003)** A software tool-box for analysis of regulatory RNA elements. *Nucleic Acids Research* **31(13)**: 3441-5.
- Berezovskyi, I. N. und E. Trifono (2001)** Protein structure and folding: a new start. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **19(3)**: 397-403.
- Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov und P. E. Bourne (2000)** The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **28(1)**: 235-42.
- Bertram, H., M. A. Keese, C. Boulin, R. H. Schirmer, R. Pepperkok und T. Dandekar (2002a)** Glutathione reductase enzyme crystals as nanosensors for redox potentials. In: Dechema (Herausgeber) *Chemical Nanotechnology Talks III - Nano for Life Sciences* (Mannheim) 9.-11.10.2002.
- Bertram, H. und T. Dandekar (2002b)** A "Periodic Table" for Protein Structure. *Chemtracts - Biochemistry and Molecular Biology* **15**: 735-9.

- Bertram, H., S. Balthasar und T. Dandekar (2003a)** Bioinformatik in Würzburg. *Bioforum* **1-2**: 26-7.
- Bertram, H., S. Balthasar und T. Dandekar (2003b)** On the Track of Pathogenicity and Bacteria. *Bioforum Europe* **3**: 157-9.
- Bertram, H. und T. Dandekar (2004)** Stoffwechselanalyse: Der Weg vom Genom zum metabolischen Netzwerk. *it - Information Technology* **46(1)**: 5-11.
- Binder, S., A. M. Levitt, J. J. Sacks und J. M. Hughes (1999)** Emerging infectious diseases: Public health issues for the 21st century. *Science* **284(5418)**: 1311-3.
- Bonchev, D. und N. Trinajstić (2001)** Overall molecular descriptors. 3. Overall Zagreb indices. *SAR and QSAR in Environmental Research* **12(1-2)**: 213-36.
- Bonilla, E. und A. Rodriguez (1993)** Determining malaria effects in rural Colombia. *Social Science & Medicine* **37(9)**: 1109-14.
- Bork, P., T. Dandekar, Y. Diaz-Lazcoz, F. Eisenhaber, M. A. Huynen und Y. P. Yuan (1998)** Predicting function: from genes to genomes and back. *Journal of Molecular Biology* **283(4)**: 707-25.
- Boutros, M. und N. Perrimon (2000)** Drosophila genome takes flight. *Nature Cell Biology* **2(4)**: E53-4.
- Breman, J. G., A. Egan und G. T. Keusch (2001)** The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **64(1-2 Suppl)**: iv-vii.
- Bulik, S. und F. Moldenhauer (2002)** C Programm mit Metropolis Algorithmus zur Minimierung der Elementarmodenanzahl [Persönliche Mitteilung als Computerprogramm in C] Berlin.
- Bumol, T. F. und A. M. Watanabe (2001)** Genetic information, genomic technologies, and the future of drug discovery. *Journal of the American Medical Association - JAMA* **285(5)**: 551-5.
- Burke, D. F. und C. M. Deane (2001)** Improved protein loop prediction from sequence alone. *Protein Engineering* **14(7)**: 473-8.

- Burke, W., D. Atkins, M. Gwinn, A. Guttmacher, J. Haddow, J. Lau, G. Palomaki, N. Press, C. S. Richards, L. Wideroff und G. L. Wiesner (2002)** Genetic test evaluation: information needs of clinicians, policy makers, and the public. *American Journal of Epidemiology* **156(4)**: 311-8.
- Cameron, D., B. Rosenblatt und E. S. Raymond (1996)** Learning GNU Emacs. O'Reilly & Associates (Sebastopol, CA) 1565921526 (ISBN) xxiv, 533 Seiten.
- Carlson, R., D. A. Fell und F. Srienc (2002)** Metabolic pathway analysis of a recombinant yeast for rational strain development. *Biotechnology & Bioengineering* **79(2)**: 121-34.
- Chatterjee, N. S., C. K. Kumar, A. Ortiz, S. A. Rubin und H. M. Said (1999)** Molecular mechanism of the intestinal biotin transport process. *American Journal of Physiology* **277(4 Pt 1)**: C605-13.
- Collins, F. H., R. K. Sakai, K. D. Vernick, S. Paskewitz, D. C. Seeley, L. H. Miller, W. E. Collins, C. C. Campbell und R. W. Gwadz (1986)** Genetic selection of a Plasmodium-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science* **234(4776)**: 607-10.
- Cornish-Bowden, A. und M. L. Cardenas (2000)** From genome to cellular phenotype - a role for metabolic flux analysis? *Nature Biotechnology* **18(3)**: 267-8.
- Coulston, F. (1985)** The dilemma of DDT. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **5(4)**: 329-31.
- Crampton, J. M. (1994)** Approaches to vector control: new and trusted. 3. Prospects for genetic manipulation of insect vectors. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **88(2)**: 141-3.
- Dandekar, T., R. Stripecke, N. K. Gray, B. Goossen, A. Constable, H. E. Johansson und M. W. Hentze (1991)** Identification of a novel iron-responsive element in murine and human erythroid delta-aminolevulinic acid synthase mRNA. *The EMBO Journal* **10(7)**: 1903-9.
- Dandekar, T. und M. W. Hentze (1995)** Finding the hairpin in the haystack: searching for RNA motifs. *Trends in Genetics* **11(2)**: 45-50.

- Dandekar, T., B. Snel, M. A. Huynen und P. Bork (1998a)** Conservation of gene order: a fingerprint of proteins that physically interact. *Trends in Biochemical Sciences* **23(9)**: 324-8.
- Dandekar, T., K. Beyer, P. Bork, M. R. Kenealy, K. Pantopoulos, M. W. Hentze, V. Sonntag-Buck, G. Flouriot, F. Gannon und S. Schreiber (1998b)** Systematic genomic screening and analysis of mRNA in untranslated regions and mRNA precursors: combining experimental and computational approaches. *Bioinformatics* **14(3)**: 271-8.
- Dandekar, T., S. Schuster, B. Snel, M. A. Huynen und P. Bork (1999)** Pathway alignment: application to the comparative analysis of glycolytic enzymes. *The Biochemical Journal* **343(Pt 1)**: 115-24.
- Dandekar, T., M. A. Huynen, J. T. Regula, B. Ueberle, C. U. Zimmermann, M. A. Andrade, T. Doerks, L. Sánchez-Pulido, B. Snel, M. Suyama, Y. P. Yuan, R. Herrmann und P. Bork (2000)** Re-annotating the *Mycoplasma pneumoniae* genome sequence: adding value, function and reading frames. *Nucleic Acids Research* **28(17)**: 3278-88.
- Dandekar, T., F. Du und H. Bertram (2001a)** Identification of cellular interactions in RNA and protein molecules. *Nonlinear Analysis - Theory, Methods & Applications* **47(1)**: 225-34.
- Dandekar, T. und P. Bengert (2001b)** RNA motifs and regulatory elements. Springer (New York) 354041701X (ISBN) 233 Seiten.
- Dandekar, T. (2001)** The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis. *Chemtracts - Biochemistry and Molecular Biology* **14(13)**: 746-50.
- Dandekar, T. und R. Sauerborn (2002)** Comparative genome analysis and pathway reconstruction. *Pharmacogenomics* **3(2)**: 245-56.
- Dandekar, T., F. Moldenhauer, S. Bulik, H. Bertram und S. Schuster (2003)** A method for classifying metabolites in topological pathway analyses based on minimization of pathway number. *Biosystems* **70(3)**: 255-70.
- Das, U. (2002)** A radical approach to cancer. *Medical Science Monitor* **8(4)**: RA79-92.

- Davioud-Charvet, E., S. Delarue, C. Biot, B. Schwöbel, C. C. Böhme, A. Müssigbrodt, L. Maes, C. Sergheraert, P. Grellier, R. H. Schirmer und K. Becker (2001)** A pro-drug form of a Plasmodium falciparum glutathione reductase inhibitor conjugated with a 4-anilinoquinoline. *Journal of Medicinal Chemistry* **44(24)**: 4268-76.
- DeGrado, W. F., C. M. Summa, V. Pavone, F. Natri und A. Lombardi (1999)** De novo design and structural characterization of proteins and metalloproteins. *Annual Review of Biochemistry* **68**: 779-819.
- Dinner, A. R., A. Sali, L. J. Smith, C. M. Dobson und M. Karplus (2000)** Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends in Biochemical Sciences* **25(7)**: 331-9.
- Eaton, W. A., V. Munoz, S. J. Hagen, G. S. Jas, L. J. Lapidus, E. R. Henry und J. Hofrichter (2000)** Fast kinetics and mechanisms in protein folding. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **29**: 327-59.
- Edwards, J. S. und B. Ø. Palsson (2000)** The Escherichia coli MG1655 in silico metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97(10)**: 5528-33.
- Elowitz, M. B. und S. Leibler (2000)** A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* **403(6767)**: 335-8.
- Etzold, T. und P. Argos (1993)** SRS - an indexing and retrieval tool for flat file data libraries. *Computer Applications in the Biosciences - CABIOS* **9(1)**: 49-57.
- Evans, D. B. (1992)** The changing healthcare environment: socioeconomic evaluation of drug therapy. *Pharmacoeconomics* **1(1)**: 5-7.
- Fleck, F. (2003)** US blocks deal on cheap drugs. *BMJ* **326(7379)**: 9.
- Follmann, H. und I. Häberlein (1995)** Thioredoxins: universal, yet specific thiol-disulfide redox cofactors. *Biofactors* **5(3)**: 147-56.
- Friedl, J. E. F. (1997)** Mastering regular expressions: powerful techniques for Perl and other tools. O'Reilly (Cambridge, Sebastopol) 1565922573 (ISBN) xxiv, 342 Seiten.

- Friedrich, M. J. (2000)** Relating genomic research to patient care. *Journal of the American Medical Association - JAMA* **284(20)**: 2581-2.
- Frishman, D., K. Albermann, J. Hani, K. Heumann, A. Metanomski, A. Zollner und H. W. Mewes (2001)** Functional and structural genomics using PEDANT. *Bioinformatics* **17(1)**: 44-57.
- Gallup, J. L. und J. D. Sachs (2001)** The economic burden of malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **64(1-2 Suppl)**: 85-96.
- Galtier, N., M. Gouy und C. Gautier (1996)** SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer Applications in the Biosciences - CABIOS* **12(6)**: 543-8.
- GCG (1998)** Wisconsin Package [Computerprogramm] Version 10.0, Genetic Computer Group (Madison, Wisconsin) www.gcg.com.
- Gesteland, R. F. und J. F. Atkins (1993)** The RNA world: the nature of modern RNA suggests a prebiotic RNA world. Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY) 0879693800 (ISBN) xxiii, 630 Seiten.
- Gilles, H. M. (2002)** Historical outline. In: D. A. Warrell und H. M. Gilles (Herausgeber) *Essential malariology*, 4. Ausgabe. Arnold, distributed in the U.S.A. by Oxford University Press (London, New York) ISBN: 0340740647, 0340807377 Seiten 1-7.
- Girvan, M. und M. E. Newman (2002)** Community structure in social and biological networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99(12)**: 7821-6.
- Goto, S., H. Bono, H. Ogata, W. Fujibuchi, T. Nishioka, K. Sato und M. Kanehisa (1997)** Organizing and computing metabolic pathway data in terms of binary relations. In: R. Altman (Herausgeber) *Pacific Symposium on Biocomputing '97* (Hawaii, USA) 6.-9.01.1997. World Scientific, ISBN: 9810230052 Seiten 175-86.
- Goto, S., Y. Okuno, M. Hattori, T. Nishioka und M. Kanehisa (2002)** LIGAND: database of chemical compounds and reactions in biological pathways. *Nucleic Acids Research* **30(1)**: 402-4.

- Grishaev, A. und M. Llinas (2002)** CLOUDS, a protocol for deriving a molecular proton density via NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99(10)**: 6707-12.
- Guttman, P. und P. Ehrlich (1891)** Über die Wirkung des Methylenblau bei Malaria. *Berliner Klinische Wochenschrift* **28(34)**: 953-6.
- Heinrich, R. und S. Schuster (1996)** *The regulation of cellular systems*. Chapman & Hall (New York) 0412032619 (ISBN) xix, 372 Seiten.
- Helms, M., P. Vastrup, P. Gerner-Smidt und K. Mølbak (2002)** Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella typhimurium*. *Emerging Infectious Diseases* **8(5)**: 490-5.
- Henikoff, S. und J. G. Henikoff (1994)** Protein family classification based on searching a database of blocks. *Genomics* **19(1)**: 97-107.
- Hillebrand, H., A. Schmidt und R. L. Krauth-Siegel (2003)** A second class of peroxidases linked to the trypanothione metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **278(9)**: 6809-15.
- Himmelreich, R., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkel, B. C. Li und R. Herrmann (1996)** Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Research* **24(22)**: 4420-49.
- Hoffman, S. L., G. M. Subramanian, F. H. Collins und J. C. Venter (2002)** Plasmodium, human and Anopheles genomics and malaria. *Nature* **415(6872)**: 702-9.
- Holmgren, A. (1989)** Thioredoxin and glutaredoxin systems. *Journal of Biological Chemistry* **264(24)**: 13963-6.
- Huynen, M. A., T. Dandekar und P. Bork (1998)** Differential genome analysis applied to the species-specific features of *Helicobacter pylori*. *FEBS Letters* **426(1)**: 1-5.
- Improvision (1999)** Openlab [Computerprogramm] Version 2.0.6, Image Processing and Vision Co Ltd (Coventry) www.improvision.com.
- Issa, A. M. (2002)** Ethical perspectives on pharmacogenomic profiling in the drug development process. *Nature reviews/Drug Discovery* **1(4)**: 300-8.

- Ito, J., A. Ghosh, L. A. Moreira, E. A. Wimmer und M. Jacobs-Lorena (2002)** Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature* **417(6887)**: 452-5.
- Jomaa, H., J. Wiesner, S. Sanderbrand, B. Altincicek, C. Weidemeyer, M. Hintz, I. Turbachova, M. Eberl, J. Zeidler, H. K. Lichtenthaler, D. Soldati und E. Beck (1999)** Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **285(5433)**: 1573-6.
- Joseph, C. (2002)** New outbreak of legionnaires' disease in the United Kingdom. *BMJ* **325(7360)**: 347-8.
- Kaessmann, H. und S. Pääbo (2002)** The genetical history of humans and the great apes. *Journal of Internal Medicine* **251(1)**: 1-18.
- Kaiser, J. und M. Enserink (2000)** Environmental toxicology. Treaty takes a POP at the dirty dozen. *Science* **290(5499)**: 2053.
- Kanehisa, M., S. Goto, S. Kawashima und A. Nakaya (2002)** The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Research* **30(1)**: 42-6.
- Kanzok, S. M., R. H. Schirmer, I. Türbachova, R. Iozef und K. Becker (2000)** The thioredoxin system of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Glutathione reduction revisited. *Journal of Biological Chemistry* **275(51)**: 40180-6.
- Kanzok, S. M., A. Fechner, H. Bauer, J. K. Ulschmid, H.-M. Müller, J. Botella-Munoz, S. Schneuwly, R. H. Schirmer und K. Becker (2001)** Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science* **291(5504)**: 643-6.
- Karplus, P. A. und G. E. Schulz (1987)** Refined structure of glutathione reductase at 1.54 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **195(3)**: 701-29.
- Kauth, C. W., C. Epp, H. Bujard und R. Lutz (2003)** The merozoite surface protein 1 complex of human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: interactions and arrangements of subunits. *Journal of Biological Chemistry* **278(25)**: 22257-64.
- Keese, M. A. (1997)** Zur Zellbiologie der Glutathionreduktase: Wirkung physiologischer NO-Carrier und Entwicklung eines Indikatorsystems für den zellulären Redox-

metabolismus [Inauguraldissertation]. Medizinische Fakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg 116 Seiten.

- Keese, M. A., R. Saffrich, T. Dandekar, K. Becker und R. H. Schirmer (1999)** Microinjected glutathione reductase crystals as indicators of the redox status in living cells. *FEBS Letters* **447(2-3)**: 135-8.
- Kernighan, B. W. und D. M. Ritchie (1990)** Programmieren in C mit dem C-Reference Manual in deutscher Sprache. Carl Hanser (München) 3446154973, 013110330X (ISBN) 279 Seiten.
- Kissinger, J. C., B. P. Brunk, J. Crabtree, M. J. Fraunholz, B. Gajria, A. J. Milgram, D. S. Pearson, J. Schug, A. Bahl, S. J. Diskin, H. Ginsburg, G. R. Grant, D. Gupta, P. Labo, L. Li, M. D. Mailman, S. K. McWeeney, P. Whetzel et al. (2002)** The Plasmodium genome database. *Nature* **419(6906)**: 490-2.
- Kohn, J. E. und K. W. Plaxco (2005)** Engineering a signal transduction mechanism for protein-based biosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102(31)**: 10841-5.
- Kondo, H., Y. Kazuta und T. Goto (2000)** Search for a microbial biotin transporter. *Biofactors* **11(1-2)**: 101-2.
- Krauth-Siegel, R. L., H. Bauer und R. H. Schirmer (2005)** Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angewandte Chemie International Edition English* **44(5)**: 690-715.
- Krohne-Ehrich, G., R. H. Schirmer und R. Untucht-Grau (1977)** Glutathione reductase from human erythrocytes. Isolation of the enzyme and sequence analysis of the redox-active peptide. *European Journal of Biochemistry* **80(1)**: 65-71.
- Kundu, S., A. Lahiri und A. R. Thakur (1998)** Denaturation of supercoiled DNA: a Monte Carlo study. *Biophysical Chemistry* **75(3)**: 177-86.
- Kyrpides, N. C. und C. A. Ouzounis (1999)** Whole-genome sequence annotation: 'Going wrong with confidence'. *Molecular Microbiology* **32(4)**: 886-7.

- Lei, J. C., J. Miao, X. Li, K. Schonig, H. Bujard und C. F. Xue (2004)** Preliminary study on regulable DNA vaccines against *Plasmodium falciparum* (Artikel in Chinesisch). *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* **20(3)**: 356-9.
- Letunic, I., L. Goodstadt, N. J. Dickens, T. Doerks, J. Schultz, R. Mott, F. Ciccarelli, R. R. Copley, C. P. Ponting und P. Bork (2002)** Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucleic Acids Research* **30(1)**: 242-4.
- Lewandoski, M. (2001)** Conditional control of gene expression in the mouse. *Nature reviews/Genetics* **2(10)**: 743-55.
- Li, M. und P. M. B. Vitányi (1997)** An introduction to Kolmogorov complexity and its applications. Springer (New York) 0387948686 (ISBN) xx, 637 Seiten.
- Liâebecq, C. und IUBMB (1992)** Biochemical nomenclature and related documents: a compendium. Portland Press (London, Chapel Hill) 1855780054 (ISBN) x, 347 Seiten.
- Liao, J. C., S. Y. Hou und Y. P. Chao (1996)** Pathway analysis, engineering and physiological considerations for redirecting central metabolism. *Biotechnology & Bioengineering* **52**: 129-40.
- Lion (2002)** Life Science Informatics & Discovery [Internet] 23.10.2002 (Zugriff), LION bioscience AG (Heidelberg) www.lionbioscience.com.
- Lowther, W. T., N. Brot, H. Weissbach, J. F. Honek und B. W. Matthews (2000)** Thiol-disulfide exchange is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97(12)**: 6463-8.
- Ludwig, A., J. Stolz und N. Sauer (2000)** Plant sucrose-H⁺ symporters mediate the transport of vitamin H. *The Plant Journal* (Oxford) **24(4)**: 503-9.
- Lundström-Ljung, J., U. Birnbach, K. Rupp, H. D. Söling und A. Holmgren (1995)** Two resident ER-proteins, CaBP1 and CaBP2, with thioredoxin domains, are substrates for thioredoxin reductase: comparison with protein disulfide isomerase. *FEBS Letters* **357(3)**: 305-8.

- Lycett, G. J. und F. C. Kafatos (2002)** Anti-malarial mosquitoes? *Nature* **417(6887)**: 387-8.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko und J. Parker (1997)** 22.7 Hospital-Acquired (Nosocomial) Infections. *Brock Biology of Microorganisms*, 8. Ausgabe. Prentice-Hall International (Upper Saddle River, N.J.) ISBN: 0135712254 Seiten 916-7.
- Mandi, G., S. Witte, P. Meissner, B. Coulibaly, U. Mansmann, J. Rengelshausen, W. Schiek, A. Jahn, M. Sanon, K. Wust, I. Walter-Sack, G. Mikus, J. Burhenne, K. D. Riedel, R. H. Schirmer, B. A. Kouyaté und O. Müller (2005)** Safety of the combination of chloroquine and methylene blue in healthy adult men with G6PD deficiency from rural Burkina Faso. *Tropical Medicine & International Health* **10(1)**: 32-8.
- Marcus, U., M. T. Dittmar und H. G. Kräusslich (2002)** HIV: Epidemiology and Strategies for Therapy and Vaccination. *Intervirology* **45(4-6)**: 260-6.
- Mavrovouniotis, M. L., G. Stephanopoulos und G. Stephanopoulos (1990)** Computer-aided synthesis of biochemical pathways. *Biotechnology & Bioengineering* **36**: 1119-32.
- Mehlhorn, H. und P. M. Armstrong (2001)** Malaria. In: H. Mehlhorn (Herausgeber) *Encyclopedic reference of parasitology*, 2. Ausgabe. Springer (Berlin, New York) ISBN: 3540662391, 3540148256 Seiten 291-302.
- Meisel, C., I. Roots, I. Cascorbi, U. Brinkmann und J. Brockmöller (2000)** How to manage individualized drug therapy: application of pharmacogenetic knowledge of drug metabolism and transport. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **38(9)**: 869-76.
- Metropolis, N., A. W. Rosenbluth, M. N. Rosenbluth, A. H. Teller und E. Teller (1953)** Equation of state calculations by fast computing machines. *The Journal of Chemical Physics* **21(6)**: 1087-92.
- Michal, G. (1999)** Biochemical pathways *Biochemie-Atlas*. Spektrum Akademischer Verlag (Heidelberg) 3860252399 (ISBN) xi, 276 Seiten.
- Missirlis, F., J. P. Phillips und H. Jackle (2001)** Cooperative action of antioxidant defense systems in *Drosophila*. *Current Biology - CB* **11(16)**: 1272-7.

- Moore, A. (2002)** From genomes to cures: the start of a long journey. *Trends in Molecular Medicine* **8(3)**: 104-5.
- Mulder, N. J., R. Apweiler, T. K. Attwood, A. Bairoch, D. Barrell, A. Bateman, D. Binns, M. Biswas, P. Bradley, P. Bork, P. Bucher, R. R. Copley, E. Courcelle, U. Das, R. Durbin, L. Falquet, W. Fleischmann, S. Griffiths-Jones et al. (2003)** The InterPro Database, 2003 brings increased coverage and new features. *Nucleic Acids Research* **31(1)**: 315-8.
- Murzin, A. G., S. E. Brenner, T. Hubbard und C. Chothia (1995)** SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of Molecular Biology* **247(4)**: 536-40.
- Oliva, B., P. A. Bates, E. Querol, F. X. Aviles und M. J. Sternberg (1997)** An automated classification of the structure of protein loops. *Journal of Molecular Biology* **266(4)**: 814-30.
- Orengo, C. A., A. D. Michie, S. Jones, D. T. Jones, M. B. Swindells und J. M. Thornton (1997)** CATH - a hierarchic classification of protein domain structures. *Structure - Form and Function in Modern Biology* **5(8)**: 1093-108.
- Overbeek, R., M. Fonstein, M. D'Souza, G. D. Pusch und N. Maltsev (1999)** Use of contiguity on the chromosome to predict functional coupling. *In Silico Biology* **1(2)**: 93-108.
- Pääbo, S. (2003)** The mosaic that is our genome. *Nature* **421(6921)**: 409-12.
- Pai, E. F. (1978)** Die Struktur der Glutathionreduktase und ihrer Substratkomplexe sowie ein daraus ableitbarer Mechanismus [Dissertation]. Naturwissenschaftliche Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg vii, 97 Seiten.
- Panchenko, A. R., Z. Luthey-Schulten, R. Cole und P. G. Wolynes (1997)** The foldon universe: a survey of structural similarity and self-recognition of independently folding units. *Journal of Molecular Biology* **272(1)**: 95-105.
- Paskewitz, S. und M. A. Riehle (1994)** Response of Plasmodium refractory and susceptible strains of *Anopheles gambiae* to inoculated Sephadex beads. *Developmental and Comparative Immunology* **18(5)**: 369-75.

- Paulsen, I. T., J. Chen, K. E. Nelson und M. H. Saier, Jr. (2001)** Comparative genomics of microbial drug efflux systems. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **3(2)**: 145-50.
- Pennisi, E. (2002)** Primate evolution. Gene activity clocks brain's fast evolution. *Science* **296(5566)**: 233-5.
- Pfeiffer, T., I. Sánchez-Valdenebro, J. C. Nuño, F. Montero und S. Schuster (1999)** METATOOL: for studying metabolic networks. *Bioinformatics* **15(3)**: 251-7.
- Pfost, D. R. (1998)** The engineering of drug discovery. *Nature Biotechnology* **16(4)**: 313.
- Platt, A. T. (2001)** MRSA in intensive care. *Nursing Standard* **15(31)**: 27-32.
- Prasad, P. D., H. Wang, W. Huang, Y. J. Fei, F. H. Leibach, L. D. Devoe und V. Ganapathy (1999)** Molecular and functional characterization of the intestinal Na⁺-dependent multivitamin transporter. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **366(1)**: 95-106.
- Prasad, P. D. und V. Ganapathy (2000)** Structure and function of mammalian sodium-dependent multivitamin transporter. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **3(4)**: 263-6.
- Quercia, V. und T. O'Reilly (1993)** X Window System user's guide: OSF/Motif 1.2 edition. O'Reilly & Associates (Sebastopol, CA) 1565920155 (ISBN) xxii, 924 Seiten.
- Ravasz, E., A. L. Somera, D. A. Mongru, Z. N. Oltvai und A. L. Barabasi (2002)** Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science* **297(5586)**: 1551-5.
- Rohlin, L., M. K. Oh und J. C. Liao (2001)** Microbial pathway engineering for industrial processes: evolution, combinatorial biosynthesis and rational design. *Current Opinion in Microbiology* **4(3)**: 330-5.
- Rohwer, J. M. und F. C. Botha (2001)** Analysis of sucrose accumulation in the sugar cane culm on the basis of in vitro kinetic data. *The Biochemical Journal* **358(Pt 2)**: 437-45.
- Rufino, S. D., L. E. Donate, L. Canard und T. L. Blundell (1996)** Analysis, clustering and prediction of the conformation of short and medium size loops connecting regular secondary structures. In: L. Hunter und T. E. Klein (Herausgeber) *Pacific Sym-*

posium on Biocomputing '96 (Hawaii, USA) 3.-6.01.1996. World Scientific, ISBN: 9810225784 Seiten 570-89.

Said, H. M. und R. Mohammadkhani (1992) Involvement of histidine residues and sulfhydryl groups in the function of the biotin transport carrier of rabbit intestinal brush-border membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **1107(2)**: 238-44.

Sauer, N. (2001) Sequenz von AtSUC5 [Persönliche Mitteilung als Email] Heidelberg, Erlangen (28.03.2001).

Schäffer, A. A., L. Aravind, T. L. Madden, S. Shavirin, J. L. Spouge, Y. I. Wolf, E. V. Koonin und S. F. Altschul (2001) Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Research* **29(14)**: 2994-3005.

Schilli, M. (1998) Go to Perl 5. Addison-Wesley (Bonn) 3827313783 (ISBN) 479 Seiten.

Schirmer, R. H., T. Schöllhammer, G. Eisenbrand und R. L. Krauth-Siegel (1987) Oxidative stress as a defense mechanism against parasitic infections. *Free Radical Research Communication* **3(1-5)**: 3-12.

Schirmer, R. H., R. L. Krauth-Siegel und G. E. Schulz (1989) Glutathione Reductase. In: D. Dolphin, O. Avramović und R. Poulson (Herausgeber) *Glutathione: chemical, biochemical, and medical aspects*, 3. Ausgabe. Wiley (New York) ISBN: 0471097845 Seiten 553-96.

Schirmer, R. H., B. Coulibaly, A. Stich, M. Scheiwein, H. Merkle, J. Eubel, K. Becker, H. Becher, O. Müller, T. Zich, W. Schiek und B. A. Kouyaté (2003) Methylene blue as an antimalarial agent. *Redox Report - Communications in Free Radical Research* **8(5)**: 272-5.

Schirmer, R. H. (2003) Moral und Verteilungsethik des medizinischen Fortschritts. In: K. Becker, E. M. Engelen und M. Vec (Herausgeber) *Ethisierung - Ethikferne. Wie viel Ethik braucht die Wissenschaft?* Akademie Verlag (Berlin) ISBN: 3050038551 Seiten 119-31.

Schmidt, S., P. Bork und T. Dandekar (2002) A versatile structural domain analysis server using profile weight matrices. *Journal Chemical Information and Computer Sciences* **42(2)**: 405-7.

- Schomburg, I., A. Chang und D. Schomburg (2002)** BRENDA, enzyme data and metabolic information. *Nucleic Acids Research* **30(1)**: 47-9.
- Schulz, G. E., H. Zappe, D. J. Worthington und M. A. Rosemeyer (1975)** Crystals of human erythrocyte glutathione reductase. *FEBS Letters* **54(1)**: 86-8.
- Schulz, G. E., R. H. Schirmer, W. Sachsenheimer und E. F. Pai (1978)** The structure of the flavoenzyme glutathione reductase. *Nature* **273(5658)**: 120-4.
- Schulz, G. E. und R. H. Schirmer (1979)** Principles of protein structure. Springer (New York) 3540903348, 0387903348 (ISBN) x, 314 Seiten.
- Schuster, S., D. A. Fell, T. Pfeiffer, T. Dandekar und P. Bork (1998)** Elementary modes analysis illustrated with human red cell metabolism. In: C. Larsson, I.-L. Pählman und L. Gustafsson (Herausgeber) *BioThermoKinetics in the post genomic era*. Chalmers (Göteborg) ISBN: 9163070480 Seiten 332-9.
- Schuster, S., T. Dandekar und D. A. Fell (1999)** Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. *Trends in Biotechnology* **17(2)**: 53-60.
- Schuster, S., T. Dandekar und D. A. Fell (2000a)** Description of the algorithm computing elementary flux modes [Internet] 24.10.2002 (Zugriff), D. A. Fell, School of Molecular and Biological Sciences - Brookes University (Oxford)
<http://bms-mudshark.brookes.ac.uk/algorithm.pdf>.
- Schuster, S., D. A. Fell und T. Dandekar (2000b)** A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. *Nature Biotechnology* **18(3)**: 326-32.
- Schuster, S., T. Pfeiffer, F. Moldenhauer, I. Koch und T. Dandekar (2002a)** Exploring the pathway structure of metabolism: decomposition into subnetworks and application to *Mycoplasma pneumoniae*. *Bioinformatics* **18(2)**: 351-61.
- Schuster, S., C. Hilgetag, J. H. Woods und D. A. Fell (2002b)** Reaction routes in biochemical reaction systems: algebraic properties, validated calculation procedure and example from nucleotide metabolism. *Journal of Mathematical Biology* **45(2)**: 153-81.

- Schuster, S. und I. Zevedei-Oancea (2002c)** Treatment of multifunctional enzymes in metabolic pathway analysis. *Biophysical Chemistry* **99(1)**: 63-75.
- Schwarz, R., P. Musch, A. von Kamp, B. Engels, R. H. Schirmer, S. Schuster und T. Dankdekar (2005)** YANA - a software tool for analyzing flux modes, gene-expression and enzyme activities. *BMC Bioinformatics* **6(1)**: 135.
- Sherman, I. W. (2002)** Malaria. In: G. Fullerlove (Herausgeber) *Encyclopedia of life sciences ELS*. Nature Publishing Group (London) ISBN: 0333726219, 1561592749 Seiten 378-82.
- Simpson, T. W., B. D. Follstad und G. Stephanopoulos (1999)** Analysis of the pathway structure of metabolic networks. *Journal of Biotechnology* **71(1-3)**: 207-23.
- Sinden, R. E. und H. M. Gilles (2002)** The malaria parasites. In: D. A. Warrell und H. M. Gilles (Herausgeber) *Essential malariology*, 4. Ausgabe. Arnold, distributed in the U.S.A. by Oxford University Press (London, New York) ISBN: 0340740647, 0340807377 Seiten 18-9.
- Skerra, A. (2000)** Engineered protein scaffolds for molecular recognition. *Journal of Molecular Recognition* **13(4)**: 167-87.
- Snel, B., P. Bork und M. A. Huynen (2002)** The identification of functional modules from the genomic association of genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99(9)**: 5890-5.
- Sommerfeld, J., M. Sanon, B. A. Kouyaté und R. Sauerborn (2002)** Informal risk-sharing arrangements (IRSAs) in rural Burkina Faso: lessons for the development of community-based insurance (CBI). *The International Journal of Health Planning and Management* **17(2)**: 147-63.
- Soute, B. A., M. M. Groenen-van Dooren, A. Holmgren, J. Lundström und C. Vermeer (1992)** Stimulation of the dithiol-dependent reductases in the vitamin K cycle by the thioredoxin system. Strong synergistic effects with protein disulphide-isomerase. *The Biochemical Journal* **281(Pt 1)**: 255-9.
- Stelling, J., S. Klamt, K. Bettenbrock, S. Schuster und E. D. Gilles (2002)** Metabolic network structure determines key aspects of functionality and regulation. *Nature* **420(6912)**: 190-3.

- Stephanopoulos, G. N., A. A. Aristidou und J. H. Nielsen (1998)** Metabolic engineering: principles and methodologies. Academic Press (San Diego) 0126662606 (ISBN) xxi, 725 Seiten.
- Stolz, J., U. Hoja, S. Meier, N. Sauer und E. Schweizer (1999)** Identification of the plasma membrane H⁺-biotin symporter of *Saccharomyces cerevisiae* by rescue of a fatty acid-auxotrophic mutant. *Journal of Biological Chemistry* **274(26)**: 18741-6.
- Stott, D. J., G. Kerr und W. F. Carman (2002)** Nosocomial transmission of influenza. *Occupational Medicine (London)* **52(5)**: 249-53.
- Tatusov, R. L., D. A. Natale, I. V. Garkavtsev, T. A. Tatusova, U. T. Shankavaram, B. S. Rao, B. Kiryutin, M. Y. Galperin, N. D. Fedorova und E. V. Koonin (2001)** The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Research* **29(1)**: 22-8.
- Tatusov, R. L. (2002)** COGs - Phylogenetic classification of proteins encoded in complete genomes [Internet] 23.10.2002 (Zugriff) www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/.
- Taylor, W. R. (1999)** Protein structural domain identification. *Protein Engineering* **12(3)**: 203-16.
- Taylor, W. R. (2001)** Defining linear segments in protein structure. *Journal of Molecular Biology* **310(5)**: 1135-50.
- Taylor, W. R. (2002a)** Index of /ftp/wtaylor [Internet] 23.09.2004 (Zugriff), National Institute for Medical Research (MRC) - Mathematical Biology (London) <http://mathbio.nimr.mrc.ac.uk/ftp/wtaylor/>.
- Taylor, W. R. (2002b)** A 'periodic table' for protein structures. *Nature* **416(6881)**: 657-60.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins und T. J. Gibson (1994)** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22(22)**: 4673-80.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin und D. G. Higgins (1997)** The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25(24)**: 4876-82.

- TIGR (2000)** *Staphylococcus aureus* Genom [Internet] 09/2000 (Zugriff), The Institute for Genomic Research [Persönliche Mitteilung] (Rockville, MD)
ftp://ftp.tigr.org/private/ufmg/s_aureus_sauser_swingseat/.
- Trigg, P. I. und A. V. Kondrachine (1998)** The Current Global Malaria Situation. In: I. W. Sherman (Herausgeber) *Malaria: parasite biology, pathogenesis, and protection*. ASM Press (Washington, DC) ISBN: 1555811310 Seiten 11-22.
- Tsumagari, K., H. Yamamoto, N. Suganuma, M. Kato, S. Ikeda, K. Imai, S. Kira und K. Taketa (2000)** Epidemiological studies of coincidental outbreaks of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection and infectious gastroenteritis in Niimi City. *Acta Medica Okayama* **54(6)**: 265-73.
- van Dien, S. J. und M. E. Lidstrom (2002)** Stoichiometric model for evaluating the metabolic capabilities of the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1, with application to reconstruction of C₃ and C₄ metabolism. *Biotechnology & Bioengineering* **78(3)**: 296-312.
- Voit, E. O. (2000)** Computational analysis of biochemical systems: a practical guide for biochemists and molecular biologists. Cambridge University Press (New York) 052178087X, 0521785790 (ISBN) xii, 531 Seiten.
- Wall, L., T. Christiansen und R. L. Schwartz (1997)** Programmieren mit Perl. O'Reilly (Cambridge) xxvi, 668 Seiten.
- Wang, Y. A., J. J. Li, H. Chen und X. Peng (2002)** Stabilization of inorganic nanocrystals by organic dendrons. *Journal of the American Chemical Society* **124(10)**: 2293-8.
- Ward, S. J. (2001)** Impact of genomics in drug discovery. *Biotechniques* **31(3)**: 626-34.
- Warrell, D. A. und H. M. Gilles (2002)** Preface. In: D. A. Warrell und H. M. Gilles (Herausgeber) *Essential malariology*, 4. Ausgabe. Arnold, distributed in the U.S.A. by Oxford University Press (London, New York) ISBN: 0340740647, 0340807377 Seiten vii-viii.
- Westheide, W., W. Dohle, R. Angermann und A. Goldschmid (2004)** *Spezielle Zoologie*. Spektrum (Heidelberg) 3827414822; 3827409004 (ISBN) xix, 919; xiv, 712 Seiten.

- WHO (1998)** 50 facts of health [Internet] 08.04.2003 (Zugriff), World Health Organization www.who.int/whr2001/2001/archives/1998/pdf/factse.pdf.
- Wiechert, W. (2001)** ^{13}C metabolic flux analysis. *Metabolic Engineering* **3(3)**: 195-206.
- Wiesner, J., D. Henschker, D. B. Hutchinson, E. Beck und H. Jomaa (2002)** In vitro and in vivo synergy of fosmidomycin, a novel antimalarial drug, with clindamycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46(9)**: 2889-94.
- Winkelmann, B. R. (2001)** Genomics and large scale phenotypic databases. *Pharmacogenomics* **2(1)**: 3-5.
- Wintjens, R. T., M. J. Rooman und S. J. Wodak (1996)** Automatic classification and analysis of alpha alpha-turn motifs in proteins. *Journal of Molecular Biology* **255(1)**: 235-53.
- WIT (2002)** WIT: What is there [Internet] 22.10.2002 (Zugriff), Argonne National Laboratory (Chicago) <http://wit.mcs.anl.gov/WIT2/>.
- Woods, J. H. (1997)** EMPATH [Internet] 24.10.2002 (Zugriff), School of Molecular and Biological Sciences - Brookes University (Oxford)
<http://bms-mudshark.brookes.ac.uk/sware.html#EMPATH>,
<ftp://mudshark.brookes.ac.uk/pub/software/ibmpc/empath/>.
- Wootton, J. C. (1994)** Non-globular domains in protein sequences: automated segmentation using complexity measures. *Computers & Chemistry* **18(3)**: 269-85.
- Zansky, S., B. Wallace, D. Schoonmaker-Bopp, P. Smith, F. Ramsey, J. Painter, A. Gupta, P. Kalluri und S. Noviello (2002)** From the Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of multi-drug resistant Salmonella Newport - United States, January - April 2002. *Journal of the American Medical Association - JAMA* **288(8)**: 951-3.
- Zhang, C. und C. DeLisi (2001)** Protein folds: molecular systematics in three dimensions. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58(1)**: 72-9.
- Ziebuhr, W., K. Xiao, B. Coulibaly, R. Schwarz und T. Dandekar (2004)** Pharmacogenomic strategies against resistance development in microbial infections. *Pharmacogenomics* **5(4)**: 361-79.

8 Anhang

Tab. 8.1: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Å	Ångström, Einheit, $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
ADP	Adenosindiphosphat
AnDOM	Annotation of Protein Domains (Annotation von Proteindomänen)
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriposphat
AtSUC5	Sucrose(Saccharose)-H ⁺ -Symporter in <i>A. thaliana</i>
BDGP	Berkeley Drosophila Genome Project (Drosophila Genomprojekt)
Bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Werkzeug zur Alignierung)
blastn	BLAST mit Eingabe/Ausgabe: Nukleotidsequenz
blastp	BLAST mit Eingabe/Ausgabe: Proteinsequenz
blastx	BLAST Eingabe: Nukleotidsequenz (6 Leseraster) A: Proteinsequenz
BLOSUM	Blocks Substitution Matrix (Substitutionsmatrix für BLOCKS)
Brenda	Braunschweiger Enzym Datenbank
CATH	Class, Architecture, Topology, Homologous Superfamily (Datenbank zur Proteinklassifikation nach Klasse, Architektur, Topologie und Homologie)
CoA	Coenzym A
Da	Dalton, Atomgewicht, $1 \text{ Da} = 1,66018 \cdot 10^{-24} \text{ g}$
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan (1,1,1-Trichlor-2,2-bis-(4-chlorphenyl)ethan)
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat (1,3-Dihydroxypropan-2-on)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	1,4-Dithiothreitol (Dithiothreit, 1,4-Dimercapto-2,3-Butandiol)
EBI	European Bioinformatics Institute (Europäisches Institut für Bioinformatik)
EC	Enzyme Commission der IUB. Nomenklatur der Enzyme
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i> Bakterien
E-Value	Expected-Value (Erwartungswert: Wahrscheinlichkeit mit der eine Sequenz zufällig auftritt)

Tab. 8.1 (Fortsetzung)

Abkürzung	Bedeutung
(F)	Vorhandene Funktion ohne zugeordnete EC Nummer
FAD	Flavinadenindinucleotid, oxidierte Form
FTP	File Transfer Protocol (Protokoll zur Dateiübertragung)
GCG	Genetic Computer Group (Softwarefirma)
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion in reduzierter Form
GSSG	Glutathiondisulfid, oxidiertes Glutathion
HMM	Hidden Markov Model (stochastisches Modell basierend auf Markow Ketten)
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HSP	High-scoring Segment Pairs
IRE	Iron Responsive Element (RNA, die auf Eisenionen reagiert)
IRP	IRE-binding Protein (Protein, das IREs bindet)
IUB	International Union of Biochemistry
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Gendatenbank)
MFS	Major Facilitator Superfamily (Proteine für erleichterte Diffusion)
mRNA	Messenger RNA (Boten RNA)
MSP	Maximal Scoring Pairs
MSP-1	Merozoite Surface Protein 1 (Oberflächenprotein des Merozoitenstadiums)
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, oxidierte Form
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduzierte Form
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (kernmagnetische Resonanz)
<i>O. cuniculus</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
PC	Personal Computer (IBM-kompatibler Computer)
PDB	Protein Data Bank (Datenbank mit Koordinaten von Proteinstrukturen)
perl	Practical Extraction and Report Language (Praktische Computersprache zur Informationsgewinnung und -verbreitung)
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
Pfam	Protein Families Database of Alignments and HMMs (Datenbank mit den häufigsten Proteindomänen und -familien)

Tab. 8.1 (Fortsetzung)

Abkürzung	Bedeutung
PFGD	Plasmodium falciparum Genome Database (Genomdatenbank zu <i>P. falciparum</i> , bei TIGR)
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
POP	Persistent Organic Pollutants (persistente organische Schadstoffe)
PSI-BLAST	Position Specific Iterative (positionsspezifisches iteratives) BLAST
PSSM	Position Specific Scoring (positionsspezifische Bewertungs-) Matrix
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
Rev	reversibel
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
<i>R. norvegicus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
ROI	Region of Interest. Hier: Durch Masken ausgewählter Bereich
rRNA	ribosomale RNA
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCOP	Structural Classification of Proteins (Proteinstrukturklassifikation)
SH-Gruppen	Thiol-Gruppen
SI	Système International d'Unités.
SLC5A6	Solute Carrier Family 5 Member 6 (Mitglied 6 der Familie 5 der Transporter gelöster Stoffe)
SMART	Simple Modular Architecture Research Tool (Werkzeug zur Erkennung von Proteindomänen)
SMVT	Sodium-dependent Multi-Vitamin Transporter (natriumabhängiger Multivitamin Transporter)
snRNA	small nuclear RNA (kleine, im Zellkern vorkommende RNA)
SRS	Sequence Retrieval System (Programm um DNA-, RNA- und Aminosäuresequenzen aus einer Datenbank abzurufen)
tblastn	BLAST Eingabe: Proteinsequenz A: Nukleotidsequenz (6 Leseraster)
tblastx	BLAST Ein/Ausgabe: Nukleotidsequenz (in 6 Leseraster übersetzt)
TIGR	The Institute for Genomic Research
VHT1	Vitamin H-Transporter 1 (Biotintransporter)

Zusätzlich zu den hier aufgeführten Abkürzungen gelten die Abkürzungen des SI-Einheitensystems, die üblichen Abkürzungen der Aminosäuren (Einbuchstabencode) und Nukleotide und die chemischen Elementsymbole.

Tab. 8.2: Enzymreaktionen des Glutathionmetabolismus

Abbreviation	Enzyme name	Reaction	Reversible
Cca	Cysteine-S-conjugate- <i>n</i> -acetyltransferase	$ACO + RSA = COA + ASA$	No
CgdI	Cys-Gly dipeptidase	$RSF = GLY + RSA$	No
CgdII	Cys-Gly dipeptidase	$GSF = GLY + CYS$	No
CytI	γ -Glutamylcyclotransferase	$GIA = OPL + IAS$	No
CytII	γ -Glutamylcyclotransferase	$RSF = RSA + GLY$	No
CytIII	γ -Glutamylcyclotransferase	$GSF = CYS + GLY$	No
CytIV	γ -Glutamylcyclotransferase	$GGC = CYS + OPL$	No
EttI	Enzyme-thiol transhydrogenase	$HXO + 2GSH = XDH + GSSG$	No
EttII	Enzyme-thiol transhydrogenase	$RIO + 2GSH = RIR + GSSG$	No
G6pd	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	$G6P + NADP = GL6P + NADPH$	No
G6pdI	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	$G6P + NAD = GL6P + NADH$	No
G6pdII	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	$GLC + NADP = GLL + NADPH$	No
Gcl	Glutamate-cysteine ligase	$GLU + CYS + ATP = GGC + ADP$	No
GcrI	Glutamyl-cystine reductase (NADPH)	$NADP + 2GGC = NADPH + GCI$	No
Gct	Glutathione-CoA transhydrogenase	$COG + GSH = COA + GSSG$	No
Gcy	Glutathione-cystine transhydrogenase	$2GSH + CYI = GSSG + 2CYS$	No
Gda	Glutathione dehydrogenase (ascorbate)	$DHA + 2GSH = ASC + GSSG$	No
Ght	Glutathione-homocystine transhydrogenase	$2GSH + HCI = GSSG + 2HCE$	No
GloI	Glutathione oxidase	$2GSH + O_2 = GSSG + H_2O_2$	No
GloII	Glutathione oxidase	$2CYS + O_2 = CYI + H_2O_2$	No
GloIII	Glutathione oxidase	$2THI + O_2 = THD + H_2O_2$	No
Gls	Glutathione synthetase	$ATP + GGC + GLY = ADP + GSH$	No
Gpol	Glutathione peroxidase	$2GSH + H_2O_2 = GSSG$	No
GpolI	Glutathione peroxidase	$2GSH + LHP = GSSG + LIP$	No
GpolII	Glutathione peroxidase	$2GSH + SHP = GSSG + STE$	No
Gr	Glutathione reductase (NADPH)	$GSSG + NADPH = 2GSH + NADP$	No
Gsa	Glutathionylspermidine amidase	$GSM = GSH + SPE$	No
Gss	Glutathionylspermidine synthase	$GSH + SPE + ATP = GSM + ADP$	No
GtfI	γ -Glutamyltransferase	$RSG = GLU + RSF$	No
GtfII	γ -Glutamyltransferase	$GSH = GLU + GSF$	No
GtfIII	γ -Glutamyltransferase	$GSH + IAS = GIA + GSF$	No
Gtr	Glutathione transferase	$RXI + GSH = HXI + RSG$	No
HypI	Hypoxanthine oxidase	$XAN + O_2 = URA + H_2O_2$	Yes
HypII	Hypoxanthine oxidase	$HYPX + O_2 = XAN + H_2O_2$	Yes
HypIII	Hypoxanthine oxidase	$PUR + O_2 = PUK + H_2O_2$	Yes
HypIV	Hypoxanthine oxidase	$PTE + O_2 = PTK + H_2O_2$	Yes
HypV	Hypoxanthine oxidase	$ALD + O_2 = SAE + O_2^-$	Yes
HypVI	Hypoxanthine oxidase	$HYPX = HYU + 2O_2^-$	Yes
HypVII	Hypoxanthine oxidase	$HYO = HYU + 2O_2^-$	Yes
HypVIII	Hypoxanthine oxidase	$PUR = PUO + 2O_2^-$	Yes
HypIX	Hypoxanthine oxidase	$PTE = PTO + 2O_2^-$	Yes
IcdI	Isocitrate dehydrogenase	$IsoCit + NADP = OG + CO_2 + NADPH$	No
IcdII	Isocitrate dehydrogenase	$IsoCit + NAD = OG + CO_2 + NADH$	No
Lio	Lipoxygenase	$LIN + O_2 = HPD$	Yes
MaaI	Membrane alanine aminopeptidase	$RSF = GLY + RSA$	No
MaaII	Membrane alanine aminopeptidase	$GSF = GLY + CYS$	No
Opr	5-Oxoprolinase (ATP-hydrolyzing)	$OPL + ATP = GLU + ADP$	No
PdrI	Protein-disulfide reductase	$2GSH + PRS = GSSG + PRT$	No
PdrII	Protein-disulfide reductase	$2GSH + IUO = GSSG + IUR$	No
PdsI	Pyrimidodiazepine synthase	$PTH + 2GSH = PDI + GSSG$	No
PgdI	6-Phosphogluconate 2-dehydrogenase	$GO6P + NADP = PDG + NADPH$	No
PgdII	6-Phosphogluconate 2-dehydrogenase	$GO6P + NAD = PDG + NADH$	No
PlhI	Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase	$LHP + 2GSH = LIP + GSSG$	No
PlhII	Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase	$HPD + 2GSH = LIN + GSSG$	No
PlhIII	Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase	$H_2O_2 + 2GSH = + GSSG$	No
Tpa	Tripeptide aminopeptidase	$GSH = GLU + GSF$	No
TtlI	Thiosulfate-thiol sulfurtransferase	$TSA + 2GSH = SUT + GSSG + SUD$	No
TtlII	Thiosulfate-thiol sulfurtransferase	$TSA + 2CYS = SUT + CYI + SUD$	No
Xdn	Xanthine dehydrogenase	$XAN + NAD = URA + NADH$	Yes

Tab. 8.3: Metabolite, die an den Reaktionen des Glutathionumsatzes beteiligt sind

Abbreviation ^a	Metabolite name	Connectivity
ACO (ext)	Acetyl-CoA	1
ADP (ext)	ADP	4
ALD (ext)	An aldehyde	1
ASA (ext)	R-S-Mercaptouronate	1
ASC B ^b (ext)	Ascorbate	1
ATP (ext)	ATP	4
CO ₂ (ext)	Carbon dioxide	2
COA (ext)	Coenzyme A	2
COG (ext)	Coenzyme A-S-glutathione	1
CYI (ext)	Cystine, two cysteines connected by disulfide bridge	3
CYS	L-Cysteine (source: proteins)	8
DHA A ^b (ext)	Dehydroascorbate	1
G6P (ext)	D-Glucose 6-phosphate	2
GCI (ext)	Bis-γ L-glutamyl L-cystine (two GGC connected by disulfide bridge)	1
GGC	γ-L-Glutamyl L-cysteine	4
GIA	Glutamate bound to an amino acid	2
GL6P (ext)	D-Glucono-1,5-lactone 6-phosphate	2
GLC (ext)	α-D-Glucose	1
GLL (ext)	D-Glucono-1,5-lactone	1
GLU (ext)	Glutamate	5
GLY	Glycine	7
GO6P (ext)	6-Phospho-D-gluconate	2
GSF (ext)	L-Cysteinyglycine	6
GSH (ext)	Reduced glutathione	25
GSM	Glutathionylspermidine	2
GSSG (ext)	Oxidized glutathione	18
H ₂ O ₂ (ext)	Hydrogen peroxide	9
HCE B (ext)	Homocysteine (methionine minus last methyl group)	1
HCI A (ext)	Homocystine, two homocysteines connected by disulfide bridge	1
HPD	(9Z,11E)-(13S)-13-Hydroperoxyoctadeca-9,11-dienoic acid	2
HXI (ext)	H: hydrogen, X: sulfate, nitril- or halogen group	1
HXO A (ext)	Hypoxanthine oxidase (EC 1.1.3.22, xanthine oxidase)	1
HYO	Hypoxanthine with OH-group (instead of xanthine as product)	2
HYPX	Hypoxanthine	2
HYU (ext)	Hypoxanthine with two OH-groups (instead of urate as product)	1
IAS	An amino acid	2
IUO A (ext)	Oxidized insulin	1
IUR B (ext)	Reduced insulin (insulin-dithiol)	1
IsoCit (ext)	Isocitrate	2
LHP A (ext)	Lipid hydroperoxide	2
LIN	Linoleic acid	2
LIP B (ext)	Lipid	2
NAD	NAD ⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide), oxidized	4
NADH	NADH reduced + H ⁺	4
NADP	NADP ⁺ , oxidized	6
NADPH	NADPH reduced + H ⁺	6
O ₂ (ext)	Oxygen	9
O ₂ ⁻ (ext)	Superoxide anion O ₂ ⁻	5
OG (ext)	2-Oxoglutarate	2
OPL	Oxoproline (proline + one ketogroup)	3
PDI B (ext)	Pyrimidodiazepine	1
PDG (ext)	6-Phospho-2-dehydro-D-gluconate	2
PRS A (ext)	Protein disulfide (oxidized)	1

Tab. 8.3 (Fortsetzung)

Abbreviation ^a	Metabolite name	Connectivity
PRT B (ext)	Protein dithiol (reduced)	1
PTE	Pterin	2
PTH A (ext)	6-Pyruvoyltetrahydropterin	1
PTK (ext)	Pterin (plus ketogroup)	1
PTO (ext)	Pterin (plus OH-group)	1
PUK (ext)	Purine (plus ketogroup)	1
PUO (ext)	Purine (plus OH-group)	1
PUR	Purine	2
RIO A (ext)	Oxidized ricine (with disulfide bridge)	1
RIR B (ext)	Reduced ricine (SH-group)	1
RSA	R-S-Alanine (which means a cysteine, S-bound to a protein)	4
RSF	R-S-Alanyl glycine	4
RSG	R-S-Glutathione, R: aliphatic, aromatic or heterocyclic	2
RXI (ext)	R: aliphatic, aromatic or heterocyclic X: sulfate, nitril- or halogen group	1
SAE (ext)	An acid	1
SHP A (ext)	Steroid hydroperoxide	1
SPE	Spermidine	2
STE B (ext)	Steroid	1
SUD (ext)	Sulfide (H ₂ S)	2
SUT (ext)	Sulfite (SO ₃ ²⁻)	2
THD (ext)	Thiol-disulfide	1
THI (ext)	Thiol	1
TSA (ext)	Thiosulfate (S ₂ O ₃ ²⁻)	2
URA	Urate	2
XAN (ext)	Xanthine	3
XDH B (ext)	Xanthine dehydrogenase (EC 1.1.1.204)	1

^a Metabolites indicated by (ext) are external in the situation with minimum numbers of elementary modes and external metabolites as found by the Metropolis algorithm. This is one out of four solutions found by exhaustive search.

^b A and B are the substrates and products of various enzyme reactions involving GSH and GSSG (see Fig. 3).

Tab. 8.4: Reaktionen im Elementarmodensystem Plasmodium

Abkürzung	Enzym	Reaktion	Rev	EC
ADA	Adenosin-Desaminase	ADO = INO	nein	3.5.4.4
ALD	Aldolase	FDP = DHAP + GA3P	ja	4.1.2.13
ApK	Adenylat-Kinase (Myokinase)	2 ADP = ATP + AMP	ja	2.7.4.3
Cab	Kalzium-Bindeprotein	CBO + 2 TRX(SH) ₂ = CBR + 2 TRXS ₂	nein	(F)
Cat	Katalase	2 H ₂ O ₂ = O ₂	nein	1.11.1.6
CgdII	Cys-Gly-Dipeptidase	GSF = GLY + CYS	nein	3.4.11.2
Dhr	Dehydroascorbatreduktion	DHA + TRX(SH) ₂ = DHB + TRXS ₂	nein	(F)
Dxr	DOXP-Reductoisomerase	DOX + NADPH = MEP + NADP	ja	1.1.1.267
Dxs	DOXP-Synthase	PYR + GA3P = DOX + CO ₂	nein	4.1.3.37
EN	Enolase	P2G = PEP	ja	4.2.1.11
G6PD	Glucose-6-phosphat-1-Dehydrogenase	G6P + NADP = GL6P + NADPH	nein	1.1.1.49
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	GA3P + NAD = D13PG + NADH	ja	1.2.1.12
Gcl	Glutamat-Cystein-Ligase	GLU + CYS + ATP = GGC + ADP	nein	6.3.2.2
GL6PDH	Gluconat-6-phosphat-Dehydrogenase	GO6P + NADP = RU5P + NADPH + CO ₂	nein	1.1.1.44
GLCim	Glucose-Import	GLCext = GLC	nein	(F)
Gls	Glutathion-Synthetase	ATP + GGC + GLY = ADP + GSH	nein	6.3.2.3
Gpol	Glutathion-Peroxidase	2 GSH + H ₂ O ₂ = GSSG + O ₂	nein	1.11.1.9
Gr	Glutathionreduktase (NADPH)	GSSG + NADPH = 2 GSH + NADP	ja	1.6.4.2
Gre	Glutathionreduktion	GSSG + TRX(SH) ₂ = 2 GSH + TRXS ₂	nein	(F)
Gtr	Glutathion-Transferase	RXI + GSH = HXI + RSG	nein	2.5.1.18
Hae	Häm als Redoxshuttle	O ₂ = O ₂ ⁻	ja	(F)
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosylt.	HYPX + PRPP = IMP	nein	2.4.2.8
HK	Hexokinase	GLC + ATP = G6P + ADP	nein	2.7.1.1
LACex	Lactat-Export	LAC = LACext	ja	(F)
LDH	Lactat-Dehydrogenase	PYR + NADH = LAC + NAD	nein	1.1.1.27
Mre	Metallreduktion	MEO + TRX(SH) ₂ = MER + TRXS ₂	ja	(F)
Nkl	NK-Lysin-Reduktion	NKO + 3 TRX(SH) ₂ = NKR + 3 TRXS ₂	nein	(F)
Nos	NO-Synthase	ARG + NADPH + O ₂ = CIR + NIO + NADP	nein	1.14.13.39
Pdo	Proteindisulfid-Isomerase	PDF + 2 TRX(SH) ₂ = PDK + 2 TRXS ₂	nein	5.3.4.1
PFK	Phosphofruktokinase	F6P + ATP = FDP + ADP	nein	2.7.1.11
PGI	Glucose-6-phosphat-Isomerase	G6P = F6P	ja	5.3.1.9
PGK	Phosphoglycerat-Kinase	D13PG + ADP = P3G + ATP	ja	2.7.2.3
PGLase	Lactonase	GL6P = GO6P	ja	3.1.1.31
PGM	Phosphoglycerat-Mutase	P3G = P2G	ja	5.4.2.1
PK	Pyruvat-Kinase	PEP + ADP = PYR + ATP	nein	2.7.1.40
Pol	DNA-Polymerase	dATP + DNA = DNB	nein	2.7.7.7
PRPPsyn	Ribosephosphat-Pyrophosphokinase	R5P + ATP = PRPP + AMP	ja	2.7.6.1
PYRex	Pyruvat-Export	PYR = PYRext	ja	(F)
R5PI	Pentose-5-phosphat-Isomerase	RU5P = R5P	ja	5.3.1.6
Sod	Superoxid-Dismutase	2 O ₂ ⁻ = O ₂ + H ₂ O ₂	nein	1.15.1.1
TA	Transaldolase	F6P + E4P = S7P + GA3P	ja	2.2.1.2
TKI	Transketolase	X5P + R5P = GA3P + S7P	ja	2.2.1.1
TKII	Transketolase	F6P + GA3P = E4P + X5P	ja	2.2.1.1
TPI	Triosephosphat-Isomerase	DHAP = GA3P	ja	5.3.1.1
Tpo	Thiol-Peroxidase	TRX(SH) ₂ + H ₂ O ₂ = TRXS ₂ + O ₂	nein	(F)
TrxRI	Thioredoxin-Reduktase	TRXS ₂ + NADPH = TRX(SH) ₂ + NADP	ja	1.6.4.5
Vdr	Vitamin K3-Reduktion	K3O + TRX(SH) ₂ = K3R + TRXS ₂	nein	(F)
Vke	Vitamin K-Epoxid-Reduktase	K3E + TRX(SH) ₂ = K3O + TRXS ₂	nein	1.1.4.1
Vko	Vitamin K-Epoxidbildung	K3R = K3E	nein	(F)
Xu5PE	Pentose-5-phosphat-Epimerase	RU5P = X5P	ja	5.1.3.1
Xen	Reduktion von Medikamenten	DRO + 2 GSH = DRR + GSSG	nein	(F)

Rev: Reversible Reaktion, (F): Vorhandene Funktion ohne zugeordnete EC Nummer

Tab. 8.5: Verwendete Abkürzungen im Elementarmodensystem Plasmodium

Abkürzung	Metaboliten	extern/intern
ADO	Adenosin	extern
ADP	ADP	intern
AMP	AMP	intern
ARG	Arginin	extern
ATP	ATP	intern
CBO	Kalzium-Bindeprotein oxidiert	extern
CBR	Kalzium-Bindeprotein reduziert	extern
CIR	Citrullin	extern
CO ₂	Kohlendioxid	extern
CYS	Cystein	intern
D13PG	1,3-Bisphosphoglycerat	intern
dATP	2'-Desoxy-ATP	extern
DHA	Dehydroascorbat	extern
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat	intern
DHB	Dehydroascorbat reduziert (Ascorbat)	extern
DNA	DNA (n)	extern
DNB	DNA (n+1)	extern
DOX	1-Deoxy-xylulose-5-phosphat	intern
DRO	Medikament oxidiert	extern
DRR	Medikament reduziert	extern
E4P	Erythrose-4-phosphat	intern
F6P	Fructose-6-phosphat	intern
FDP	Fructose-1,6-bisphosphat	intern
G6P	Glucose-6-phosphat	intern
GA3P	Glycerinaldehyd-3-phosphat	intern
GGC	Glutamylcystein	intern
GL6P	Glucono-1,5-lacton-6-phosphat	intern
GLC	Glucose	intern
GLCext	Glucose extern	extern
GLU	Glutamat	extern
GLY	Glycin	intern
GO6P	Gluconat-6-phosphat	intern
GSF	Cysteinylglycin	extern
GSH	Glutathion reduziert	intern
GSSG	Glutathion oxidiert	intern
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	intern
HXI	H: Wasserstoff, X: Sulfat, Nitril- oder Halogengruppe	extern
HYPX	Hypoxanthin	extern

Tab. 8.5 (Fortsetzung)

Abkürzung	Metaboliten	extern/intern
IMP	Inosin-5-phosphat	extern
INO	Inosin	extern
K3E	Vitamin K	intern
K3O	Vitamin K3 oxidiert	intern
K3R	Vitamin K3 reduziert	intern
LAC	Lactat	intern
LACext	Lactat extern	extern
MEO	Metall oxidiert	extern
MEP	2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphat	extern
MER	Metall reduziert	extern
NAD	NAD	intern
NADH	NADH	intern
NADP	NADP	intern
NADPH	NADPH	intern
NIO	NO	extern
NKO	NK-Lysin oxidiert	extern
NKR	NK-Lysin reduziert	extern
O ₂	molekularer Sauerstoff	extern
O ₂ ⁻	Superoxidanion	extern
P2G	2-Phosphoglycerat	intern
P3G	3-Phosphoglycerat	intern
PDF	Proteindisulfid falsch gefaltet	extern
PDK	Proteindisulfid korrekt gefaltet	extern
PEP	Phosphoenolpyruvat	intern
PRPP	5-Phospho-D-ribose-1-diphosphat	intern
PYR	Pyruvat	intern
PYRext	Pyruvat extern	extern
R5P	Ribose-5-phosphat	intern
RSG	Glutathion an Rest gebunden	extern
RU5P	Ribulose-5-phosphat	intern
RXI	Rest, an den Glutathion gebunden sein kann	extern
S7P	Sedoheptulose-7-phosphat	intern
TRXS ₂	Thioredoxin oxidiert	intern
TRX(SH) ₂	Thioredoxin reduziert	intern
X5P	Xylulose-5-phosphat	intern

Tab. 8.6: Reaktionen im Elementarmodensystem Anopheles

Abkürzung	Enzym	Reaktion	Rev	EC
ADA	Adenosin-Desaminase	ADO = INO	nein	3.5.4.4
AdPRT	Adenin-Phosphoribosyltransferase	Adenine + PRPP = AMP	nein	2.4.2.7
AK	Adenosin-Kinase	ATP + ADO = ADP + AMP	nein	2.7.1.20
ALD	Aldolase	FDP = DHAP + GA3P	ja	4.1.2.13
AMPase	5'-Nukleotidase	AMP = ADO	nein	3.1.3.5
AMPDA	AMP-Desaminase	AMP = IMP	nein	3.5.4.17
ApK	Adenylat-Kinase (Myokinase)	2 ADP = ATP + AMP	ja	2.7.4.3
Cab	Kalzium-Bindeprotein	CBO + 2 TRX(SH) ₂ = CBR + 2 TRXS ₂	nein	(F)
Cgdl	Cys-Gly-Dipeptidase	RSF = GLY + RSA	nein	3.4.11.2
CgdII	Cys-Gly-Dipeptidase	GSF = GLY + CYS	nein	3.4.11.2
CytI	γ-Glutamylzyklotransferase	GIA = OPL + IAS	nein	2.3.2.4
Dhr	Dehydroascorbatreduktion	DHA + TRX(SH) ₂ = DHB + TRXS ₂	nein	(F)
Dxs	DOXP-Synthase	PYR + GA3P = DOX + CO ₂	nein	4.1.3.37
EN	Enolase	P2G = PEP	ja	4.2.1.11
G6PD	Glucose-6-phosphat-1-Dehydrogenase	G6P + NADP = GL6P + NADPH	nein	1.1.1.49
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	GA3P + NAD = D13PG + NADH	ja	1.2.1.12
Gcl	Glutamat-Cystein-Ligase	GLU + CYS + ATP = GGC + ADP	nein	6.3.2.2
GL6PDH	Gluconat-6-phosphat-Dehydrogenase	GO6P + NADP = RU5P + NADPH + CO ₂	nein	1.1.1.44
GLCim	Glucose-Import	GLCext = GLC	nein	(F)
Gls	Glutathion-Synthetase	ATP + GGC + GLY = ADP + GSH	nein	6.3.2.3
Gpol	Glutathion-Peroxidase	2 GSH + H ₂ O ₂ = GSSG + O ₂	ja	1.11.1.9
Gre	Glutathionreduktion	GSSG + TRX(SH) ₂ = 2 GSH + TRXS ₂	nein	(F)
Gtfl	γ-Glutamyltransferase	RSG = GLU + RSF	nein	2.3.2.2
GtflI	γ-Glutamyltransferase	GSH = GLU + GSF	nein	2.3.2.2
GtflII	γ-Glutamyltransferase	GSH + IAS = GIA + GSF	nein	2.3.2.2
Gtr	Glutathion-Transferase	RXI + GSH = HXI + RSG	nein	2.5.1.18
Har	Harnsäure als Oxidationsschutz	URA + H ₂ O ₂ = XAN + O ₂	nein	(F)
HK	Hexokinase	GLC + ATP = G6P + ADP	nein	2.7.1.1
IMPase	5'-Nukleotidase	IMP = INO	nein	3.1.3.5
LACex	Lactat-Export	LAC = LACext	ja	(F)
LDH	Lactat-Dehydrogenase	PYR + NADH = LAC + NAD	nein	1.1.1.27
Mla	Melanin als Radikal Erzeuger	DOP + O ₂ = INC + O ₂ ⁻	nein	(F)
Mre	Metallreduktion	MEO + TRX(SH) ₂ = MER + TRXS ₂	ja	(F)
Nkl	NK-Lysin-Reduktion	NKO + 3 TRX(SH) ₂ = NKR + 3 TRXS ₂	nein	(F)
Nos	NO-Synthase	ARG + NADPH + O ₂ = CIR + NIO + NADP	nein	1.14.13.39
Opr	Oxoprolinase	OPL + ATP = GLU + ADP	nein	3.5.2.9
Pdo	Proteindisulfid-Isomerase	PDF + 2 TRX(SH) ₂ = PDK + 2 TRXS ₂	nein	5.3.4.1
PFK	Phosphofruktokinase	F6P + ATP = FDP + ADP	nein	2.7.1.11
PGI	Glucose-6-phosphat-Isomerase	G6P = F6P	ja	5.3.1.9
PGK	Phosphoglycerat-Kinase	D13PG + ADP = P3G + ATP	ja	2.7.2.3
PGLase	Lactonase	GL6P = GO6P	ja	3.1.1.31
PGM	Phosphoglycerat-Mutase	P3G = P2G	ja	5.4.2.1
PK	Pyruvat-Kinase	PEP + ADP = PYR + ATP	nein	2.7.1.40
Pmr	Protein-Methionin-S-oxid Reduktase	PME + TRXS ₂ = PMO + TRX(SH) ₂	ja	1.8.4.6
PNPase	Purinnukleosid-Phosphorylase	INO = HYPX + RIP	ja	2.4.2.1
PRM	Phosphoglucomutase	RIP = R5P	ja	5.4.2.2
PRPPsyn	Ribosephosphat-Pyrophosphokinase	R5P + ATP = PRPP + AMP	ja	2.7.6.1
PYRex	Pyruvat-Export	PYR = PYRext	ja	(F)
R5PI	Pentose-5-phosphat-Isomerase	RU5P = R5P	ja	5.3.1.6
Sod	Superoxid-Dismutase	2 O ₂ ⁻ = O ₂ + H ₂ O ₂	nein	1.15.1.1
TA	Transaldolase	F6P + E4P = S7P + GA3P	ja	2.2.1.2
TKI	Transketolase	X5P + R5P = GA3P + S7P	ja	2.2.1.1
TKII	Transketolase	F6P + GA3P = E4P + X5P	ja	2.2.1.1
TPI	Triosephosphat-Isomerase	DHAP = GA3P	ja	5.3.1.1
Tpo	Thiol-Peroxidase	TRX(SH) ₂ + H ₂ O ₂ = TRXS ₂ + O ₂	nein	(F)

Tab. 8.6 (Fortsetzung)

Abkürzung	Enzym	Reaktion	Rev	EC
TrxRI	Thioredoxin-Reduktase	$\text{TRXS}_2 + \text{NADPH} = \text{TRX}(\text{SH})_2 + \text{NADP}$	ja	1.6.4.5
TrxRII	Thioredoxin-Reduktase	$\text{GSSG} + \text{NADPH} = 2 \text{GSH} + \text{NADP}$	ja	1.6.4.5
Vdr	Vitamin K3-Reduktion	$\text{K3O} + \text{TRX}(\text{SH})_2 = \text{K3R} + \text{TRXS}_2$	nein	(F)
Vke	Vitamin K-Epoxid-Reduktase	$\text{K3E} + \text{TRX}(\text{SH})_2 = \text{K3O} + \text{TRXS}_2$	nein	1.1.4.1
Vko	Vitamin K-Epoxidbildung	$\text{K3R} = \text{K3E}$	nein	(F)
Xen	Reduktion von Medikamenten	$\text{DRO} + 2 \text{GSH} = \text{DRR} + \text{GSSG}$	nein	(F)
Xu5PE	Pentose-5-phosphat-Epimerase	$\text{RU5P} = \text{X5P}$	ja	5.1.3.1

Rev: Reversible Reaktion, (F): Vorhandene Funktion ohne zugeordnete EC Nummer

Tab. 8.7: Verwendete Abkürzungen im Elementarmodensystem bei Anopheles

Abkürzung	Metaboliten	extern/intern
Adenine	Adenin	extern
ADO	Adenosin	intern
ADP	ADP	intern
AMP	AMP	intern
ARG	Arginin	extern
ATP	ATP	intern
CBO	Kalzium-Bindeprotein oxidiert	extern
CBR	Kalzium-Bindeprotein reduziert	extern
CIR	Citrullin	extern
CO ₂	Kohlendioxid	extern
CYS	Cystein	extern
D13PG	1,3-Bisphosphoglycerat	intern
DHA	Dehydroascorbat	extern
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat	intern
DHB	Dehydroascorbat reduziert (Ascorbat)	extern
DOP	Dopachinon	extern
DOX	1-Deoxy-xylulose-5-phosphat	extern
DRO	Medikament oxidiert	extern
DRR	Medikament reduziert	extern
E4P	Erythrose-4-phosphat	intern
F6P	Fructose-6-phosphat	intern
FDP	Fructose-1,6-bisphosphat	intern
G6P	Glucose-6-phosphat	intern
GA3P	Glycerinaldehyd-3-phosphat	intern
GGC	Glutamylcystein	intern
GIA	Glutamat an beliebige Aminosäure gebunden	intern
GL6P	Glucono-1,5-lacton-6-phosphat	intern
GLC	Glucose	intern
GLCext	Glucose extern	extern
GLU	Glutamat	extern
GLY	Glycin	extern
GO6P	Gluconat-6-phosphat	intern
GSF	Cysteinylglycin	intern
GSH	Glutathion reduziert	intern
GSSG	Glutathion oxidiert	intern
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	intern
HXI	H: Wasserstoff, X: Sulfat, Nitril- oder Halogengruppe	extern
HYPX	Hypoxanthin	extern

Tab. 8.7 (Fortsetzung)

Abkürzung	Metaboliten	extern/intern
IAS	beliebige Aminosäure	intern
IMP	Inosin-5-phosphat	intern
INC	Indol-5,6-chinon	extern
INO	Inosin	intern
K3E	Vitamin K	intern
K3O	Vitamin K3 oxidiert	intern
K3R	Vitamin K3 reduziert	intern
LAC	Lactat	intern
LACext	Lactat extern	extern
MEO	Metall oxidiert	extern
MER	Metall reduziert	extern
NAD	NAD	intern
NADH	NADH	intern
NADP	NADP	intern
NADPH	NADPH	intern
NIO	NO	extern
NKO	NK-Lysin oxidiert	extern
NKR	NK-Lysin reduziert	extern
O ₂	molekularer Sauerstoff	extern
O ₂ ⁻	Superoxidanion	intern
OPL	Oxoprolin	intern
P2G	2-Phosphoglycerat	intern
P3G	3-Phosphoglycerat	intern
PDF	Proteindisulfid falsch gefaltet	extern
PDK	Proteindisulfid korrekt gefaltet	extern
PEP	Phosphoenolpyruvat	intern
PME	Methionin (im Protein)	extern
PMO	Methionin-S-oxid (im Protein)	extern
PRPP	5-Phospho-D-ribose-1-diphosphat	intern
PYR	Pyruvat	intern
PYRext	Pyruvat extern	extern
R5P	Ribose-5-phosphat	intern
RIP	Ribose-1-phosphat	intern
RSA	Alanin über Schwefelrest gebunden	extern
RSF	Cystein-Glycin an Rest gebunden	intern
RSG	Glutathion an Rest gebunden	intern
RU5P	Ribulose-5-phosphat	intern
RXI	Rest, der an Glutathion gebunden sein kann	extern

Tab. 8.7 (Fortsetzung)

Abkürzung	Metaboliten	extern/intern
S7P	Sedoheptulose-7-phosphat	intern
TRXS ₂	Thioredoxin oxidiert	intern
TRX(SH) ₂	Thioredoxin reduziert	intern
URA	Urat	extern
X5P	Xylulose-5-phosphat	intern
XAN	Xanthin	extern

Tab. 8.8: Reaktionen im Elementarmodensystem Mensch

Abkürzung	Enzym	Reaktion	Rev	EC
ADA	Adenosin-Desaminase	ADO = INO	nein	3.5.4.4
AdPRT	Adenin-Phosphoribosyltransferase	Adenine + PRPP = AMP	nein	2.4.2.7
AK	Adenosin-Kinase	ATP + ADO = ADP + AMP	nein	2.7.1.20
ALD	Aldolase	FDP = DHAP + GA3P	ja	4.1.2.13
AMPase	5'-Nukleotidase	AMP = ADO	nein	3.1.3.5
AMPDA	AMP-Desaminase	AMP = IMP	nein	3.5.4.17
ApK	Adenylat-Kinase (Myokinase)	2 ADP = ATP + AMP	ja	2.7.4.3
Cat	Katalase	2 H ₂ O ₂ = O ₂	nein	1.11.1.6
Cca	Cystein-S-Konjugat-N-Acyltransferase	ACO + RSA = COA + ASA	nein	2.3.1.80
Cgdl	Cys-Gly-Dipeptidase	RSF = GLY + RSA	nein	3.4.11.2
CgdII	Cys-Gly-Dipeptidase	GSF = GLY + CYS	nein	3.4.11.2
CytI	γ-Glutamylzyklotransferase	GIA = OPL + IAS	nein	2.3.2.4
DPGase	2,3-Bisphosphoglycerat-Phosphatase	D23PG = P3G	nein	3.1.3.13
DPGM	Bisphosphoglycerat-Mutase	D13PG = D23PG	ja	5.4.2.4
EN	Enolase	P2G = PEP	ja	4.2.1.11
G6PD	Glucose-6-phosphat-1-Dehydrogenase	G6P + NADP = GL6P + NADPH	nein	1.1.1.49
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	GA3P + NAD = D13PG + NADH	ja	1.2.1.12
Gcl	Glutamat-Cystein-Ligase	GLU + CYS + ATP = GGC + ADP	nein	6.3.2.2
GL6PDH	Gluconat-6-phosphat-Dehydrogenase	GO6P + NADP = RU5P + NADPH + CO ₂	nein	1.1.1.44
GLCim	Glucose-Import	GLCext = GLC	nein	(F)
Gls	Glutathion-Synthetase	ATP + GGC + GLY = ADP + GSH	nein	6.3.2.3
Gpol	Glutathion-Peroxidase	2 GSH + H ₂ O ₂ = GSSG + O ₂	ja	1.11.1.9
Gr	Glutathionreduktase (NADPH)	GSSG + NADPH = 2 GSH + NADP	ja	1.6.4.2
Gtfl	γ-Glutamyltransferase	RSG = GLU + RSF	nein	2.3.2.2
GtflI	γ-Glutamyltransferase	GSH = GLU + GSF	nein	2.3.2.2
GtflII	γ-Glutamyltransferase	GSH + IAS = GIA + GSF	nein	2.3.2.2
Gtr	Glutathion-Transferase	RXI + GSH = HXI + RSG	nein	2.5.1.18
Har	Harnsäure als Oxidationsschutz	URA + H ₂ O ₂ = XAN + O ₂	nein	(F)
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosylt.	HYPX + PRPP = IMP	nein	2.4.2.8
HK	Hexokinase	GLC + ATP = G6P + ADP	nein	2.7.1.1
HYPXLeak	Hypoxanthin Export	HYPX = HYPXext	ja	(F)
IMPase	5'-Nukleotidase	IMP = INO	nein	3.1.3.5
LACex	Lactat-Export	LAC = LACext	ja	(F)
LDH	Lactat-Dehydrogenase	PYR + NADH = LAC + NAD	nein	1.1.1.27
MemPhos	Membranphosphorylierung	ATP = ADP	nein	(F)
Nos	NO-Synthase	ARG + NADPH + O ₂ = CIR + NIO + NADP	nein	1.14.13.39
Opr	Oxoprolinase	OPL + ATP = GLU + ADP	nein	3.5.2.9
Pdo	Proteinindisulfid-Isomerase	PDF + 2 TRX(SH) ₂ = PDK + 2 TRXS ₂	nein	5.3.4.1
PFK	Phosphofruktokinase	F6P + ATP = FDP + ADP	nein	2.7.1.11
PGI	Glucose-6-phosphat-Isomerase	G6P = F6P	ja	5.3.1.9
PGK	Phosphoglycerat-Kinase	D13PG + ADP = P3G + ATP	ja	2.7.2.3
PGLase	Lactonase	PGLase : GL6P = GO6P	ja	3.1.1.31
PGM	Phosphoglycerat-Mutase	P3G = P2G	ja	5.4.2.1
PK	Pyruvat-Kinase	PEP + ADP = PYR + ATP	nein	2.7.1.40
Pmr	Proteinmethionin-S-oxid-Reduktase	PME + TRXS ₂ = PMO + TRX(SH) ₂	ja	1.8.4.6
PNPase	Purinnukleosid-Phosphorylase	INO = HYPX + RIP	ja	2.4.2.1
PRM	Phosphoglucomutase	RIP = R5P	ja	5.4.2.2
PRPPsyn	Ribosephosphat-Pyrophosphokinase	R5P + ATP = PRPP + AMP	ja	2.7.6.1
R5PI	Pentose-5-phosphat-Isomerase	RU5P = R5P	ja	5.3.1.6
Sod	Superoxid-Dismutase	2 O ₂ ⁻ = O ₂ + H ₂ O ₂	nein	1.15.1.1
TA	Transaldolase	F6P + E4P = S7P + GA3P	ja	2.2.1.2
Tdi	Thyroxin-Deiodinase	TYX + TRX(SH) ₂ = TRI + IOD + TRXS ₂	nein	3.8.1.4
TKI	Transketolase	X5P + R5P = GA3P + S7P	ja	2.2.1.1
TKII	Transketolase	F6P + GA3P = E4P + X5P	ja	2.2.1.1
TPI	Triosephosphat-Isomerase	DHAP = GA3P	ja	5.3.1.1

Tab. 8.8 (Fortsetzung)

Abkürzung	Enzym	Reaktion	Rev	EC
TrxRI	Thioredoxin-Reduktase	$\text{TRXS}_2 + \text{NADPH} = \text{TRX}(\text{SH})_2 + \text{NADP}$	ja	1.6.4.5
Xen	Reduktion von Medikamenten	$\text{DRO} + 2 \text{GSH} = \text{DRR} + \text{GSSG}$	nein	(F)
Xu5PE	Pentose-5-phosphat-Epimerase	$\text{RU5P} = \text{X5P}$	ja	5.1.3.1

Rev: Reversible Reaktion, (F): Vorhandene Funktion ohne zugeordnete EC Nummer. Die Edukte und Produkte der Reaktionen sind bei allen Tabellen zur Vereinfachung ohne die assoziierten Protonen und anorganisches Phosphat aufgelistet.

Tab. 8.9: Verwendete Abkürzungen im Elementarmodensystem Mensch

Abkürzung	Metaboliten	extern/intern
ACO	Acetyl-CoA	extern
Adenine	Adenin	extern
ADO	Adenosin	intern
ADP	ADP	intern
AMP	AMP	intern
ARG	Arginin	extern
ASA	Mercaptouronat	extern
ATP	ATP	intern
CIR	Citrullin	extern
CO ₂	Kohlendioxid	extern
COA	Coenzym A	extern
CYS	Cystein	extern
D13PG	1,3-Bisphosphoglycerat	intern
D23PG	2,3-Bisphosphoglycerat	intern
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat	intern
DRO	Medikament oxidiert	extern
DRR	Medikament reduziert	extern
E4P	Erythrose-4-phosphat	intern
F6P	Fructose-6-phosphat	intern
FDP	Fructose-1,6-bisphosphat	intern
G6P	Glucose-6-phosphat	intern
GA3P	Glycerinaldehyd-3-phosphat	intern
GGC	Glutamylcystein	intern
GIA	Glutamat an beliebige Aminosäure gebunden	intern
GL6P	Glucono-1,5-lacton-6-phosphat	intern
GLC	Glucose	intern
GLCext	Glucose extern	extern
GLU	Glutamat	extern
GLY	Glycin	extern
GO6P	Gluconat-6-phosphat	intern
GSF	Cysteinylglycin	intern
GSH	Glutathion reduziert	intern
GSSG	Glutathion oxidiert	intern
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	intern
HXI	H: Wasserstoff, X: Sulfat, Nitril- oder Halogengruppe	extern
HYPX	Hypoxanthin	intern
HYPXext	Hypoxanthin extern	extern
IAS	beliebige Aminosäure	intern

Tab. 8.9 (Fortsetzung)

Abkürzung	Metaboliten	extern/intern
IMP	Inosin-5-phosphat	intern
INO	Inosin	intern
IOD	Iod	extern
LAC	Lactat	intern
LACext	Lactat extern	extern
NAD	NAD	intern
NADH	NADH	intern
NADP	NADP	intern
NADPH	NADPH	intern
NIO	NO	extern
O ₂	molekularer Sauerstoff	extern
O ₂ ⁻	Superoxidanion	extern
OPL	Oxoprolin	intern
P2G	2-Phosphoglycerat	intern
P3G	3-Phosphoglycerat	intern
PDF	Proteindisulfid falsch gefaltet	extern
PDK	Proteindisulfid korrekt gefaltet	extern
PEP	Phosphoenolpyruvat	intern
PME	Methionin (im Protein)	extern
PMO	Methionin-S-oxid (im Protein)	extern
PRPP	5-Phospho-D-ribose-1-diphosphat	intern
PYR	Pyruvat	intern
R5P	Ribose-5-phosphat	intern
RIP	Ribose-1-phosphat	intern
RSA	Alanin über Schwefelrest gebunden	intern
RSF	Cysteinylglycin an Rest gebunden	intern
RSG	Glutathion an Rest gebunden	intern
RU5P	Ribulose-5-phosphat	intern
RXI	Rest, der an den Glutathion gebunden sein kann	extern
S7P	Sedoheptulose-7-phosphat	intern
TRI	3,5,3'-Triiodo-thyronin	extern
TRXS ₂	Thioredoxin oxidiert	intern
TRX(SH) ₂	Thioredoxin reduziert	intern
TYX	Thyroxin	extern
URA	Urat	extern
X5P	Xylulose-5-phosphat	intern
XAN	Xanthin	extern

Eigene Publikationen

Dandekar, T., F. Du und H. Bertram (2001)* Identification of cellular interactions in RNA and protein molecules. *Nonlinear Analysis - Theory, Methods & Applications* **47(1)**: 225-34.

Bertram, H. und T. Dandekar (2002) A "Periodic Table" for Protein Structure. *Chemtracts - Biochemistry and Molecular Biology* **15**: 735-9.

Bertram, H., S. Balthasar und T. Dandekar (2003) Bioinformatik in Würzburg. *Bioforum* **1-2**: 26-7.

Bertram, H., S. Balthasar und T. Dandekar (2003) On the Track of Pathogenicity and Bacteria. *Bioforum Europe* **3**: 157-9.

Dandekar, T., F. Moldenhauer, S. Bulik, H. Bertram und S. Schuster (2003)* A method for classifying metabolites in topological pathway analyses based on minimization of pathway number. *Biosystems* **70(3)**: 255-70.

Bertram, H. und T. Dandekar (2004) Stoffwechselanalyse: Der Weg vom Genom zum metabolischen Netzwerk. *it - Information Technology* **46(1)**: 5-11.

Bertram, H., K. Xiao, R. H. Schirmer und T. Dandekar (2005)* Comparative analysis of the central redox metabolism in man, anopheles and plasmodia. In Vorbereitung.

Tagungsbeitrag

Bertram, H., M. A. Keese, C. Boulin, R. H. Schirmer, R. Pepperkok und T. Dandekar (2002) Glutathione reductase enzyme crystals as nanosensors for redox potentials. In: Dechema (Herausgeber) *Chemical Nanotechnology Talks III - Nano for Life Sciences* (Mannheim) 9.-11.10.2002.

*Originalarbeiten in internationalen Zeitschriften

VIELEN DANK!!!

Besonders danken möchte ich Herrn Professor Dr. Thomas Dandekar und Herrn Professor Dr. R. Heiner Schirmer vom Sonderforschungsbereich 544 der Universität Heidelberg für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Materialien und vor allem für ihre fortwährende Unterstützung in dieser Zeit.

Intensive Gespräche, wertvolle Anregungen und hilfreiche Kommentare von Herrn Professor Dr. Thomas Dandekar haben diese Arbeit stets begleitet. Herzlichen Dank dafür.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Professor Dr. R. Heiner Schirmer für seine Tipps und Hilfestellungen besonders im experimentellen Bereich.

Frau Irene König danke ich sehr für ihre grundlegende Hilfe in Bezug auf die Herstellung der Glutathionreduktasekristalle. Dankbar bin ich auch Dr. Michael Keese für die konstruktive Zusammenarbeit und die wertvollen Tipps zur Verwendung der Glutathionreduktasekristalle als Redoxsensoren in lebenden Zellen.

Bei PD Dr. Stefan Schuster vom Max-Delbrück-Centrum Berlin möchte ich mich neben der guten Zusammenarbeit vor allem für die instruktive Diskussion metabolischer Netzwerke und die Beantwortung aller meiner Fragen zum Programm Metatool bedanken.

Dr. Christian Boulin, Simon Sheldon, Avi Epstein und Olaf Selchow danke ich für die freundliche Aufnahme in ihr Labor und Thorsten Irsch und Steffen Schmidt zusätzlich für viele wertvolle Diskussionen und Ratschläge.

Bei Peter Bengert möchte ich mich für die medizinische Sicht der Dinge und die äußerst hilfreiche Erörterung vieler Informatikfragen bedanken. PD Dr. Barbara Kappes, Kirsten Plückhahn und Christian Möskes aus der Arbeitsgruppe Parasitologie der Uni Heidelberg danke ich für die Abtretung des Büroraums und vor allem für unzählige informative Gespräche.

Der angenehmen Atmosphäre der Arbeitsgruppe in Würzburg verdanke ich viel. Hier möchte ich mich besonders bei Karin Lustre, Stefan Obermeier, Tomasz Zemojtel, Masato Dünßer und Tobias Penzkofer für die gute Zusammenarbeit und die gemeinsame Lösung so manchen Computerproblems bedanken.

Antina, Claudia, Corina, Eric, Falko, Jörg, Kerstin, Marc, Markus und Regina sei hier ganz herzlich für die schöne gemeinsame Zeit gedankt.

Vor allem aber danke ich meinen Eltern. Ohne ihre Unterstützung wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

Helge Bertram
geboren 19.12.1972 in Langenhagen

Schule

1979-1992 Schulbesuch in Rinteln
Abitur am Gymnasium Ernestinum

Zivildienst

1992-1993 Zivildienst am Kreiskrankenhaus Rinteln

Studium

1993-1999 Biologiestudium an der Universität Osnabrück, Diplomarbeit mit dem Titel „Molekularbiologische Untersuchungen zur Funktion des Kaliumtransportproteins TrkH aus Escherichia coli“

2000 Angenommen als Doktorand an der Universität Heidelberg

2001 Interdisziplinäre Ergänzungsstudien Informatik in Heidelberg

2002 Student der Universität Würzburg

2000-2002 Interdisziplinäre Ergänzungsstudien Umwelt in Heidelberg

Ich versichere, dass die vorliegende Arbeit nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt und von mir selbstständig durchgeführt und verfasst wurde.

Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Neben dem akademischen Grad „Diplom-Biologe“ habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Rinteln, 10.10.2005

