

SYSTEMORIENTIERTE BIOPROZESSTECHNIK: INTERDISZIPLINÄRE FORSCHUNG IN BIOLOGIE, SYSTEM- UND COMPUTERWISSENSCHAFTEN

Andreas Kremling, Katja Bettenbrock, Jörg Stelling, Udo Reichl, Ernst-Dieter Gilles

Die aktuelle Forschung in der molekularen Genetik und die Erfolge bei der Analyse von Genexpression und Proteinfunktion führen zu einer bisher unerreichten Fülle von Informationen über biologische Phänomene. Damit ergeben sich neben der medizinischen Anwendung auch neue Möglichkeiten und Aufgaben in der biotechnologischen Produktion von Wirkstoffen. Um dieses biologische Potenzial voll ausschöpfen zu können, bedarf es jedoch verstärkt interdisziplinärer Forschung in Biologie, System- und Computerwissenschaften. Der hier skizzierte Forschungsansatz soll langfristig zum Aufbau eines „Virtuellen Biologischen Labors“ führen, in dem Experimente am Rechner analog zu Experimenten im Labor durchgeführt werden können. Damit steht in Forschung und Lehre ein Werkzeug zur Vermittlung quantitativer und qualitativer Aspekte von zellulären Stoffwechsel- und Regulationsvorgängen zur Verfügung.

In den modernen Biowissenschaften rücken die Analyse, die gezielte gentechnische Gestaltung, sowie die medizinische und technische Nutzung zellulärer Systeme immer stärker in den Mittelpunkt des Interesses. Um molekularbiologische Erkenntnisse aber tatsächlich zur Behandlung von Krankheiten oder zur Produktion neuer Wirkstoffe umsetzen zu können, bedarf es neben der detaillierten Beschreibung biologischer Phänomene insbesondere eines ganzheitlichen Verständnisses der Funktionsweise solcher Systeme. Zur Zeit ist diese Einsicht allerdings nur ansatzweise vorhanden. Dafür lassen sich im wesentlichen zwei Gründe nennen: Ein Großteil der experimentellen Untersuchungen ist qualitativ beschreibender Natur und auf das Verständnis molekularbiologischer Details ausgerichtet; quantitative Daten sind deswegen nur unzureichend verfügbar. Dieser Engpass wird sich zwar durch Weiterentwicklung und Einsatz moderner, insbesondere paralleler Analysetechniken beseitigen lassen, aufgrund der Komplexität zellulärer Systeme wird aber auch eine weitgehende messtechnische Erfassung des Systemzustands per se nicht zu einem ganzheitlichen Verständnis funktionaler Zusammenhänge führen.

Aus dieser Problematik ergibt sich die Notwendigkeit einer neuen Betrachtungsweise dieser Systeme mit dem Ziel einer quantitativen Analyse des Verhaltens. Eine auf systemtheoretischen und signalorientierten Grundlagen basierende Betrachtungsweise, soll im folgenden Beitrag vorgestellt werden. Diese Richtung wird zur Zeit

auch im internationalen Umfeld, insbesondere den USA /1/ und Japan /2/ stark forciert, wobei allerdings die Entwicklung eines tragfähigen theoretischen Konzeptes meist vernachlässigt wird.

Ziel dieses neuen Forschungsansatzes ist es, ein verbessertes Verständnis der in einer Zelle ablaufenden Stoffwechsel- und Regulationsprozesse zu erhalten. Damit soll nicht nur der gezielte Entwurf von Experimenten erleichtert, sondern auch die Gestaltung und Einbringung neuer Stoffwechselwege ermöglicht werden. Dies spielt neben medizinischen Fragestellungen wie z. B. bei der Suche nach Angriffspunkten für Wirkstoffe vor allem in der Biotechnologie eine immer wichtiger werdende Rolle, wenn es um die Entwicklung, Produktion und Optimierung von Medikamenten geht. Aber auch in den beiden anderen Zweigen der Biotechnologie, der Umwelt- und der Pflanzenbiotechnologie ergeben sich neue Möglichkeiten durch den Einsatz von systemtheoretischen Methoden.

Wichtigstes Hilfsmittel bei der Anwendung dieser Methoden ist die mathematische Modellierung. Diese Modelle stellen eine abstrakte Abbildung der Realität dar und beschreiben Zusammenhänge zwischen Elementen mit mathematischen Gleichungen. Mit diesen Modellen ist nicht nur eine Voraussage des Verhaltens des Systems möglich, durch gezieltes Eingreifen kann das System auch in gewünschter Weise gestaltet werden. Die Entwicklung leistungsstar-

ker Modelle wird in der Bioprozesstechnik zu neuen Möglichkeiten der Prozessführung und -gestaltung führen. Dazu ist es allerdings notwendig, die i. a. detaillierten Modelle biologischer Systeme auf die, für die Aufgaben der Prozessregelung und -beobachtung wesentlichen Eigenschaften zu reduzieren, da die Verfahren der Systemtheorie im allgemeinen nur den Einsatz von vergleichsweise einfachen Modellstrukturen zulassen.

technischer Systeme in Magdeburg entwickelten Werkzeuge sollen langfristig Experimente mit zellulären Systemen in einem virtuellen Labor analog zu Experimenten in einem realen Labor ermöglichen.

MODELLIERUNGSKONZEPT

Abbildung 1 zeigt verschiedene Ebenen, auf denen eine Modellierung bioverfahrenstechnischer Prozesse erfolgen kann. Die Apparateebene betrachtet Einheiten wie z. B. Fermenter und Chromatographieapparate, die zu Gesamtanlagen verschaltet sind. In der zweiten Ebene erfolgt eine Fokussierung auf den Fermenter, in dem die biologische Stoffumwandlung stattfindet. Dieser lässt sich durch Wechselwirkungen von drei Phasen, der Flüssig-, Gas- und Biophase beschreiben. Zur Erstellung von Modellen für zelluläre Systeme ist insbesondere die Strukturierung der Biophase von Bedeutung. Diese wird durch die Betrachtung von Funktionseinheiten möglich /3/, /4/. Eine Funktionseinheit umfasst dabei eine feste Anzahl von Elementen. Betrachtet man die Speicherebene so können dies einzelne Metabolite, enzymatische Reaktionen, aber auch ganze Stoffwechselwege sein. Funktionseinheiten sind aufgrund ihrer physiologischen Funktion, ihrer genetischen Struktur oder ihrer Signalverarbeitung und Regulation gegenüber ihrer Umgebung relativ abgeschlossen und besitzen damit eine beschränkte Autonomie. Sowohl zwischen den Funktionseinheiten, als auch zwischen der Vielzahl von Komponenten, aus denen eine Funktionseinheit im allgemeinen besteht, existieren zahlreiche durch Stoff- und Informationsflüsse vermittelte, komplexe Wechselwirkungen, deren Verhalten im allgemeinen gedanklich kaum nachvollziehbar ist. Es besteht deshalb die Gefahr, dass wichtige funktionelle Zusammenhänge nicht erkannt und experimentelle Befunde falsch interpretiert werden.

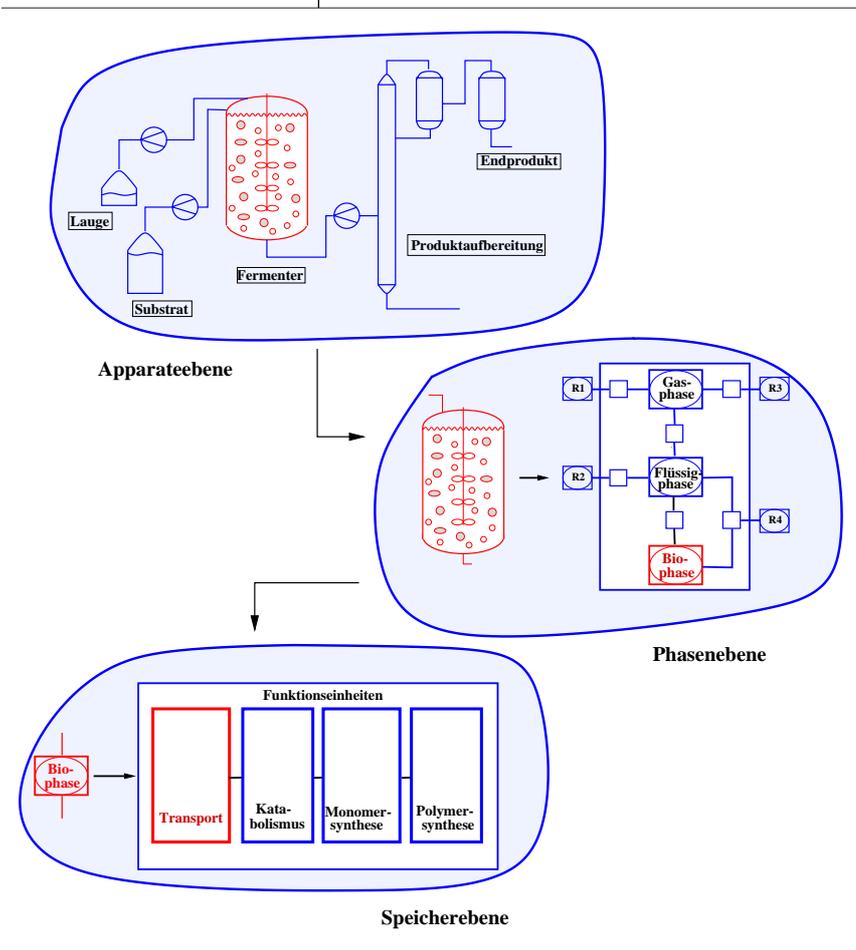


Abb. 1 Strukturierung bioverfahrenstechnischer Prozesse: Apparate-, Phasen- und Speicherebene. Funktionseinheiten sind Strukturierungselemente in der Speicherebene. Ein Anwendungsbeispiel für die Einheit „Transport“ wird im Text diskutiert.

Ausgehend von der Betrachtung eines bioverfahrenstechnischen Prozesses (Abbildung 1) an dem in das Modellierungskonzept eingeführt wird, soll in den weiteren Abschnitten anhand von zwei Anwendungsbeispielen die Vorgehensweise und Problemstellung bei der Modellierung zellulärer Systeme gezeigt werden. Das erste Beispiel beschäftigt sich dabei mit Kohlenhydrat Transportprozessen in einem Bakterium; das zweite Beispiel aus dem Lehrstuhl für Bioprozesstechnik der Universität Magdeburg untersucht die Virusreplikation in Säugerzellen, die zur Impfstoffherstellung in Bioreaktoren angezchtet werden. Eine wesentliche Unterstützung der Modellierung geschieht dabei mit Rechnerwerkzeugen, die auf diese Aufgabenstellungen zugeschnitten sind. Die Integration einzelner Werkzeuge zur Modellerstellung, -analyse und -visualisierung stellen eine Herausforderung dar, die international in mehreren Arbeitsgruppen bearbeitet wird. Die am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer

An dieser Stelle sollen Grundzüge eines neuen Modellierungskonzeptes vorgestellt werden, welches eine strukturelle Dekomposition des zellulären Reaktionsnetzwerkes erlaubt /4/, /5/. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Bio-phase in ihrem globalen Verhalten einer gemittelten Zelle entspricht. Eine zentrale Idee des Konzeptes ist es, dem Benutzer Modellbausteine zur Verfügung zu stellen, die parametrierbar und mit anderen Modellbausteinen zu höher strukturierten Modellen – den Funktionseinheiten – verschaltet werden. Die Modellbausteine besitzen strukturelle Eigenschaften wie Anzahl und Typus von Ein- und Ausgangsgrößen sowie verhaltensbeschreibende Eigenschaften, welche die mathematische Beschreibung der Bausteine repräsentieren. Biologisch motivierte Kriterien zur Abgrenzung der Funktionseinheiten werden unten vorgestellt. Die Kriterien erlauben eine direkte Zuordnung dieser formalen Einheiten zu biologischen Stoffwechseleinheiten und erhöhen so die Transparenz des Modellierungsvorganges.

Der ganzheitliche Aspekt des Modellierungskonzeptes beruht auf der Beobachtung aus der Biologie, dass sich der gesamte Stoffwechsel durch eine begrenzte Anzahl solcher Einheiten darstellen lässt. Zelluläre Systeme sind in der Lage, sich sehr schnell auf ändernde Umweltbedingungen einzustellen. Dies liegt zum einen an der Möglichkeit der Informationsverarbeitung, um einen äußeren Reiz – etwa in Form einer drastischen Veränderung der Substratkonzentration – in ein zelluläres Signal umzuwandeln. Dieses Signal wird weitergeleitet und verarbeitet, um eine zelluläre Antwort hervorzurufen. Die Prozesse der Signaltransduktion beruhen hauptsächlich auf Wechselwirkungen von Proteinen. Des Weiteren besitzt die Zelle eine hohe Anzahl von Steuer- und Regelkreisen, die es erlauben, gewünschte Stoffwechselwege zu- oder abzuschalten und damit in optimaler Weise auf eine neue Situation zu reagieren. Dies äußert sich beispielsweise in der Änderung der Syntheserate oder Aktivität der entsprechenden Stoffwechselenzyme.

Die Komplexität des Stoffwechsels, seine Regulation und die Informationsverarbeitung in Organismen legt es nahe, das gesamte Reaktionsnetzwerk zunächst in zwei Teilnetzwerke aufzuteilen (Abbildung 2). Das Stoffwechselnetzwerk umfasst den Stofffluss ausgehend von den Substraten bis zu den zellulären Strukturen und den Produkten; das Regulationsnetzwerk beschreibt die Prozesse der Replikation, Transkription und Translation. Die Regulation der Enzymaktivität z. B. über Inhibitoren und Aktivatoren oder über kovalente Enzymmodifikation sowie die Prozesse der Signaltransduktion und Signalverarbeitung sind ebenfalls Gegenstand des Regulationsnetzwerks.

Das Stoffwechselnetzwerk kann gemäß Abbildung 3 am Beispiel des Kohlenhydratstoffwechsels in weitere Funktionseinheiten gegliedert werden (Transportreaktionen, Katabolismus, Monomer- und Polymersynthesereaktionen). Darüber hinaus sind neben den *lokalen* Metaboliten auch *globale* Metabolite wie z. B. ATP, NADH, NADPH an den Stoffwechselvorgängen beteiligt. Diese Metabolite beeinflussen eine Vielzahl von Stoffwechselreaktionen und nehmen daher eine Sonderstellung ein. Die Transporteinheit umfasst neben der Aufnahme auch den spezifischen Abbau von Kohlenhydraten bis zu den zentralen Abbaupfaden (z. B. Glycolyse, Zitronensäurezyklus).

Definition von Modellbausteinen

Charakteristisch für Funktionseinheiten ist eine gewisse Abgeschlossenheit gegenüber der zellulären Umgebung. Diese Abgeschlossenheit ergibt sich dadurch, dass

- alle Komponenten einer Untereinheit an eine gemeinsame Funktion (Energiegewinnung, Monomersynthese, Stoffwechselwege zu Sekundärmetaboliten) angepasst sind,
- die für die Funktion einer Untereinheit zustän-

digene Gene in einem oder mehreren Operonen zusammengefasst sind und koordiniert abgelesen werden

- alle Elemente der Funktionseinheit über ein gemeinsames Signaltransduktionssystem gesteuert werden.

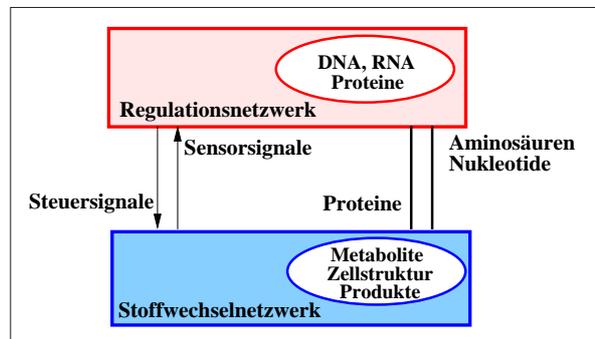


Abb. 2

Schematische Darstellung des Stoffwechsel- und Regulationsnetzwerks eines Bakteriums.

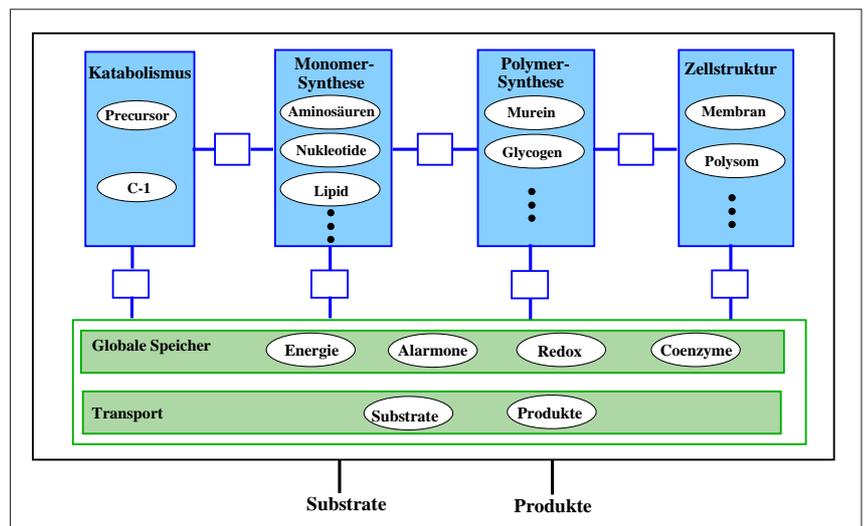


Abb. 3

Strukturmodell des Stoffwechselnetzwerks für den Kohlenhydratstoffwechsel. Die Zuckermoleküle werden in kleinere Moleküle abgebaut, die als Vorstufen zur Synthese von Aminosäuren, Nukleotiden und Lipiden dienen. Diese sind wiederum Ausgangsstoffe zur Bildung der Makromoleküle in der Zelle und bilden Strukturelemente wie die Zellmembran aus.

Dies soll an einem Beispiel erläutert werden. Beim Wachstum des Bakteriums *Escherichia coli* auf der Kohlenstoffquelle Laktose werden einige Reaktionsschritte durchlaufen, bis zentrale Abbaupfade, also Abbaupfade für alle Zucker, erreicht werden. Nach dem ersten Kriterium bilden diese Reaktionsschritte eine physiologische Einheit, da sie Aufnahme und Stoffwechsel sehr spezifisch beschreiben. Eine Betrachtung der für diese Schritte relevanten Gene zeigt aber, dass eine weitere Aufteilung möglich ist. Die Gene für Aufnahme- (Permease) und ersten Reaktionsschritt (β -Galaktosidase) liegen auf der DNA hin-

tereinander im *lacZYA* Operon kodiert. Das heißt, dass die Gene immer zusammen abgelesen werden, wobei für das dritte Protein LacA noch keine physiologisch relevante Funktion bekannt ist.

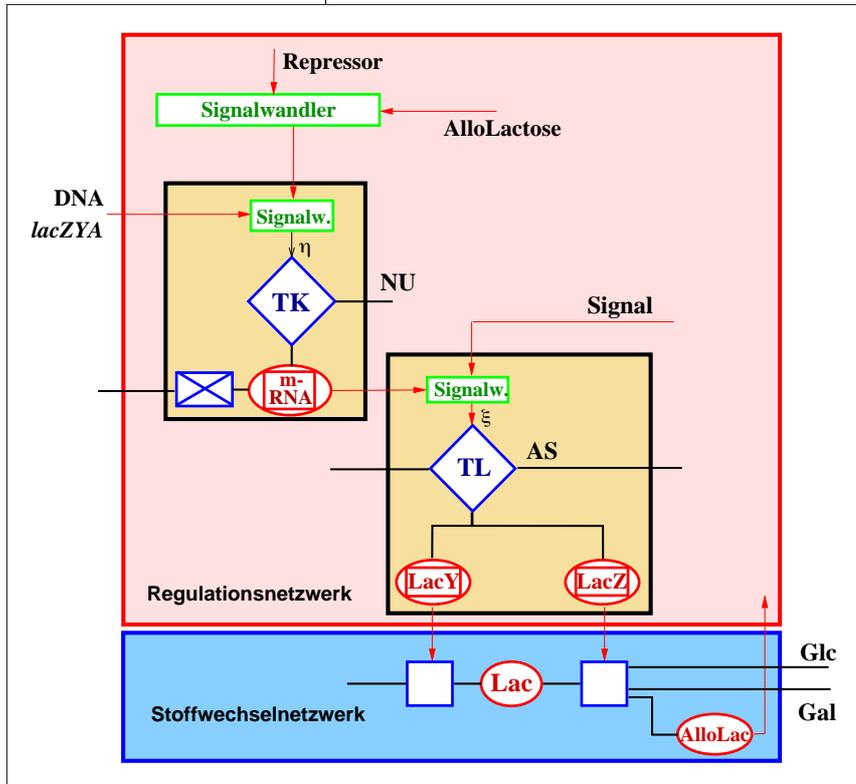


Abb. 4 Regulations- und Stoffwechselnetzwerk am Beispiel der Funktionseinheit „Laktosestoffwechsel“. Gezeigt sind elementare Bausteine (grüne Symbole sind Signalwandler, blaue Symbole sind Stoffwandler, rote Symbole sind Aggregation zu höher strukturierten Funktionseinheiten (schwarz umrandet, gelb unterlegt). Die Prozesse der Transkription (TK) und Translation (TL) sind im Regulationsnetzwerk beschrieben.

Das gesamte biochemische Netzwerk der Funktionseinheit „Laktosestoffwechsel“ ist in Abbildung 4 gezeigt. Dargestellt sind die elementaren Modellbausteine. Sie repräsentieren die höchste Auflösung des Modells. Rote Symbole bezeichnen dabei einzelne Metabolite und blaue Symbole die reaktiven Stoffumwandlungsprozesse zwischen den Metaboliten. Grüne Symbole beschreiben die Prozesse der Signaltransduktion. Wie in der Abbildung zu sehen ist, liegt eine starke Vernetzung der Information vor. Das im Stoffwechselnetzwerk aus der Umsetzung von Laktose in Glukose und Galaktose entstehende Beiprodukt Allolaktose wirkt im Regulationsnetzwerk als Aktivator und beeinflusst die Transkription. Durch die Aktivierung kommt es zur Synthese von mRNA und zur Bildung der Stoffwechsellzyme LacY und LacZ, die ihrerseits den Stofffluss durch den Pfad erhöhen. Dieser „positiven“ Rückkopplung ist eine im Bild nicht gezeigte negative Rückkopplung überlagert. Sie sorgt dafür, dass sich nach Beginn der Genexpression ein stationärer Wert einstellt.

Zur Erstellung eines Modells ist den Einheiten noch eine mathematische Beschreibung zuzuordnen. Die Bilanzgleichungen für die Metabolite ergeben sich aus der strukturellen Vernetzung des Reaktionsnetzwerks. Für die kinetischen Reaktionsausdrücke der einzelnen enzymatischen Schritte sind aus der Literatur viele Ansätze bekannt, die hier Verwendung finden können

und in einer Modellbibliothek zusammenzufassen sind (z. B. Michaelis-Menten Kinetik, Modelle allosterischer Wechselwirkungen). Liegen ausreichende Kenntnisse über einzelne Schritte vor, kann ein detailliertes Modell erstellt werden und z. B. zur Analyse des Systemverhaltens genutzt werden. In vielen Fällen liegen für einzelne enzymatische Schritte jedoch zu wenig quantitative Daten vor, die eine detaillierte Modellierung erlauben. Es ist daher sinnvoll diese Einheiten nicht immer einzeln und im Detail zu modellieren, sondern sie teilweise zu aggregieren. Das bedeutet, dass mehrere Reaktionsschritte zu einem einzigen Schritt zusammengefasst werden. Dadurch reduziert sich die Anzahl der Zustände und Parameter. Das Zusammenfassen der Schritte muss jedoch so erfolgen, dass die oben genannten Kriterien für die Abgrenzung der Modellbausteine Beachtung finden.

Die Vorteile des vorgestellten Modellierungskonzepts liegen zum einen in der Möglichkeit detaillierte Modelle zu erstellen, die ein besseres Verständnis der komplexen Wechselwirkungen von zellulären Systemen erlauben. Dies wird beispielsweise dadurch erreicht, dass Mutationen in einen Stoffwechselweg eingebracht und ihre Auswirkungen in Simulationsrechnungen analysiert werden können. Zum anderen lassen sich aber auch Modelle mit begrenzter Komplexität erstellen, die zur Prozessführung herangezogen werden können. Diese ergeben sich aus einer Reduktion eines komplexen Modells indem die Funktionseinheiten mit einer geringen Anzahl von Gleichungen beschrieben werden.

ANWENDUNGSBEISPIELE

Kohlenhydrat Aufnahme in E. coli

Der oben beschriebene Baustein der Laktoseaufnahme ist Teil eines detaillierten Modells zur Beschreibung der ‚Kataboliten Repression‘ in *E. coli* [6], [7]. ‚Kataboliten Repression‘ meint die Fähigkeit des Zuckers Glukose, die Aufnahme einer ganzen Reihe von anderen Kohlenhydraten zu blockieren. In der Zelle wird diese Blockade durch eine Vielzahl von biochemischen Reaktionen, die ein komplexes Signaltransduktionssystem bilden, realisiert. Beteiligt sind die Aufnahmesysteme der Zucker, die als Sensoren fungieren sowie Regulatorproteine am Ende der Kette, die direkt mit den entsprechenden Bindestellen auf der DNA interagieren und das Ablesen der entsprechenden Information hemmen oder aktivieren. Zur Beschreibung der Zuckeraufnahme und des Stoffwechsels wurde ein mathematisches Modell mit 23 Differentialgleichungen und 9 algebraischen Gleichungen aufgestellt. Das Modell beinhaltet eine große Anzahl von Parametern, die zum großen Teil aus der Literatur zusammengestellt sind.

Um das Modell zu validieren, d. h. zu überprüfen, ob es die Realität richtig beschreibt, sind am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg, eine ganze

Reihe von Experimenten durchgeführt worden. Diese Experimente wurden so geplant, dass das System von unterschiedlichen Blickwinkeln aus betrachtet wird. Dazu gibt es mehrere Möglichkeiten:

- Variation der Kohlenstoffquelle: Bei den Experimenten wurden die Zucker Glukose, Laktose und Galaktose in unterschiedlicher Menge ins Medium gegeben.
- Veränderung der Anfangsbedingungen intrazellulärer Metabolite: Durch Variation der Vorkultur, z. B. Verwendung von Laktose statt Glukose, kann das Expressionsniveau der Enzyme im Stoffwechselweg für Laktose verändert werden.
- Experimente mit isogenen Mutantenstämmen: Diese Stämme besitzen gezielte Mutationen in den relevanten Signalketten und blockieren die Weiterleitung der Signale. Durch Experimente mit diesen Mutanten kann festgestellt werden, wie groß der Einfluss der fehlenden Proteine auf das Wachstumsverhalten des Organismus ist.

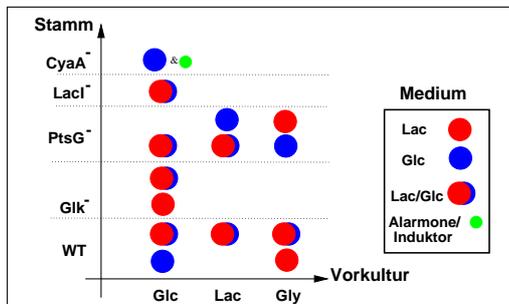


Abb. 5
Übersicht über verschiedene Experimente zur Katabolitenpression. Auf der y-Achse sind die Stammvarianten gezeigt, auf der x-Achse die verschiedenen Vorkulturen. Das Medium ist durch farbige Kreise kodiert. Rote Kreise stehen für Laktose, blaue für Glukose. Ein grüner Punkt zeigt die Zugabe eines Signalstoffes an.

Abbildung 5 gibt einen Überblick über alle durchgeführten Experimente. Die Farbkreise repräsentieren dabei die Zusammensetzung des Mediums. Auf der Y-Achse sind die entsprechenden Stammvarianten aufgetragen, auf der X-Achse die Variation der Vorkultur. Aufgrund der sehr unterschiedlichen experimentellen Vorgehensweise kann in der Regel nicht erwartet werden, dass die in der Literatur gefundenen Parameter das Verhalten quantitativ richtig wiedergeben. Aus der Systemtheorie sind allerdings Verfahren bekannt, die es erlauben, die Messinformation zu analysieren und Parameter daraus abzuschätzen. Die Ergebnisse dieser Parameteridentifikation sind in der Abbildung 6 für ein Experiment gezeigt. Als Messgrößen aus der Flüssigphase stehen Zeitreihen für die Konzentration an Biomasse, Glukose, Laktose, Galaktose, cAMP und Acetat zur Verfügung. Als intrazelluläre Messgrößen ist der Verlauf des Enzyms LacZ gezeigt.

Wie zu sehen ist, ergibt sich eine gute Übereinstimmung zwischen den Messungen und den Simulationen. In der ersten Wachstumsphase wird nur Glukose aufgenommen während Laktose nicht aufgenommen wird, da die entsprechenden Gene nicht abgelesen werden können (LacZ hat nur Basalniveau). Es wird auch kaum cAMP ins Medium abgegeben. Aller-

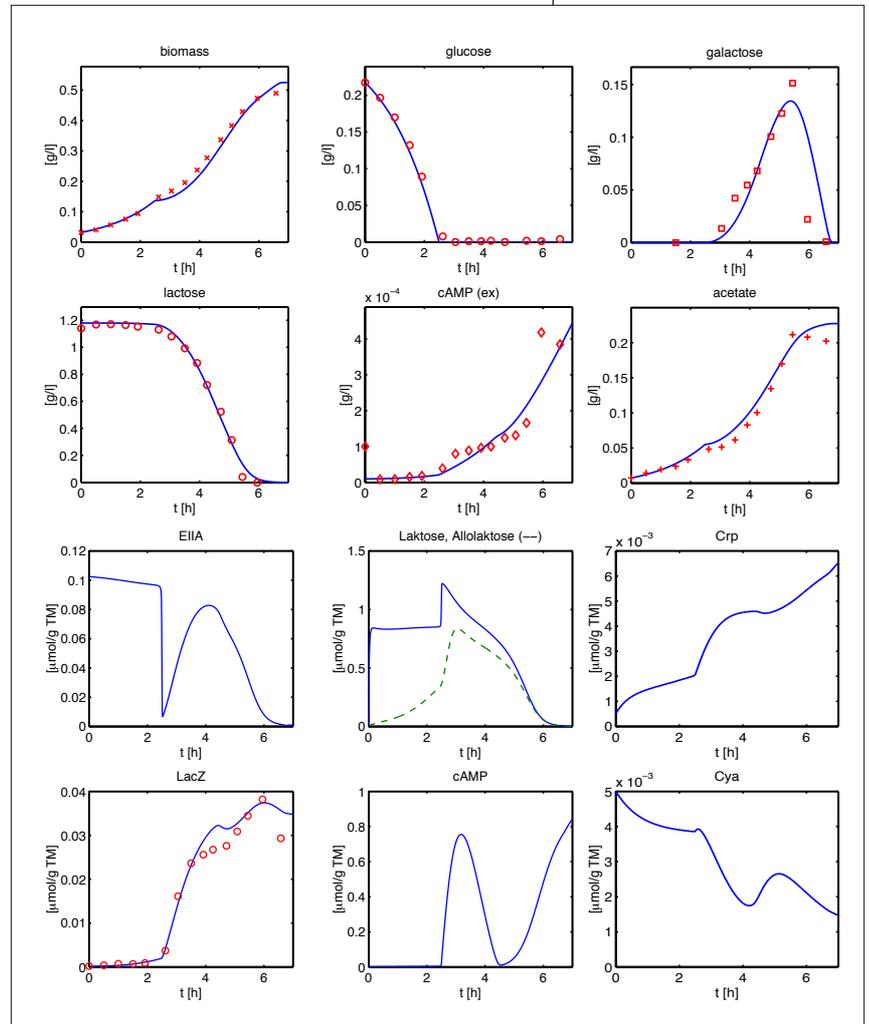


Abb. 6
Vergleich zwischen Simulationsrechnung und Experiment. Gezeigt werden experimentelle Daten und Simulationsrechnungen der Konzentrationen von Biomasse, Glukose, Laktose, Galaktose, Acetat, cAMP (ex) und LacZ. Für weitere wichtige Größen wie intrazelluläres cAMP, EIIA und Allolaktose sind die Simulationsvorhersagen gezeigt. Erklärungen zu den Kurvenverläufen finden sich im Text.

dings reichert sich Acetat dort an, was darauf schließen lässt, dass die aufgenommene Glukose nicht optimal genutzt werden kann. In dieser Phase ist das Protein EIIA in der unphosphorylierten Form. EIIA ist ein Protein, welches beim Transport von Glukose in die Zelle beteiligt ist und dessen Phosphorylierungsstatus Aufschluss über die Aktivität der Signalübertragungskette liefert. In der zweiten Phase, nach Verbrauch der Glukose, wird der Stoffwechsel auf Laktose umgestellt. Die entsprechenden Enzyme werden produziert und cAMP wird im Medium angereichert. Bei EIIA ist folgende Dynamik zu beobachten. Nach Verbrauch von Glukose findet dann zunächst ein rascher Wechsel von der unphosphorylierten Form in die phosphorylierte Form statt, dann ein langsamer Rückgang in die ursprüngliche Form, bevor am Ende das Protein vollständig phosphoryliert ist.

Neben der Identifikation von Parametern lassen sich aber auch grundlegendere Fragen mit systemtheoretischen Methoden beantworten. Ist man am zeitlichen Verlauf von intrazellulären Metaboliten interessiert und steht nur eine geringe Anzahl von Messgrößen zur Verfügung, so kann basierend auf einem Modell und dem Entwurf eines Beobachters zumindest ein Teil der fehlenden Messinformation rekonstruiert werden. Mit Hilfe des Beobachters kann also festgestellt werden, für welche Messgrößen sich die Entwicklung oder Anschaffung der Analytik besonders lohnt.

Beobachter: Mit einem Beobachter lassen sich durch Bereitstellung von Messgrößen und einem mathematischen Modell Zustandsgrößen eines Systems, die messtechnisch nicht oder nur schwer zugänglich sind, rekonstruieren.

Funktionseinheit: Teil eines komplexen biochemischen Reaktionsnetzwerkes, der sich durch eine beschränkte Autonomie auszeichnet.

Kataboliten Repression: Beobachtung, dass während des Zellwachstums in der Anwesenheit von Glukose im Medium, die Aufnahme von anderen Kohlenhydraten gehemmt wird.

Modellbausteine: Teilmodell, welches durch strukturelle Eigenschaften (Anzahl und Typ der Ein- und Ausgänge) und durch verhaltensbeschreibende Eigenschaften (mathematische Beschreibung) gekennzeichnet ist.

Modellierungswerkzeug (Rechnerwerkzeug): Software zur Unterstützung des Modellierungsvorganges und der Modellanalyse.

Identifikation: Schätzung unbekannter Parameter aus Zeitverläufen von Messgrößen.

Neben dem oben beschriebenen Projekt, das gemeinsam mit Prof. Lengeler, Arbeitsgruppe Genetik des Fachbereichs Biologie der Universität Osnabrück bearbeitet wird, gibt es weitere Projekte mit ähnlichen Fragestellungen in Zusammenarbeit mit den Universitäten Halle und Stuttgart. Beispielsweise wird in Kooperation mit Frau Prof. Breunig am Institut für Genetik in Halle die Aufnahme von Kohlenhydraten bei der Hefe untersucht. Beide Modellstrukturen sollen miteinander verglichen werden, um möglichst allgemeine Prinzipien der Stoffwechselregulation zu ermitteln.

Virusreplikation

In der Biotechnologie werden seit Jahren tierische Zellkulturen zur Produktion von Antikörpern, rekombinanten Proteinen und Vakzinen eingesetzt. Auf Grund der enormen wirtschaftlichen Bedeutung von Infektionskrankheiten sowie der problematischen Kontrolle lange bekannter Infektionsrisiken, z. B. Tuberkulose, Influenza, Aids oder Hepatitis C, steht die Entwicklung und Verbesserung von Impfstoffen nach wie vor im Fokus der aktuellen Forschung.

Ziel der Arbeiten am Lehrstuhl Bioprozesstechnik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg ist die Entwicklung und Optimierung von integrierten Prozessführungskonzepten zur Steigerung von Virusausbeute und Reinheit sowie der Wirksamkeit und Sicherheit von Impfstoffen /8/. Am Beispiel der Produktion des Influenzavirus werden unter anderem folgende Prozessschritte detailliert untersucht:

- Anzucht und Scale-up von Säugerzellen (MDCK) auf Mikrocarriern

- Replikation des Influenzavirus in MDCK-Zellen
- chromatographische Prozesse zur Aufreinigung des Virusantigens

In der chemischen Verfahrenstechnik ist der Einsatz mathematischer Modelle zur Beschreibung von Reaktionsabläufen und zur Optimierung von Prozessen weit verbreitet. Für biologische Prozesse dagegen sind die zugrundeliegenden Mechanismen häufig nicht ausreichend genau bekannt und eine detaillierte Beschreibung aller relevanten zellulären Reaktionen und Vorgänge ist dadurch

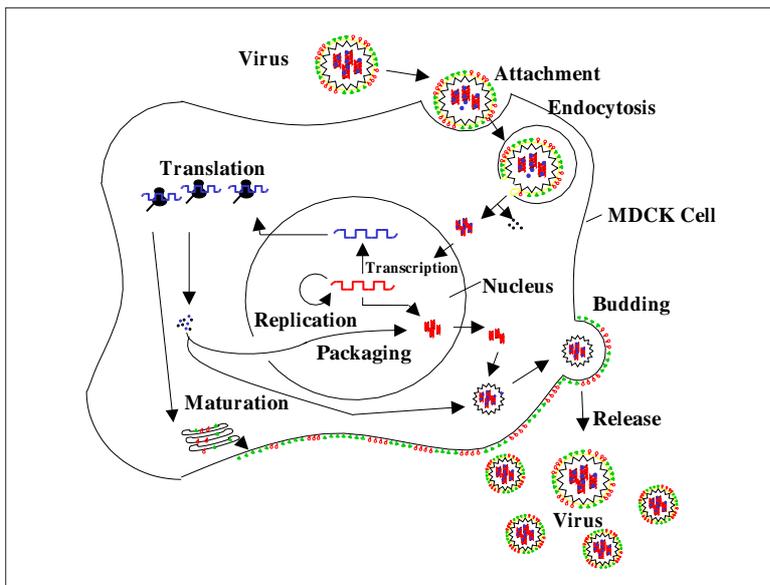


Abb. 7 Schematische Darstellung der Replikation von Influenzaviren in Säugerzellen. Wichtige Schritte sind: Anheftung des Virus an die Zellmembran, Endozytose, Transport des Virusgenoms in den Zellkern, Transkription der Virus-RNA und Translation der Virusproteine, Vermehrung der viralen RNA und Freisetzung der neu gebildeten Viren.

kaum möglich. In der Praxis muss man sich deshalb meist mit sehr stark vereinfachten Modellen begnügen, die den Verlauf weniger und zudem leicht messbarer Größen wiedergeben. Während für das Wachstum und die Antikörperbildung in Hybridomazellen bereits mehrere Modellierungsansätze existieren, war die Impfstoffherstellung bisher seltener Gegenstand detaillierter Modelle. Ein Schwerpunkt der Arbeiten ist deshalb zunächst die Erstellung eines möglichst einfachen mathematischen Modells, welches das Wachstum adhärenter Zellen, die Virusreplikation und alle wesentlichen Stoffwechsel- und Regulationsvorgänge beschreibt (Abbildung 7). Auch hierbei kommt das oben beschriebene Modellierungskonzept zur Anwendung. Auf der Grundlage dieses Modells, ergänzender Untersuchungen zu Zellmetabolismus und Virusreplikation in Bioreaktoren und Einzelzellkulturen sowie der Messung von in der industriellen Praxis bestimmbar on-line und off-line Messgrößen (z. B. Glukose, Ammonium, Lactat, Aminosäuren, Virustiter), soll so die Möglichkeit geschaffen werden, Konzepte zur Prozessüberwachung und -führung

zu entwickeln, um Ausbeuten zu erhöhen, Ausbeuteschwankungen zu analysieren und die Validierung dieser Prozesse zu unterstützen.

DAS VIRTUELLE BIOLOGISCHE LABOR

Durch interdisziplinäre Kooperationen sollen die vorstehend an Beispielen erläuterten Entwicklungen in ein in Forschung und Lehre einsetzbares Virtuelles Biologisches Labor münden (Abbildung 8). Ziel eines solchen Virtuellen Biologischen Labors ist die computergestützte Modellierung und Simulation von zellulären Systemen, mit deren Hilfe man in ähnlicher Weise wie im realen biologischen Labor experimentieren kann.

Im Zentrum des Virtuellen Biologischen Labors stehen mathematische Modelle zellulärer Funktionseinheiten, die mit Hilfe des Modellierungskonzepts erstellt wurden. Die einfache Erstellung dieser Modelle erfolgt mit Hilfe des graphischen Modellierungswerkzeuges PROMOT, welches am Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik der Universität Stuttgart und am MPI Magdeburg entwickelt wird [9], [10]. Das Werkzeug verfügt über einen begrenzten Satz elementarer Modellbausteine, mit dessen Hilfe sich die unterschiedlichen Arten zellulärer Funktionseinheiten in einfacher Weise strukturieren lassen. Wesentlich ist, dass die Verschaltung der Bausteine immer nach den gleichen Prinzipien und über einheitlich definierte Schnittstellen erfolgt. Die Verschaltung zu einem Gesamtmodell erfolgt rechnergestützt und vollautomatisch. Der Modellierungsvorgang ist somit von Gleichungsmani-

pulationen völlig entlastet. Die biologische Grundlagenforschung trägt durch experimentelle Untersuchungen in Bioreaktoren oder an Einzelzellen mit dem Einsatz leistungsfähiger Messverfahren (cDNA Chips, 2-D Gelelektrophorese, Massenspektroskopie, Laserscanning Mikroskopie) zum virtuellen Labor bei. Ein wichtiger Punkt bei diesen Arbeiten ist die gemeinsame Erstellung von Hypothesen. Diese sollen durch Modellierung und modellgestützte Experimentplanung überprüft werden.

Das zum Einsatz kommende Modellierungskonzept erlaubt es, komplex strukturierte Funktionseinheiten auf eine Verschaltung einfacher Einheiten zurückzuführen. In der Lehre kann deshalb mit Hilfe des Virtuellen Biologischen Labors systematisch eine ganzheitliche Denkweise vermittelt werden, die im Zentrum einer interdisziplinären Ausbildung von Biologen, Systemwissenschaftlern und Informatikern steht: Ausgehend von der Untersuchung elementarer Prozesse eröffnet es über die Erstellung einfacher Stoffwechsel- und Signalwege zunächst die Möglichkeit der anschaulichen Vermittlung von biologischem Grundlagenwissen. Im Rahmen weiterführender Studien bieten sich durch die computergestützte Simulation und Visualisierung komplexer Systeme neuartige Perspektiven der interaktiven Wissensvermittlung z. B. in den Bereichen Signalverarbeitung in zellulären Systemen, Regulation des Stoffwechsels und der Genexpression, Bioprozesstechnik und biologische Datenbanken.

Signalverarbeitung, Signaltransduktion: Die Beobachtung, dass Mikroorganismen sehr schnell und flexibel auf Umweltänderungen reagieren können, lässt sich durch ein effizientes und hierarchisch aufgebautes Signalübertragungs- und -verarbeitungssystem erklären.

Stoffwechsel: Gesamtheit aller in einer Zelle ablaufenden Prozesse für Wachstum und Fortpflanzung.

Systemorientierte Bioprozesstechnik – Biosystemtechnik: Interdisziplinärer Forschungsansatz zum besseren Verständnis des komplexen Wachstums- und Produktionsverhalten zellulärer Systeme.

„Virtuelles“ Labor: Eine in Forschung und Lehre einsetzbare, rechnergestützte Arbeitsplattform, die Experimente mit zellulären Systemen analog zu Experimenten im realen Labor erlauben soll.

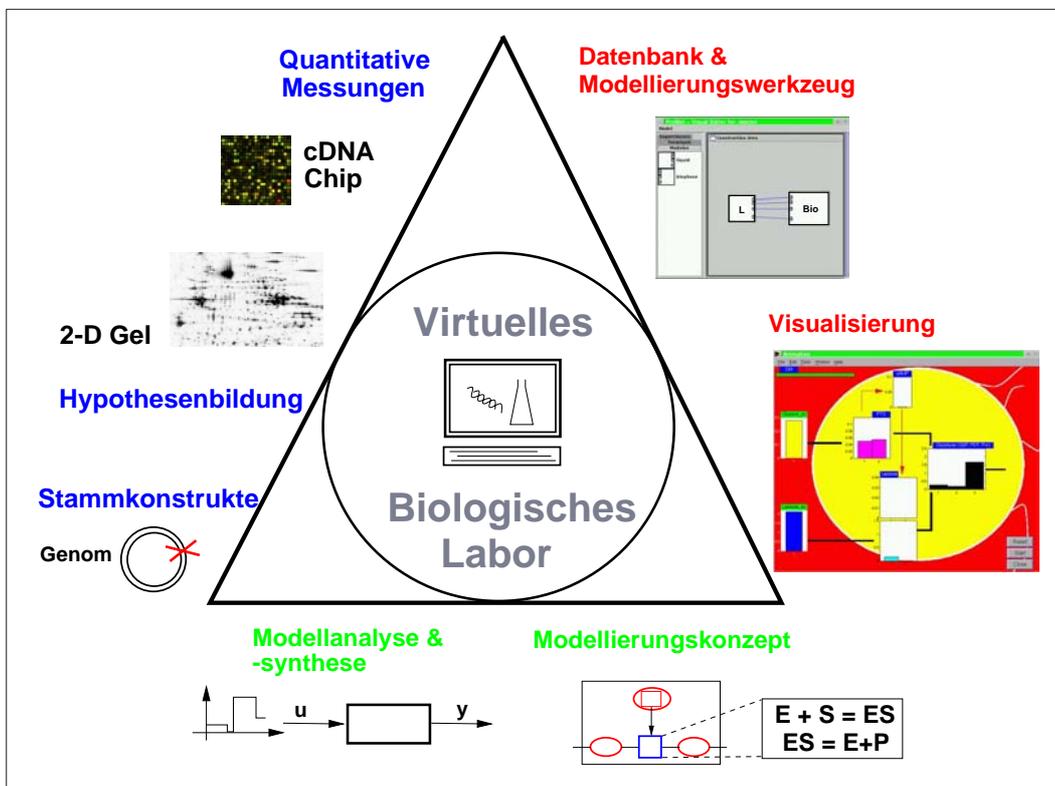


Abb. 8

Virtuelles Biologisches Labor: Interdisziplinärer Aufbau. Gezeigt sind die Beiträge der Disziplinen Biologie (links), Informatik (rechts) und Systemwissenschaften (unten).

Aufgrund der Integration eines breiten Methodenspektrums in das Virtuelle Biologische Labor können zudem z. B. Methoden der Datenbankkonzeption und -realisierung ebenso wie systemwissenschaftliche Analyse- und Syntheseverfahren anhand einfacher biologischer Beispiele veranschaulicht werden. In der Forschung wird durch das Virtuelle Biologische Labor ein effizienteres und mit bisherigen Methoden weitgehend unmögliches Arbeiten erreicht. Beispiele hierfür sind Rechnerexperimente mit modular aufgebauten Modellen, Überprüfung biologischer Hypothesen, syste-

matische Experimentplanung sowie Analyse und Gestaltung von Funktionseinheiten mit Hilfe systemwissenschaftlicher Methoden. Das Virtuelle Biologische Labor wird jedoch nicht nur in der Grundlagenforschung Anwendung finden, sondern auch in der anwendungsorientierten Forschung wie z. B. in der Krebsforschung oder im ‚Metabolic Engineering‘. Außerdem können Erkenntnisse über Strukturen biologischer Regulationsnetzwerke für die Gestaltung leistungsfähiger Konzepte zur Führung komplexer verfahrenstechnischer Produktionsanlagen übertragen werden.

Literaturhinweise

- /1/ A. Abbott; Alliance of US labs plans to build map of cell signalling pathways, *Nature* 402, 1999, pp. 219
- /2/ D. Normile; Building working cells ‘in silico’, *Science* 284, 1999, pp. 80
- /3/ J. W. Lengeler; Metabolic Networks: a signal-oriented approach to cellular models, *Biol.Chem.*381, 2000, pp. 911-920
- /4/ A. Kremling et al.; The organization of metabolic reaction networks: A signal-oriented approach to cellular models, *Metabolic Engineering* 2, 2000, 190-200
- /5/ E. D. Gilles; Netzwerktheorie verfahrenstechnischer Prozesse, *Chemie Ingenieur Technik* 69, 1997, pp. 1053-1065
- /6/ A. Kremling and E. D. Gilles; The organization of metabolic reaction networks: II. Signal processing in hierarchical structured functional units, *Metabolic Engineering* 3, 2001, pp. 138-150
- /7/ A. Kremling et al.; The organization of metabolic reaction networks: III. Application for diauxic growth on glucose and lactose, *Metabolic Engineering* 3, 2001, pp. 362-379
- /8/ U. Reichl; ISCOMs – Antigen production and downstream processing, *Proc. of the 4th International Congress on Biochemical Engineering*, H. Brunner (Editor), Stuttgart, 2000, pp. 314-318
- /9/ M. Ginkel et al.; Application of the process modeling Tool PROMOT to the modeling of metabolic networks, *IMACS Symposium on Mathematical Modeling*, I. Troch and F. Breitenecker (Editoren), 2000, pp. 525-528
- /10/ J. Stelling et al.; Towards a virtual biological laboratory. In: *Foundations of Systems Biology*, H. Kitano (Editor), MIT Press, 2001, pp. 189-212



Die Autorin und Autoren

Andreas Kremling, Katja Bettenbrock und Jörg Stelling sind wissenschaftliche Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme in Magdeburg und beschäftigten sich mit der mathematischen Modellierung von zellulären Systemen und der experimentellen Überprüfung der Modelle. Udo Reichl ist Inhaber des Lehr-

stuhls Bioprozesstechnik an der Otto-von-Guericke Universität und Leiter der Abteilung „System- und signalorientierte Bioprozesstechnik“ am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme. Ernst-Dieter Gilles ist Gründungsdirektor und Leiter der Abteilung „Prozesstechnik“ des Max-Planck-Instituts für Dynamik komplexer technischer Systeme in Magdeburg sowie Direktor des Instituts für Systemdynamik und Regelungstechnik der Universität Stuttgart.